

## **Estudos Sobre Leishmaniose: I. Primeiros Casos de Leishmaniose Espontânea Observados em Cobáios<sup>Ⓟ</sup>**

**Heitor Medina**

*Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas*

### **ABSTRACT**

*The author describes the first cases of spontaneous leishmaniasis in guinea-pigs, as verified for the first time, in Curitiba, at the Institute of Biology and Technological Research. Studying the inoculability of *Paracoccidioides brasiliensis* in guinea-pigs, he found animals which presented tumoral lesions in the ears and peritesticular skin. The examination of these tumors, mixed with a small drop of Giemsa's original solution, plus the exam of the rubbings of the same material, coloured by the May-Grunwald Giemsa after fixation by Heidenhein's solution and the histological exams of the cuts in the tumoral lesions revealed the presence of elements which possessed the same morphology and aspect of the LEISHMAN-DONOVANI corpuscles. In the meanwhile, a parasitosis by protozoarians of the Leishmania variety might have been suspected, because large macrophagi could be seen in the histological cuts, all parazitized, identical with those which are found in other cutaneous leishmaniosis. The author then proceeds to the experimental study of the sickness, first by endeavouring to obtain material for the inoculation and cultures, by means of punctures in the tumors. Part of the product of the punctures was sown in N. N. N. medium and part inoculated in other guinea-pigs. After the third day the cultures presented the flagellated forms of the parasite, free or grouped in rosettes in the culture liquid. All the guinea-pigs inoculated with part of the material obtained by puncturing and with the liquids of the cultures, reproduced the tumors found in the animals spontaneously infected. With a view to reproducing the same features of generalization which were observed in other experimental animals, with other strains of leishmania, new animals were inoculated after having been tarred and blocked in order to attempt the breaking down of possible natural resistences, which proved unnecessary, however, for the generalization went on of itself naturally and without artifice. Inoculations were made by the subcutaneous, intraperitoneal, intrasplenic, intramedular, intracerebral and endovenous channels and by instillation in the conjunctive, in those guinea-pigs which received subcutaneous inoculations, the incubation period varied between 11 and 15 days, this period being longer when the internal channels were used, when it was generally one or two months before the lesions appeared. When the lesions are on the skin or when the inoculation is done there, the first manifestations of lesions are characterized by a slight thickening of the subcutaneous tissue, which, little by little, becomes more consistent, giving place to a tumoral growth which attains great volume and characterizes the most developed phase. The lesions, when metastatic, are localized mostly in the tegumentary extremities and periarticular zones, having the same appearance as the lesions observed by other researchers who have studied the infection of hamsters, mice and dogs infected by *L. donovani*, *L. infantum* and *L. tropica*. The experiments carried out in all the tumoral lesions in guinea-pigs, were positive for leishmania, where they were found free in the tissues or parasitizing large macrophagi. At times the tumors ulcerate and become covered with a crusty layer, easily detachable, covering a rosy surface of granulomatosis aspect. The spleen and lymphatic ganglia are the internal organs which most react, hypertrophy always being present, and it has been possible to re-isolate the parasite of these organs as well as those of the liver, suprarenal, testicle, medulla of the bones and cardiac blood. A series of sixty guinea-pigs were inoculated in the skin of the nose and sacrificed within anything from a few minutes' up to*

<sup>Ⓟ</sup> Artigo publicado no *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 1, pp. 39-74, 1946.

*twenty-four hours' interval. The material obtained from these animals was fixed in Bouin-Hollande, included in paraffin and coloured by hematoxilin-eosine and Maxinow's hematoxilin-azur II-eosine. The study of the histological cuts in the different periods of evolution showed that the inflammatory process passes through a series of modifications which start by an acute inflammatory phase followed by a simple granulomatosis phase, finally followed by another characterized exclusively by large parasitized macrophagi – the macrophagi phase. During the period of evolution of the inflammatory lesion, the infiltrative phenomena are constant and are at first constituted of granulocited neutrophils, eosinophils and mononuclear cells, followed by a preponderance of monocytes and lastly by the sole presence of large parasitized macrophagi. The author compares his findings in the guinea-pigs with those in other animals inoculated with different strain of Leishmania, calling attention to a real dermatropism of the parasite under study to its dissemination through the lymphatic channels and to the histological lesions identical to those other leishmaniosis, principally by those produced by *L. tropica*.*

**Key Words:** Leishmaniasis; guinea-pig

## INTRODUÇÃO

Em março de 1945, trabalhávamos com raças de *Paracoccidioide brasiliensis*, isoladas em Santa Catarina. Pretendíamos, depois de passadas em testículos de cobáios, reisolá-las nos meios adequados. Entre os animais trazidos ao nosso laboratório (fig. 1) um nos chamou a atenção, por apresentar certas formações tumorais de aspecto infiltrativo, as quais se localizavam na parte externa do pavilhão auricular direito e na pele peritesticular.

Julgamos, a princípio, tratar-se de processo inflamatório comum. Passados alguns dias, dois outros animais com as mesmas lesões do anterior, foram trazidos do biotério, provenientes, um do mesmo compartimento que forneceu o primeiro cobáio espontaneamente infectado, e outro do vizinho.

Ocorreu-nos, então, fazer punção exploradora num dos tumores, afim de averiguar quais os tipos de elementos celulares inflamatórios presentes, bem como a eventual intercorrência de qualquer cogumelo patogênico. Foram feitos vários esfregaços com o material assim obtido, para as colorações comuns à rotina, reservando-se algumas lâminas, para posteriores exames a fresco. O estudo histológico dos cortes das lesões tumorais do primeiro animal revelou tratar-se de processo inflamatório crônico, e constituído, por infiltrado difuso de células redondas, de sincícios e macrófagos, em cujo protoplasma se notavam, nitidamente, numerosíssimos corpúsculos bem individualizados que não puderam ser identificados à primeira vista. Os esfregaços corados pelo método de Gram revelaram elementos de forma ovóide, mas não a estrutura interna dos mesmos, não acontecendo o mesmo com os exames entre lâmina e lamínula do

material previamente misturado com uma pequena gota de solução original de Giemsa. As preparações, assim coradas, permitiram suspeitar de leishmaniose (fig. 2), pois entre os elementos presentes, se destacavam corpúsculos, alguns ovais, outros redondos, com o característico típico dos corpúsculos de Leishman-Donovani. Este resultado foi plenamente confirmado pela coloração de novos esfregaços pelo May-Grunwald Giemsa (fig. 3), fazendo-se fixação prévia com líquido de Heidenhein. O corante evidenciou, perfeitamente, o núcleo e o blefaroplasto vermelho, a membrana envolvente azul e as substâncias paraplasmas, conforme as tendências tintoreais vermelhas ou azuis. Grandes macrófagos estavam presentes, todos parasitados e uma infinidade de elementos parasitários enchia, completamente, o campo microscópico. Dessa maneira, foi-nos possível confirmar a suspeita, que tivemos desde os exames histológicos de se tratar de parasitose por leishmanias, corroborada histologicamente pelo aspecto granulomatoso da lesão e, pela presença de macrófagos parasitados (fig. 4, 5 e 6) em tudo idêntico aos que se encontram nas outras leishmanioses cutâneas, descritas por YOUNG e MARSHALL (1928), MILLS, MACHATTLE e CHADWICK (1930); LINTON (1929), BOGLIOLO (1934), CASH e HU (1927).

Tratamos, em seguida, de cultivá-las nos meios especiais e obtivemos boa proliferação com formas flageladas típicas de leishmanias.

A reprodução experimental da doença foi possível somente em cobáios. Novos animais foram inoculados nas orelhas e no nariz com material de punção, previamente diluído em soro fisiológico esterilizado. Teve-se o cuidado de apurar se os cobáios em experiência haviam tido contacto com os doentes, que fossem hígidos e procedentes de

gaiolas bem distantes das fornecidas pelos primeiros animais, espontaneamente infectados.

Aqueles foram diariamente observados, correndo tudo sem qualquer alteração até o 10º dia. No 11º dia após a inoculação, notou-se sob a pele, no local da injeção, pequeno espessamento do tecido subcutâneo, ligeiramente movível, o qual, ao fim de algum tempo, tomava o aspecto dos tumores acima descritos (fig. 7). O mesmo resultado foi obtido por inoculações feitas com os líquidos dos meios de cultura, que continham formas flageladas do parasito, isoladas a partir das primeiras punções explorada, feitas com fins de diagnóstico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Com o fim de conservar as raças, inoculá-las e proceder à pesquisa da positividade em outros animais, foram feitas punções nos tumores, após rigorosa assepsia. O material obtido foi suspenso em soro fisiológico e água destilada, esterilizados. Uma gota da suspensão parasitária permite, além da simples verificação, efetuar a contagem dos corpúsculos de Leishman, os quais se apresentam ovóides ou redondos e correspondem, em tamanho, a  $\frac{1}{4}$  de uma hemátia.

As contagens nas suspensões foram feitas na célula de Thoma de acordo com a técnica indicada em hematimetria.

Os preparados para a observação direta dos parasitos e células parasitíferas, foram obtidos distendendo na lâmina uma gota da diluição em água destilada esterilizada do material de raspagem dos tumores, e ainda, pela técnica de compressão dos tecidos patológicos sobre uma lâmina levemente aquecida. Em ambos os casos, fixaram-se previamente, as preparações pelo líquido de Heidenhein, seguindo-se a técnica de coloração pelo May-Grunwald-Giemsa. Para o estudo das leishmanias, principalmente nos tecidos, foi utilizada a técnica de viragem da coloração por uma laca férrea da hemateína de PEREIRA e MEDINA (1945).

Este método de dupla fixação permite observar com muita nitidez os parasitos e as células.

O isolamento foi realizado no meio N. N. N. segundo CULBERTSON (1942), onde o autor recomenda adicionar 1 cc de água destilada e esterilizada após o endurecimento do Agar.

Feitas as provas de esterilidade do meio semeam-se nele as suspensões de parasitos em soro fisiológico.

Qualquer contaminação inibe o desenvolvimento das formas flageladas. De conformidade com GUPTA (1928), CRAIG (1942) E CULBERTSON (1942), o aparecimento de leptômonas tem lugar após uma ou duas semanas de incubação à temperatura ambiente. Examinando um dos tubos semeados para averiguar sua esterilidade, foi-nos dado observar, após o 4º dia, formas de leptômonas nos líquidos de cultura, as quais percorriam agitadamente o campo e sempre na direção do flagelo.

Além de flagelados livres eram vistos, ainda, outros, ligados pelo corpo ou pelas extremidades, e inúmeras formas em roseta esparsas pelo campo. Foram feitas culturas de vários órgãos, as quais se tornaram positivas num tempo que variou entre onze dias e dois meses. Entre os órgãos revelaram-se positivas as culturas do baço, fígado, suprarrenal, testículo, medula óssea, gânglios e sangue. Muitas preparações de parênquima daqueles órgãos, principalmente dos gânglios, acusaram a presença de parasitos diretamente à coloração a fresco, segundo a técnica descrita anteriormente para as punções de tumores, possibilitando a observação de leishmanias livres e fagocitadas por macrófagos. O mesmo resultado foi obtido no exame de esfregaços a seco e corados pelo May-Grunwald-Giemsa. Na pesquisa, em cortes histológicos, também se observou o mesmo. Conseguida a reprodução dos tumores na pele, tentamos, obter os mesmos quadros da infecção generalizada, descritos por MILLS, MACHATTIE e CHADWICK (1930); YOUNG e MARSHALL (1928); LAVERAN (1915); etc., que estudaram experimentalmente as leishmanioses nos hamsters camundongos e cães.

Julgamos a princípio necessário quebrar as resistências naturais, para tornar possível a disseminação pelo organismo e o conseqüente aparecimento das lesões cutâneas observadas na infecção daqueles animais receptíveis. Para isso, intoxicamos os cobaios pelo monóxido de carbono, fenilhidrazina, alcatrão de fumo e os bloqueamos pela tinta da China, azul de tripan, etc. Mas, concluímos pela desnecessidade desses artificios, pois a infecção generalizada se processou espontaneamente no fim de pouco tempo e independente da via de inoculação.

Fez-se o estudo através de 250 cobaios de ambos os sexos, inoculados pelas vias subcutâneas, intraperitoneal, endovenosa, intraesplênica, intracerebral, intramedular e por instilação na conjuntiva.

Todos os animais positivaram a inoculação, exceto os instilados na conjuntiva. O material inoculado proveio das lesões tumorais puncionadas, de líquidos das culturas de dez dias de incubação.

**VIA SUBCUTÂNEA:** Em animais, regulando o mesmo peso e idade, escolheu-se de preferência a pele do nariz, pela facilidade de observação das lesões conseqüentes, e melhor colheita do material. Verificado que a generalização se processava sem qualquer artifício, foi esta via logo adotada por ser mais rápida e tão eficiente quanto qualquer das outras. Consiste ela em introduzir a agulha inoculante, rente à superfície óssea do nariz, após os cuidados severos de assepsia, manobra facilitada pelo levantamento da pele com uma pinça.

Injeta-se de 0,5 a 1 cc do material infectante diluído em soro fisiológico.

**VIA INTRAPERITONIAL E ENDOVENOSA:** Nada oferecem de particular a não ser os cuidados que se deve ter com as contaminações.

**VIA INTRAESPLÊNICA:** Adotamos aqui duas técnicas de inoculação. Ambas consistiram em laparotomia com as vias de acesso ao baço, estando o animal anestesiado por solução de cloral e morfina, injetada no peritônio. Emprega-se o éter como coadjuvante.

Atingido o baço, foi retirado da loja pela tração suave de uma pinça protegida. Inoculou-se no parênquima, 0,2 cc de suspensão infectante. Operou-se a hemóstase no local de perfuração da agulha, por meio da cauterização, feita por uma pipeta Pasteur aquecida ao rubro. Após as suturas, deixa-se o animal em lugar protegido até despertar. Com esta técnica não tivemos caso algum de insucesso. A segunda, tendo-se em vista a possível atividade antixênica dos humores e dos elementos circulatórios, consistiu em produzir uma situação que fosse propícia ao desenvolvimento dos parasitos. Provocou-se, assim, um enfarto hemorrágico do baço, pelo ligamento das artérias esplênicas no pedículo. Os parasitos foram inoculados na zona enfartada. Serviu-se dessas técnicas somente no estudo das reproduções tumorais cutâneas e da infecção orgânica, mas foram abandonadas em face dos resultados satisfatórios obtidos pela via superficial.

**VIA INTRAMEDULAR:** Foi a que melhores resultados proporcionaram, porque as lesões se generalizam uniformemente e em tempo relativamente curto. Consiste na descoberta do fêmur sob narcose.

A superfície óssea é perfurada por pequeno trocater, até que se atinja a substância medular. O orifício deve ser tão inclinado quanto possível, para facilitar a introdução profunda da agulha, no canal medular, e a quantidade a injetar equivalente à que foi utilizada para a inoculação intraesplênica. Unem-se as duas superfícies musculares e sutura-se a pele com agrafos.

**VIA INTRACEREBRAL:** Tentamos, também, inoculação direta da massa encefálica. A técnica utilizada foi a mesma que se adota nas inoculações de vírus, trepanando-se o animal um pouco ao lado da sutura mediana do crânio. Introduz-se agulha no cérebro até 2 mm e injeta-se uma quantidade de suspensão de parasitos idêntica à utilizada nas inoculações por via intramedular.

Todos os animais inoculados pelas diferentes vias descritas resistiram perfeitamente ao traumatismo da operação e apresentaram lesões, que serão descritas mais adiante.

Procedeu-se, além de outros, ao estudo histológico dos tumores de todos os animais experimentalmente inoculados ou espontaneamente infectados, com o propósito de averiguar a evolução das lesões histopatológicas da pele, desde os primeiros momentos após a inoculação até o aparecimento das lesões tumorais. Nada menos que 60 animais foram inoculados no nariz com material de punção, e sacrificados, por embolia gasosa em espaços de tempo bem próximos, nos seguintes intervalos: 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 minutos; 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 92, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312 e 336 horas, o que equivale a 14 dias de infecção. Os animais para a experiência tinham, aproximadamente, o mesmo peso e idade e sofreram inoculação de 1 cc, de suspensão infectante, com 1240 corpúsculos de Leishman por mm<sup>3</sup>.

As peças colhidas nas necropsias foram fixadas em Bouin-Hollande e em formol a 10%. Outros fixadores foram usados, porém os dois referidos apresentaram vantagens no trabalho de rotina. O fixador de Bouin-Hollande, preferido a qualquer outro, à base de ácido pícrico, permitiu colorações panorâmicas satisfatórias e boa fixação dos parasitos nos cortes histológicos. As inclusões foram feitas em parafina pelo método comum e pela técnica de dupla inclusão de Peterfi. Os cortes foram corados pela hematoxilina e eosina; hematoxilina – Azur II – eosina de Maximow e pela viragem da laca férrea da hematoxilina pela

prata amoniaca, C. PEREIRA e H. MEDINA (1945).

## OBSERVAÇÃO

1º - COBÁIO Nº 645 – Sofreu injeção diretamente no baço, em 4/1/46, com material retirado por punção de tumor do nariz de outro animal infectado experimentalmente. Foi sacrificado em 3/3/46, ocasião em que apresentava lesões tumorais ulceradas nas regiões periarticulares dos membros anteriores e posteriores, no nariz e na pele peritesticular; gânglios axilares, inguinais e mesentéricos hipertrofiados; baço medianamente hipertrofiado de cor vermelho escuro e granuloso; polpa esplênica de cor vermelho escuro, destacável e granulosa; suprarenal amarelada e hipertrófica, com a cortical e a medular distinguíveis; fígado hipertrófico, de coloração vermelho-escuro, e os demais órgãos sem modificações macroscópicas.

O material obtido por punção dos gânglios inguinais forneceu culturas positivas em meio N. N. após o quinto dia de incubação.

2º - COBÁIO Nº 10 – Sofreu inoculação no baço, em 26/6/45, com material retirado por punção do tumor do nariz de outro animal infectado experimentalmente. Foi sacrificado em 20/8/45, ocasião em que denunciava lesões tumorais no lado direito do nariz, nas regiões periarticulares dos membros posteriores, na região periaricular do membro anterior do lado esquerdo e na base do pavilhão auricular do lado direito; gânglios inguinais hipertrofiados; baço hipertrofiado, rugoso, de cor vermelho escuro e polpa consistente; suprarenal de cor amarelada, cortical e medular distinguíveis; fígado com congestão passiva. Os demais órgãos não revelavam modificações macroscópicas aparentes.

3º - COBÁIO Nº 9 – Sofreu injeção no baço em 26/6/45, com material retirado por punção de tumor do nariz de outro animal infectado experimentalmente.

Foi sacrificado em 30/8/45, quando apresentava lesões tumorais nas regiões periarticulares dos membros anteriores e posteriores, na pele peritesticular, orelhas, nariz e pálpebra superior direita; gânglios superficiais hipertrofiados; baço de volume praticamente normal, hiperplasia trabecular e polpa destacável; fígado com congestão passiva, consistência friável, coloração escura e pequenos cistos na face inferior, revelando pequenas zonas claras na superfície, que se aprofundavam no parênquima; suprarenais

hipertrofiadas, cor amarelada, hiperemiadas; testículos atrofiados.

4º - COBÁIO Nº 17 – Sofreu inoculação na orelha direita, em 17/7/45, com material retirado por punção de tumor do nariz de outro animal infectado experimentalmente. Em 20/8/45 apresentava uma lesão tumoral no local da inoculação e na pálpebra superior do olho direito. Em 19/9/45 apareceram lesões tumorais na orelha esquerda e no nariz; os gânglios se mostravam hipertrofiados.

5º - COBÁIO Nº 2399 – Sofreu inoculação no nariz, a 5/7/45, com material retirado por punção do tumor do nariz de outro animal infectado experimentalmente.

Foi sacrificado em 21/4/46, momento em que apresentava lesões tumorais nas regiões periarticulares, membros anteriores e posteriores, orelhas, pálpebras e ponto de inoculação; gânglios superficiais muito hipertrofiados, e os inguinais do tamanho de uma ervilha; baço hipertrofiado, de cor vermelho-escuro, superfície rugosa; fígado de coloração escura e aumentado de volume, hiperemia passiva; suprarenais hipertrofiadas e de coloração amarelada; estomago com hemorragia localizada na grande curvatura; útero grávido e congesto.

As culturas foram positivas no baço, fígado, suprarenal e medula óssea.

6º - COBÁIO Nº 73 – Sofreu inoculação no nariz, em 11/11/45, com material retirado por punção do tumor de nariz de outro animal infectado experimentalmente. Foi sacrificado em 14/1/46, data em que manifestava lesões tumorais nas zonas periarticulares dos membros anteriores e posteriores, no nariz, orelhas e períneo; gânglios superficiais e mesentéricos hipertrofiados; baço volumoso e de coloração vermelho escuro, superfície lisa e polpa facilmente destacável; suprarenais hipertrofiadas e de cor amarelada. Os demais órgãos não acusavam modificações macroscópicas aparentes. Cultura era positiva na medula óssea.

7º - COBÁIO Nº 610 – Sofreu inoculação na medula óssea, em 4/1/46, com material retirado por punção do tumor de nariz de outro animal infectado experimentalmente. Foi sacrificado em 6/2/46, apresentando lesão tumoral no nariz. Os gânglios superficiais, hipertrofiados, eram facilmente palpáveis. O baço, granuloso e róseo, acusava volume e aspecto normais. O fígado, de tamanho normal, era de coloração escura e

apresentava estase biliar. Suprarrenais volumosas, eram de coloração amarelada e estavam congestionadas. A medula óssea, de coloração vermelha, forneceu culturas positivas para leishmanias. A caixa torácica mostrava consistência flácida. Os pêlos eram facilmente destacáveis, aos montes.

8° - COBÁIO Nº 621 – Foi inoculado na medula óssea, em 4/1/46, com material retirado por punção do nariz de outro animal experimentalmente infectado, e sacrificado em 18/2/46. Apresentava lesões tumorais nas regiões periarticulares dos membros anteriores e posteriores; pele peritesticular; gânglios superficiais e mesentéricos hipertrofiados; baço levemente hipertrofiado, de coloração vermelho escuro, granuloso e com polpa facilmente destacável, fígado escuro e hipertrofiado; suprarrenais levemente aumentadas de volume e de coloração amarelada. A cultura de leishmania no sangue cardíaco foi positiva após mês e meio de incubação.

9° - COBÁIO Nº 553 – Foi inoculado na medula óssea, em 4/1/46, com material retirado por punção do tumor de nariz de outro animal infectado experimentalmente e teve morte natural em 14/3/46. Suas redes ganglionares axilar e inguinal mostravam-se ligeiramente hipertrofiadas, com predominância dos gânglios da rede inguinal. Baço vermelho escuro e superfície lisa com polpa destacável. Suprarrenal levemente hipertrofiada, cor amarelada, cortical e medular distinguíveis. Fígado levemente hipertrofiado e vermelho escuro. Pulmão direito mostrava consistência aumentada e coloração vermelha, deixando correr um líquido sanguinolento e espumoso quando comprimido. A superfície da mucosa da traquéia e brônquios estava recoberta por catarro muco-purulento. Na orelha direita havia pequeno nódulo tumoral levemente endurecido.

10° - COBÁIO Nº 670 – Inoculado no nariz, a 27/10/45, com material retirado por punção do tumor do nariz de outro animal experimentalmente infectado. Acusou, em 13/11/45, um tumor infiltrado no ponto de inoculação, o qual seguiu a sua evolução normal, até que em 6/1/46 o animal foi sacrificado em estado pré-agônico com sintomatologia típica de encefalite (perda do equilíbrio, epistótomo, etc.). Cérebro, congesto, sem aderência das meninges. Vasos meningeos hiperemiados. As demais regiões encefálicas, como outros órgãos do corpo, sem modificações macroscópicas aparentes.

11° - COBÁIO Nº 178 – Inoculado no cérebro, em 4/1/46, com material retirado por punção do tumor do nariz de outro animal infectado experimentalmente. Foi sacrificado em 15/9/46, em estado pré-agônico. Apresentava, na pálpebra direita, lesão de aspecto produtivo e crostoso, cujo induto recobria uma superfície rósea e granulosa era facilmente destacável.

Nove meses sobreviveu o animal, no fim dos quais se revelou prostado e com respiração muito leve, incapaz de se locomover. Seu aspecto geral era satisfatório, não apresentando qualquer outra lesão externa que a do olho direito. A necropsia revelou estar o fígado levemente aumentado de volume, com aspecto de noz-moscada e levemente hiperemiado. O baço, hipertrofiado e granuloso, era de cor escura. Suprarrenais amareladas e levemente hipertróficas. O grande meteorismo intestinal é que lhe perturbava, naturalmente, a respiração. Não se lhe distinguem os limites entre a cortical e a medular nos rins. As meninges se mostravam congestionadas e a dura mais espessa. Os demais órgãos do corpo não denunciavam modificações macroscópicas aparentes.

## **EVOLUÇÃO DA DOENÇA EXPERIMENTAL**

a) INCUBAÇÃO – Os animais inoculados não apresentaram, pelo menos de maneira aparente, nos dias que se seguiram à operação, qualquer perturbação no seu estado normal. Em todos, o tempo de incubação, até o aparecimento das primeiras lesões, representadas, neste caso, pela tumoração, está compreendido sempre entre 11 e 15 dias. As inoculações maciças, bem como o peso e idade dos animais, não influíram no período de incubação.

b) EVOLUÇÃO E MODIFICAÇÕES MACROSCÓPICAS DA PELE – A começar do 11° dia, a pele dos animais acusava o ponto de inoculação ligeiro espessamento, perfeitamente sensível e palpável, que tendia sempre a aumentar, tornando-se mais e mais consistente, até atingir apreciável volume, ao mesmo tempo que se tornava hiperemiado e com os pelos que recobrem a lesão eriçados (fig. 7).

Com o evoluir da lesão atenua-se a hiperemia cada vez mais, até desaparecer. Quando os tumores atingem tamanhos desproporcionais, as partes atingidas ficam perturbadas nas funções peculiares, e os animais entristecem, perdendo a

vivacidade que lhes é característica (fig. 8). Assim avolumados, os tumores sofrem muitas vezes um processo de necrose, devido a perturbações metabólicas locais LAVERAN (1917), ou a choques traumáticos no momento da alimentação. Os tumores ulcerados não mais cicatrizam e ficam recobertos de substância purulenta, crostosa, ou sanguinolenta (fig. 9), facilmente destacável, revestindo uma superfície rósea e granulomatosa. Isso, entretanto, não é regra geral.

Observamos animais, cujos tumores apesar de grandes proporções, não ulceraram (fig. 10 e 11), até o dia da necropsia. Vimos que, uma vez instalada a ulceração, o tumor raramente regride, cicatrizando, e que quando tal acontece, o animal fica mutilado em consequência da perda de substância.

Num espaço de mês e meio, bem desenvolvido o tumor, se manifestam generalizações em outros pontos, especialmente nas extremidades tegumentares, sendo interessadas as regiões periartríticas, lábios, orelhas, pálpebras, pele peritesticular ou vulvar, clitóris e nariz (fig. 12, 13, 14 e 15).

Quando metastáticas, as lesões aparecem em pontos diferentes, com tendência a se fundirem num todo compacto. Feita uma punção de orelha, para colheita de sangue, destinado à formula leucocitária, foram vistos, entre as hemátias, vários corpúsculos de Leishman.

Para local da punção escolhemos o pavilhão auricular, porque, aparentemente sem lesões, se mostrava normal.

As pálpebras também são infiltradas por macrófagos parasitados, podendo atingirem grandes proporções, ulcerando, na maioria das vezes, e recobrendo-se de crostas (fig. 15) que se destacam com facilidade. A infiltração se propaga para a conjuntiva e para a córnea transparente (fig. 16). Esta se torna opaca, perturbando a visão do animal.

Muito significativo é o aparecimento das lesões nos membros anteriores e posteriores, onde as regiões periartríticas são sítios de tumores, que, como os do nariz, se iniciam por um espessamento da pele, aumentando paulatinamente de volume.

Formam-se eles em todas as articulações baixas dos membros anteriores e posteriores, inclusive os dedos (fig. 8, 12, 13, 14, 17 e 18), produzindo deformações pelo desvio da posição normal das falanges e dos tarsos.

O aumento de volume do membro não permite o assento normal da região plantar (fig. 8), e esta,

com o correr do tempo, ulcera não só devido ao atrito, e a fenômenos necróticos ou dismetabólicos, como porque os animais destroem os tumores, comendo-os entre si, reciprocamente.

A infiltração da região perineal se processa concomitantemente com as lesões dos membros, e caracteriza-se pelo simples endurecimento da pele que começa restrito e se propaga às imediações, terminando por abranger grande área do escroto ou da vulva. Neste último caso chega a atingir o próprio clitóris.

Assim é que essas regiões se tornam proeminentes para a parte posterior do corpo e mercê do peso e do volume da massa atiram com o solo (fig. 12-14). Nenhum dos animais observados apresentou alopecia, mas era de notar a notável fragilidade dos pêlos, que podiam ser arrancados aos montes, sem grande dificuldade. Os exames feitos em todas as lesões tumorais foram positivos, mostrando não pequena quantidade de corpúsculos de Leishman, livres ou fagocitados por macrófagos, quadro idêntico ao das primeiras punções feitas em outras regiões. Em tal fase o animal se mostra tristonho, e passa quieto a maior parte do tempo. Sem que haja comprometimento direto do aparelho cardiovascular, mas, provavelmente, por estarem com as vias respiratórias superiores obstruídas pelos tumores no nariz, os animais se mostram cianosados e dispnéicos, e, em virtude desse déficit, ou de menor capacidade de resistência, KUROTCKIN e CHUNG (1930), é favorecido o aparecimento de doenças intercorrentes, não sendo raros os estados pneumônicos, como diagnóstico de causa mortis. É evidente o estado de fadiga do animal tumoroso há mais de três meses, e o seu simples manuseio e reação podem determinar-lhe a morte.

Já nos foi dado averiguar pulsações arrítmicas, muitas horas antes da morte natural de um cobáio infectado. A estase intestinal é quadro constante, a agravar o seu estado geral, exteriorizando-se o meteorismo pelo grande abaulamento do abdômen. Os estados diarréicos também são comuns. Temos tido a atenção voltada para um certo estado de flacidez da caixa torácica, cujas costelas deixam de resistir normalmente a compressão.

c) MODIFICAÇÕES ORGÂNICAS E MACROSCÓPICAS – Modificações internas foram pesquisadas em todos os animais, logo após a morte espontânea, ou após o sacrifício por embolia gasosa. Poucos dias depois da inoculação, os animais inoculados não apresentaram lesões anatômicas evidentes, excetuando dois casos em

que o baço reagiu por grande hipertrofia, muito precocemente (fig. 19). As lesões são evidentes nos demais cobáios, de preferência as situadas nos órgãos ricos de elementos pertencentes ao S. R. E. **GÂGLIOS LINFÁTICOS** – São os primeiros a reagir. Alguns dias após à inoculação, tornam-se palpáveis e mais nítidos devido à generalização, atingindo e, às vezes, ultrapassando o tamanho de uma ervilha. Os inguinais, pela sua localização, favorecem o exame. Uma auréola sanguínea, sempre presente, acompanha, algumas vezes, a cadeia ganglionar nessa região. Ao corte, deixam escapar uma substância amarelada, mucilaginosa e rica em macrófagos parasitados e elementos parasitários livres. A sementeira feita em meio N. N. N. permitiu o isolamento de leptomonas com os característicos antes descritos.

**BAÇO** – Macroscopicamente, é o órgão que mais reage, estando, na maioria das vezes, hipertrofiado, chegando a atingir dimensões desproporcionais ao porte do animal (fig. 19). Seu aspecto externo é granuloso, às vezes, liso, de cor vermelha e dimensões variáveis, sendo que, em dois cobáios, o seu porte acusava 4,5 cm de comprimento por 2,0 cm de espessura e 3,0 cm de largura, com peso de 3 gramas.

Ao corte, a polpa friável é facilmente destacada, como baço infeccioso, sendo, às vezes, de aspecto fibroso e consistente.

**SUPRARENAL** – Hipertrofiada, de cor amarelada na maioria das vezes, e noutras, hemorrágica. A cortical e medular são bem diferenciáveis e sem maiores modificações. Num caso, a glândula pesava 0,900 g. As culturas feitas com material retirado destes órgãos foram também positivas.

**FÍGADO** – Este órgão também reage intensamente à infecção, hipertrofiando-se, e apresentando, embora em menor quantidade, elementos parasitários. Dá igualmente, culturas positivas para leishmanias. Quando hipertrofiado, invade a loja subfrênica esquerda e desce abaixo do rebordo costal. O maior diâmetro encontrado media 10cm de comprimento, por 5,5 cm de largura e 2,5 cm de espessura, pesando 24 g.

Externamente, é de superfície lisa, por vezes com manchas amareladas cicatriciais, conseqüentes de processos estranhos à doença. Há estase biliar.

**PULMÕES** – Macroscopicamente, em regra, não mostram modificações. Nos estados de enfermidades intercorrentes, apresentam-se congestos, de consistência mais dura, não sendo raros os estados edematosos. Nos demais órgãos, embora tenham sido isoladas formas de

leptômonas, não foram encontradas lesões macroscópicas evidentes. Assim, os testículos que forneceram culturas positivas para leishmanias, não ofereceram ao exame microscópico, modificações histológicas que pudessem ser ligadas à presença dos parasitos nos tecidos do órgão.

**d) MODIFICAÇÕES MICROSCÓPICAS DA PELE** – A epiderme não sofre, aparentemente, transformações durante as primeiras 336 horas, a não ser pequenos processos infiltrativos. De modo geral se mantém íntegra. Depois daquele período é que os fenômenos compressivos da tumoração e os infiltrativos em maior intensidade, modificam o aspecto normal da pele. Nesta, os elementos celulares da epiderme se mostram bem constituídos, com núcleo e protoplasma bem corados. Em algumas regiões, a epiderme está levemente adelgada, noutras mais espessada e limitada na parte externa pela camada granulosa com resquírios de substância córnea. A melanina não se distribui uniformemente em toda a extensão da basal.

**NOS 15 MINUTOS APÓS A INOCULAÇÃO** – Neste período já são observadas modificações nas dermas reticular e papilar, que se iniciam logo depois da infiltração celular. O infiltrado inflamatório está constituído por células redondas do tipo histiocitário, algumas em mitose, por linfócitos, plamócitos, polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos. Nenhum histiócito está parasitado por corpúsculo de Leishman. O infiltrado celular é mais compacto na altura dos feixes musculares e do tecido conjuntivo interfollicular (fig. 20), de onde se aprofunda no derma em direção ao local da inoculação, encontrando-se histiócitos, raros granulócitos neutrófilos, linfócitos e grandes acúmulos de parasitos nos interstícios dos tecidos desagregados pelo edema conseqüente à inoculação. Os polimorfonucleares neutrófilos que afluíram aos conglomerados de parasitos fagocitam leishmanias, as quais se mostram em vias de degeneração. Os vasos sanguíneos superficiais e os mais profundos estão congestos e encerram inúmeros granulócitos neutrófilos, em ativa diapedese e raras células monocitóides, que, logo após a saída do vaso (fig. 21 e 22), formam acúmulos perivasculares. Os vasos linfáticos estão livres de linfa e de elementos celulares. As glândulas sebáceas e os folículos pilosos estão normais. Algumas células do tecido conjuntivo

perifolicular entram em reprodução. Fases de mitose são comuns entre tais elementos.

**NOS 30 MINUTOS APÓS A INOCULAÇÃO** – Os vasos do derma papilar, próximos ao ponto da inoculação, se mostram hiperemiados e encerram numerosos polimorfonucleares em ativa diapedese, que, com vários elementos monocitóides, formam acúmulos perivasculares. Nos do derma reticular observa-se o mesmo fenômeno, mas com intensidade, encontrando-se finíssimos capilares com a luz obliterada por granulócito neutrófilo.

O endotélio dos vasos próximos aos acúmulos parasitários apresentam certo grau de entumescimento celular (fig. 23). Polimorfonucleares, monocitoides e linfócitos, alguns em ativa diapedese e fagocitose, invadem os tecidos desordenadamente. Corpúsculos de Leishman presentes no tecido edemaciado exibem tamanho e propriedades tintoriais diferentes, o que segundo REY (1943) indica possíveis estados de degeneração dos parasitos.

**NAS 6 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO** – Torna-se bem nítida a grande infiltração celular dos coreons reticular e papilar (fig. 24). Tanto num como noutro preponderam polimorfonucleares, e, em menor quantidade, células redondas. É particularmente notável a infiltração celular das papilas dérmicas, onde se vê neutrófilos, plasmócitos, histiócitos. No coreon papilar interna é a diapedese e a infiltração não só dos neutrófilos como de células monocitóides e linfócitos. Todos os vasos sanguíneos, inclusive os capilares, se mostram cheios de polimorfonucleares (fig. 26), sendo muito intensa a diapedese (fig. 28). Os vasos linfáticos estão livres de elementos. São comuns a mitose e o intumescimento das células endoteliais nas artérias de pequeno calibre (fig. 25, 26 e 27).

**NAS 12 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO** – É bem sensível o decréscimo da infiltração de neutrófilos e o aumento da dos histiócitos, que se difundem por todo campo microscópico. Apresentando, em certas porções, uma disposição perivascular, os últimos se insinuam assim entre as fibras conjuntivas e musculares (fig. 28), como no tecido gorduroso subcutâneo. Os vasos sanguíneos em geral estão livres de elementos e intumescidos no endotélio, cujas células fazem proeminência à luz vascular. Verdadeiros aglomerados de células redondas estão em várias partes do tecido, sendo que no gorduroso se encontram ninhos de granulócitos neutrófilos, alguns fagocitando corpúsculos de Leishman (fig. 29). São

encontrados parasitos livres entre as fibras do conjuntivo ou então fagocitados por macrófagos.

Os parasitos fagocitados pelos neutrófilos, estão, via de regra, em degeneração. Alguns ainda guardam bem as propriedades tintoriais do núcleo, da membrana. A citofagia está representada por histiócitos fagocitando polimorfonucleares.

**NAS 24 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO** – O exsudato inflamatório, composto de neutrófilos e células redondas, tem a mesma disposição e as mesmas características dos cortes anteriormente descritos. A quantidade de células redondas é mais aproximada à dos polimorfonucleares. O infiltrado celular penetra por entre as fibras conjuntivas e musculares do coreon. Os corpúsculos de Leishman, presentes nos aglomerados celulares, estão fagocitados por polimorfonucleares e em via de degeneração.

As células do endotélio dos vasos, muito intumescidos, fazem saliência para a luz dos mesmos. Há mobilização fibrocitária.

**NAS 48 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO** – Os polimorfonucleares, praticamente, desapareceram. Escassamente se apresentam com raros eosinófilos em alguns pontos do tecido. O tecido gorduroso do coreon papilar acha-se levemente fibrosado (fig. 30) e muito infiltrado de células redondas amebóides. No coreon reticular a infiltração está constituída por linfócitos e histiócitos, perceptíveis nas regiões que circundam o ponto da inoculação. Há mobilização de fibrócitos.

**NAS 72 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO** – As células infiltrativas nas áreas da inoculação se formam de alguns eosinófilos e células mononucleares. Algumas células endoteliais das artérias apresentam núcleo reniforme idêntico aos dos monócitos, sem que a libertação delas tenha sido presenciada em qualquer dos casos. As adventícias, já bem desenvolvidas, fagocitam parasitas, sem apresentarem características de mobilização. Entre as fibras musculares deparam-se macrófagos parasitados com mais de um elemento, e ao que nos parece, os parasitas estão em ativa reprodução, apresentando propriedades tintoriais bem definidas. Os ditos elementos parasitários podem ser encontrados livres, difundidos pelos tecidos ou, então, em pequenos conglomerados onde se nota uma membrana em volta dos mesmos, dando a aparência de sacos cheios de parasitos. Alguns macrófagos parasitados mostram leishmanias dentro de vacúolos, que se tornam cada vez maiores à medida que cresce o número de parasitos.

NAS 96 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO – As células redondas ocupam, então, quase completamente, o ponto da inoculação, e difunde-se a distribuição do infiltrado. Nota-se, em volta dos vasos sanguíneos, maior quantidade de elementos linfocitários, eosinófilos e macrófagos em divisão. Em virtude da sua situação justa vascular estas células fazem ressaltar o vaso entre os elementos presentes no corte. A infiltração interfibrilar, constituída por macrófagos e células linfocitárias, é mais intensa. O mesmo se observa nas camadas logo abaixo da epiderme. São comuns as formas de cariocinese entre os histiócitos, células endoteliais, adventíciais, e fibrócitos. Não foi possível encontrar macrófagos parasitados em fase de divisão. O tecido gorduroso acha-se invadido por células do exsudato inflamatório, e levemente fibrosado, lugar em que se percebe formação de células gigantes. Os neutrófilos mostram-se escassos, tanto nos vasos como nos tecidos circundantes. Células com aspecto epitelióide, de permeio com linfócitos, mostram início de formação nodular.

Os corpúsculos de Leishman estão fagocitados, de preferência por células de protoplasma claro e bem maior em relação ao núcleo, dentro de espaços claros, que muito se assemelham a vacúolos digestivos. Não obstante isso, os parasitos neles contidos apresentam contornos nítidos, núcleo e blefaroplasto bem corados.

No núcleo, a cromatina está mais condensada em torno da respectiva membrana. É esponjoso, com rede cromática e nucléolos bem corados. Muitas células têm o núcleo recalcado para a periferia, devido à enorme quantidade de parasitos que enchem o corpo protoplasmático. No seio do tecido conjuntivo se encontram parasitos livres, que não oferecem nenhum dos característicos de degeneração descritos por REY (1943).

NAS 144 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO – Sucede-se às figuras de mitose nos endotélis vasculares. O infiltrado inflamatório está constituído por macrófagos parasitados, que agora, em maior quantidades se espalham pelos tecidos. Conjuntamente com esses elementos são encontrados linfócitos, células monocitóides, algumas parasitadas, raros granulócitos eosinófilos e fibrócitos em mobilização.

NAS 216 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO – A infiltração celular no local da inflamação é bem mais intensa (fig. 31). Compõe-se de elementos redondos, onde se distingue grande quantidade de macrófagos parasitados, monócitos, linfócitos.

Entre os histiócitos, também presentes, notavam-se ainda algumas formas de reprodução. Os espaços interfasciculares da camada muscular da pele estão infiltrados de macrófagos parasitados e plasmócitos. No interior dos vasos, os raros granulócitos neutrófilos, bem como os linfócitos e monócitos, em maior quantidade formam acúmulos perivasculares, após a diapedese. As células endoteliais das arteríolas continuam hipertrofiadas. São freqüentes neste período as figuras de cariocinese. As células adventíciais contêm no protoplasma muitos corpúsculos parasitários. Leishmanias estão livres e difusamente espalhadas no tecido conjuntivo, ou então fagocitadas por células monocitóides e macrófagos, em situação muito superficial, até bem próximo dos folículos pilosos. Em certas zonas perivasculares nota-se tendência à formação de nódulos e gigantócitos. Em sua maioria os macrófagos estão parasitados, e alguns deles se mostram tão repletos de leishmanias que o núcleo aparece deslocado para a periferia. Entre tais células parasitíferas algumas há que perdem o núcleo e ficam constituídas apenas de membrana, a envolver grande número de parasitos.

NAS 288 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO – A maior parte dos macrófagos, parasitados, invade as partes mais superficiais do coreon. Mais intensa é a infiltração do conjuntivo e dos interstícios das fibras musculares, e constituídas por macrófagos parasitados. No interior de alguns vasos notam-se grandes acúmulos de linfócitos e monócitos, e acentuada hipertrofia das células endoteliais, que se salientam para a luz dos mesmos. Verificam-se, em certos campos, fenômenos de vascularite e disposição perivascular de células mononucleadas (fig. 32).

NAS 312 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO – As camadas subcutâneas estão infiltradas por histiócitos parasitados, linfócitos e, esta infiltração é muito mais intensa neste período (fig. 33) do que nos anteriores. Histiócitos parasitados infiltram-se, em grande quantidade, nas zonas perifoliculares, e entre as fibras do conjuntivo formam grandes acúmulos concentrados.

Os capilares profundos e superficiais encontram-se repletos de elementos mononucleados e granulócitos eosinófilos. As células endoteliais, hipertrofiadas, estão em divisão. No infiltrado há células monocitóides fagocitando parasitos.

NAS 336 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO – A epiderme inicia as suas modificações por uma diminuição das papilas dérmicas comprimidas que

são, pelo crescimento do granuloma subcutâneo, que força o aplainamento dos tecidos superpostos. Os coreons reticular e papilar estão intensamente infiltrados e mostram acúmulos celulares de histiócitos e monócitos que se localizam mais acentuadamente em situação perivascular e perifolicular, propagando-se para os interstícios dos feixes musculares e do conjuntivo dérmico (fig. 34). Em torno do ponto de inoculação, o processo inflamatório toma dois aspectos diferentes, sem limites marcados e perfeitamente diferenciáveis: o granulomatoso banal e o específico. O primeiro constituído quase que exclusivamente por células redondas não apresenta aspecto específico, não obedece disposição especial e é difuso. Seus elementos celulares estão representados por linfócitos, monócitos e por macrófagos parasitados. Em outras partes, o aspecto difuso de infiltrado desaparece, e o granuloma apresenta formações nodulares (fig. 35), formados por grande número de células gigantes multinucleadas, e com disposição nuclear periférica, idêntica às do tipo Langhans.

Circundam-se as epitelióides e uma coroa não bem constituída de linfócitos. Porções há do mesmo tecido em que existem formações de aspecto nodular com células epitelioides e linfócitos na ausência de gigantócitos. A reação gigantocitária é bem intensa e sincícios celulares são encontrados nos emaranhados fibrilares do conjuntivo dérmico (fig. 36), no conjuntivo interfascicular dos músculos cutâneos (fig. 37) e no seio de agrupamentos de macrófagos parasitados (fig. 38). Nesta última localização os gigantócitos estão parasitados por leishmanias, e algumas, como em horas anteriores, dentro dos vacúolos e nem sempre em estado de degeneração.

Elementos mononucleares e granulócitos em pequeno número continuam a afluir através dos vasos sanguíneos, disseminando-se pelos tecidos e formando acúmulos perivasculares. As células endoteliais continuam intumescidas, sendo, porém, mais raras as figuras de divisão.

**DAS 336 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO** – Com o crescimento do tumor a compressão que se exerce, de baixo para cima, contra as camadas superiores dos tecidos, tende a comprimir a epiderme provocando o seu aplainamento, e, conseqüentemente, o desaparecimento das papilas dérmicas e anexos cutâneos (fig. 38 e 6). Macrófagos intensamente parasitados, alguns com várias dezenas de elementos, substituem os componentes normais da pele e invadem os

foliculos pilosos e, também, a epiderme, onde se reúnem em verdadeiros ninhos de parasitos, dentro de vacúolos, nos interstícios celulares, atingindo mesmo a superfície livre da pele (fig. 39). Neste estágio a epiderme, em geral, infiltrada por mononucleares amebóides, reage por acantoses profundas e formação de pérolas córneas no interior do tecido macrofágico (fig. 40).

Além dos macrófagos parasitados são, ainda, encontrados granulócitos neutrófilos, eosinófilos e plasmócitos difundidos pelos tecidos ou formando agrupamentos em torno dos vasos. Embora desordenadamente distribuídos, os macrófagos adotam, por vezes, uma situação radiada em torno dos capilares arteriais (fig. 41), e à medida que se afastam do vaso, tornam-se multinucleados e maiores, com dois ou mais núcleos. Não raro, tais elementos, além de leishmanias, fagocitam outros macrófagos parasitados os quais estão contidos dentro de grandes vacúolos no protoplasma do sincício.

Os linfáticos superficiais estão cheios de parasitos e macrófagos parasitados, em quase toda a sua extensão (fig. 42). Os capilares arteriais mostram, raramente, parasitos no interior vascular, mas não se observam elementos celulares parasitados. Decorre isso talvez da influência de qualquer artifício, pois os tecidos circundantes estão repletos de macrófagos parasitados e leishmanias livres, capazes de serem deslocados mecanicamente.

Nas lesões ulceradas se encontram numerosos parasitos no exsudato purulento, bem como nos tecidos, logo abaixo da ulceração, entre grandes quantidades de granulócitos neutrófilos e de células mononucleares amebóides.

## COMENTÁRIOS

No estudo experimental das leishmanioses, foi mister, em primeiro lugar, obter um animal que oferecesse quadro mórbido semelhante ao que se encontra nas infecções humanas, de maneira que permitisse o conhecimento e o estudo da patologia e da terapêutica da parasitose. Vários vertebrados menores foram utilizados para esse fim, CASH e HU (1927), porém nem todos se mostraram mais ou menos receptíveis às diferentes raças de leishmanias. Descoberto que o hamster (*Cricetus griseus*), por MELENEY (1924), era o ser mais apropriado para o estudo do kala-azar, muitos assuntos referentes à patologia da doença puderam ser elucidados, confirmando os trabalhos de

SHORT (1923); CHRISTOPHERS (1904); LAVERAN (1917); etc., pela comparação dos estudos histológicos do material oriundo do animal em apreço com os de outros animais de experimentação e com os do próprio homem. Pode averiguar-se que muitos fatos se repetiram com muita frequência, entre os quais as modificações processadas para o lado da pele. Assim, LAVERAN (1915), estudando a infecção experimental do camundongo branco, pela *L. tropica*, obteve um botão inicial, no ponto de inoculação, e, logo que o tumor atingiu certo grau de desenvolvimento, apareceram nas extremidades tegumentares e nas regiões periartríticas, verdadeiras metástases parasitárias, a produzir novas tumorações, que evoluíram tal como a do ponto de inoculação. A pele peritesticular foi sede, igualmente, de lesões do mesmo tipo, e o exame histológico revelou infiltração macrofágica do tecido conjuntivo, acarretando atrofia testicular com a compressão exercida sobre o órgão. GONTER citado por LAVERAN (1917) infectou o camundongo branco com *L. tropica*, utilizando a via endovenosa. Após o período de um a quatro meses, a pesquisa nos órgãos internos foi positiva. Mais tarde apareceram lesões cutâneas generalizadas, formando tumorações, localizadas na cauda, regiões periartríticas e extremidades cutâneas. Iguais resultados foram conseguidos no camundongo por PAVONI citado por LAVERAN (1917), por YOUNG e HERTIG (1928), no hamster, com *L. donovani*, e por HINDLE e THOMSON (1928) no hamster, com *L. infantum*. Nos hamster inoculados com *L. donovani* por YOUNG e HERTIG, no peritônio, as lesões apareceram bilateral e simetricamente na seguinte ordem:

- 1º) Tumores no carpo e tarso, estendendo-se posteriormente aos pés, incluindo os dedos;
- 2º) Tumores na metade posterior do escroto, nos machos, com ulceração subsequente; infiltração e alargamento do clitóris, nas fêmeas, excepcionalmente com ulceração do períneo.
- 3º) Infiltração e ulceração posterior da base da cauda;
- 4º) Tumores idênticos no nariz, raramente com ulceração;
- 5º) Tumores e ulceração nas margens das orelhas.

O cobáio, universalmente utilizado nos laboratórios de pesquisa, é visado de contínuo pela experimentação, que de há muito vem tentando infectá-lo pelas várias raças de leishmanias. A experiência, porém, demonstrou ser bem difícil nele o contágio. Poucos têm sido os pesquisadores que o conseguiram nesse animal.

LAVERAN e PETIT citados por LAVERAN (1917), mostraram que era possível produzir ligeiras infecções em cobáios, quando inoculados no peritônio com macerato de órgãos provenientes de animais com kala-azar, e que após o 50º dia de inoculação era possível reisolar os parasitos da cavidade peritoneal, em meio de Novy simplificado. Igualmente FRANCINI citado por LAVERAN (1917) injetando no peritônio de cobáio jovem cultura de *L. donovani*, verificou a infecção dos órgãos no 26º dia de inoculação. No entanto LAVERAN (1917) diz que os insucessos são em maior número, e refere aos trabalhos negativos de NICOLLE, NICOLLE e BLAIZOT, VISENTINI, ARCHIEBELD, além do próprio, em que obteve leve infecção. Mais recentemente GUPTA (1928) conseguiu infectar cobáios jovens com *L. donovani*, sem, entretanto produzir, lesões cutâneas. O mesmo autor, em 1928, utilizando-se de *L. tropica*, produziu-lhe um nódulo no ponto de inoculação, mas não lhe foi possível reisolar o parasito. Conseguiu, todavia, uma infecção generalizada, pois os esfregaços dos órgãos internos mostraram a presença de inúmeras leishmanias.

NINI e TRAMONTANO (1934) acham o cobáio nada ou pouco sensível à *L. tropica*, e a infecção por este parasito só se processa quando os elementos parasitários, retirados da lesão do doador, são abundantes e inoculados diretamente nos gânglios.

Os trabalhos destes autores confirmaram, em parte, os de LAVERAN (1917) que infectou o mesmo animal pela via testicular, e com a particularidade de que a infecção, rica em parasitos ficou limitada ao próprio testículo. Após o 50º dia estava este atrofiado, com poucas leishmanias, e revelava-se negativa a pesquisa nos demais órgãos, contrariamente aos achados de NINI e TRAMONTANO mediante inoculação intraganglionar. Referem-se eles ainda, a resultados negativos em experiências de inoculação com *L. tropica* levadas a cabo por NICOLE e MANCEAUX, WENYON, SILVA e ARAUJO. Igualmente KROUPINKOFF (1930) tentou a inoculação do cobáio com *L. tropica*

isolada de alguns casos da sua clínica particular, com resultados completamente negativos.

SAMUEL B. PESSÔA e M. PEREIRA BARRETO (1945) referem-se a resultados positivos conseguidos por FRANCHINI (1913) e AQUILA (1919) inoculando no cobáio, raça de *L. brasiliensis*. A. D. FRANCO DO AMARAL (1941) comenta as experiências de FRANCHINI feitas em 1913 parecendo fracos os resultados obtidos pelo autor, pois os parasitos desapareceram ao fim de pouco tempo. De igual maneira MAZZA, citado por A. D. FRANCO DO AMARAL (1941), obteve resultados negativos com a mesma inoculação.

A leishmaniose, em estudo, apresenta a particularidade de ser 100% infectante para o cobáio, seja qual for a via que se inoculem os parasitos, e estes por sua vez mostram grande afinidade com a pele onde produzem lesões que muito se assemelham às de outros animais inoculados com raças de *L. infantum*, *L. tropica* e *L. donovani*.

Os estudos a que se procedeu sobre as vias de inoculação nos cobaios, infectados com o parasito em apreço, puseram em relevo um dermatopismo bem acentuado e preferencialmente produzindo lesões tumorais infiltrativas nas extremidades distais e tegumentares (fig. 1, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17 e 18), idênticas às que acabamos de descrever. As lesões se assestam sempre, e depois de dois meses, em média, após a inoculação, nas pálpebras, nariz, orelhas, membros, períneo e mesmo conjuntivas. A princípio, a presença do nódulo é apenas perceptível pelo espessamento maior do tecido subcutâneo que, com o evolver, se torna mais palpável, fluente de início, e cada vez mais endurecido à medida que se processa a infiltração inflamatória. As punções exploradoras feitas em todas as tumorações revelaram sempre a presença de corpúsculos parasitários (fig. 3).

Nas orelhas, por exemplo, os processos infiltrativos podem aparecer inicialmente múltiplos, operando-se, em seguida, uma fusão entre os nódulos vizinhos, acarretando espessamento da parte e ulceração posterior, sem que este último fato constitua fenômeno constante. MILLS, MACHATTIE e CHADWICH (1930), em estudos feitos na pele de cães, em casos de botão do oriente, estão de acordo em que a ausência de pelos, nas partes descobertas da orelha, facilitaria a ação dos insetos hematófagos, portadores de leishmanias, favorecendo, assim, o aparecimento dos botões, cuja multiplicidade dão como o

resultado de reinfecções pelo inseto infectante, pela migração de macrófagos parasitados, a partir do foco primitivo e pela disseminação de parasitas pela via vasal.

A primeira hipótese é julgada improvável pelos próprios autores. Resta, por conseguinte, a migração macrofágica nos tecidos e a disseminação metastática dos parasitos.

STANKANELLI citado por KROUPNIKOFF (1930), admite a via linfática como responsável pelo aparecimento de lesões que se assestam à distância do foco primitivo e elucidaria, também, a questão das auto-inoculações. Trabalhos de autores brasileiros admitem a propagação metastática da *L. brasiliensis*.

Assim, CUNHA MOTTA e F. da FONSECA, citados por A. D. FRANCO DO AMARAL (1941), estão de acordo em que a auto-inoculação não seria a única forma de explicar o aparecimento das lesões nasais, hipótese reforçada pelo trabalho de VILLELA, PESTANA e PESSÔA (1940), que acharam infectada a mucosa nasal dos indivíduos isentos de ulcerações cutâneas e, por conseguinte ao abrigo de auto-inoculações. Neste caso *L. brasiliensis* teria predileção para a mucosa nasal, fato admitido por HARTUNG citado por A. D. FRANCO DO AMARAL (1941). De acordo com os resultados obtidos nas inoculações intraorgânicas, em cobaios com a leishmania em estudo, acreditamos que as duas últimas hipóteses, de MILLS, MACHATTIE e CHADWICH (1930) para explicar o aparecimento de nódulos múltiplos na leishmaniose trópica do cão, são perfeitamente viáveis uma vez que no caso dos cobaios, os parasitos já inoculados em lugares distantes do tecido cutâneo produziram, lesões tumorais idênticas às que se obtêm pela inoculação subcutânea. Julgamos se processe por efeito de uma propagação sanguínea ou linfática, SEI (1936), LAL e DOGRA (1933), porquanto, segundo mostra a fig. 42, que representa um corte de lesão na orelha de cobáio infectado pela via intraorgânica e apresentando tumores cutâneos, vasos linfáticos se acham trombosados por parasitos e células parasitíferas. Por outro lado, na análise histológica da evolução das lesões experimentais, é comum a presença de macrófagos parasitados em regiões muito distantes do ponto onde penetra a agulha de inoculação.

Sob o ponto de vista histológico, as lesões cutâneas do cobáio, inoculado pela via subcutânea, com suspensão parasitária, sofrem uma série de modificações no infiltrado inflamatório dérmico de

limites não bem determinados, e, que se sucedem desde o momento da inoculação, até o período de completo desenvolvimento do tumor parasitário. Este fato tem alguma semelhança com o referido por MONACELLI (1934) no estudo que fez em 22 casos de leishmaniose cutânea, onde se salienta que a mais notável característica dessas modificações é representada por gradual modificação do infiltrado dérmico, caracterizada, num primeiro tempo, por notável reação hiperplásica de elementos pertencentes ao S. R. E. que termina por se ordenar em nódulos de aspecto tuberculóide. De igual maneira, BOGLIOLO (1937), baseado em estudos de KYRLE, REENSTIERNA, MARIANE e FALCHI, divide as lesões produzidas pela *L. tropica* nos casos humanos de leishmaniose cutânea em três estados: granulomatoso banal, pretuberculoide e tuberculoide, os quais se sucedem em cada caso dessa afecção.

Até aos 15 minutos após a inoculação do cobáio, os fenômenos reacionais inflamatórios se limitam somente aos elementos normais do derma que se dividem e se mobilizam, infiltrando os tecidos circunvizinhos do ponto onde foram introduzidos os parasitos (fig. 20) e na direção dos mesmos. Esta fase é, entretanto, transitória, pois o quadro histopatológico dá lugar a outro com aspecto inflamatório agudo, aonde polimorfonucleares neutrófilos afluem, obliterando a luz dos vasos que, conjuntamente com poucas células linfocitárias, atravessam as paredes vasculares formando aglomerados em situação perivascular (fig. 21). Este quadro reacional coincide com os que se verificam pela inoculação de irritantes assépticos, e está de acordo com as experimentações de REY (1943). A atividade fagocitária dos neutrófilos é bem sensível, principalmente no ponto de inoculação, onde os parasitos são rodeados por esses elementos, sendo que alguns deles mostram leishmanias fagocitadas em estado de degeneração. Entretanto, parece que os neutrófilos não tem senão relativa capacidade, para destruir os parasitos, talvez devido à grande quantidade de elementos injetados, e por se encontrarem leishmanias no protoplasma de células mononucleares, com características macrofágicas, poucos minutos após a inoculação, nas quais se albergariam, encontrando lugar propício para a reprodução, e, ao mesmo tempo, abrigo contra os ataques de células e substâncias de defesa. Os parasitos, uma vez fagocitados pelas células monocitóides, parece se reproduzirem no

interior das mesmas porque foi raro, a princípio, encontrar-se ditas células contendo mais de dois parasitos e à medida que elas aumentam de volume maior quantidade de elementos parasitários são observados em situação intraprotoplasmática (fig. 3, 4, e 5). Os parasitos, uma vez fagocitados, mantêm, por assim dizer, verdadeiro estado de simbiose, agindo tão somente por ação mecânica, sem perturbar, a princípio, as faculdades vitais da célula hospedeira. De outra maneira, não seria possível admitir a presença de macrófagos parasitados em lugares afastados dos vasos e do ponto de inoculação (fig. 6 e 39), o que seria negar-lhes a propriedade infiltrativa. É bem de ver que a formação de macrófagos deverá ter início com a mobilização celular e desde os princípios do processo inflamatório, MONACELLI (1934). Entretanto, não foi encontrado grande número de elementos mononucleares em mitose, que justificasse a presença abundante de macrófagos nas 24 horas da inoculação. Para TALIAFERRO e BLOOM (1945), 90% dos elementos macrófagos são derivados diretos de mononucleares hematógenos, que afluem desde os primeiros momentos em que se inicia o processo inflamatório. A fase que se segue (fig. 24, 31 e 32) muito se assemelha à descrita por MONACELLI (1934) e catalogada por ele como estágio inicial da leishmaniose cutânea por *L. tropica*. No cobáio, precede-a um estado reacional relacionado com os fenômenos naturais da imunidade, TALIAFERRO e BLOOM (1945).

A esse estado, agudamente inflamatório, segue-se outro, caracterizado pelo predomínio de elementos redondos, linfócitos e monocitóides, onde os neutrófilos praticamente desaparecem ou estão em grande minoria. Define-o ainda um granuloma sem especificidade histológica, difuso, cujos processos de infiltração reacional continuam ativos e em maior extensão (fig. 2, 31 e 32). O avanço celular se estende mais, atingindo o tecido gorduroso, que apresenta leve grau de fibrose (fig. 30) e onde se esboçam formações gigantocitárias (fig. 43). Por outro lado, a infiltração interessa também as camadas superficiais da pele, insinuando-se nas papilas dérmicas e envolvendo assim os folículos pilosos com as glândulas sebáceas. As formas de divisão entre os elementos celulares do infiltrado são comuns, vendo-se em multiplicação, células adventícias, linfócitos, monocitóides e fibrócitos. O estímulo inflamatório alcança mais os endotélios vasculares, que, muito cedo, reagem por

hipertrofia e divisão celular (fig. 23, 25, 26, 27 e 28), não tendo sido possível observar qualquer transformação macrofágica ou fagocitária nos ditos elementos, ainda nos vasos que atravessam regiões ricas em parasitos. Quando as lesões atingem as 336 horas de evolução, o granuloma adquire a característica de maior especificidade, e muito se assemelha às lesões produzidas pelo bacilo de Koch (fig. 35 e 36). Não acusa nunca os fenômenos de necrose caseosa, e os seus elementos constituintes não guardam uma disposição tipicamente tuberculosa. BOGLIOLO (1937) e REDAELLI (1943), que trataram do assunto, por sinal, estão de acordo em que não existe uma semelhança estreita entre as lesões produzidas pelo bacilo da tuberculose e as da leishmaniose cutânea, produzidas pela *L. tropica*.

Interessante é notar que, na leishmaniose cutânea do cobáio, as reações tuberculóides aparecem num tempo relativamente próximo da época da inoculação, contrariamente ao que se observa no botão do oriente, KYRLE e REENSTIERNA, citados por KROUPNIKOFF (1925), onde as estruturas tuberculóides são encontradas em casos de evolução longa. Ainda, segundo aqueles autores, as formações tuberculóides representariam complexo de defesa organizado num terreno que se tornou alérgico para os parasitos. Tem isso fundamento, segundo DUPOND (1930), na teoria de LEWANDOWSKI, no que concerne à tuberculose. Sabe-se que para este autor uma fase de inflamação banal precederia sempre a formação de folículos tuberculosos típicos. Esta fase, chamada pelos alemães de produtiva, exigiria para sua formação certo grau de imunização do animal em face do agente patogênico, e teria por finalidade a eliminação do mesmo. Por conseguinte, de acordo com os achados nos cobáios, o aparecimento da fase tuberculóide não estaria relacionado simplesmente com a duração evolutiva das lesões, conforme KYRLE e REENSTIERNA, citados por KROUPNIKOFF (1925), mas diretamente ligado ao período que dura para a sensibilização do animal.

Quando o tumor se desenvolve e cresce, o aspecto histológico da lesão se modifica completamente, desaparecendo todos os característicos das faces anteriores, e se mostra, estruturalmente, constituído de grandes macrófagos, mono e multinucleados (fig. 44), todos parasitados por grande número de leishmanias, infiltrando desordenadamente o tecido e substituindo-o de todo. A começar desse momento, a epiderme que

permaneceu normal durante todo o período da evolução, começa a sofrer modificações acarretadas pela compressão do tumor subjacente. As referidas modificações se refletem sobre o corpo mucoso de Malpighi, que se aplaina, reagindo, às vezes, por acantose (fig. 33, 40 e 45) e hiperqueratose, sendo comuns as formações córneas no interior do tecido macrofágico. Os anexos cutâneos desaparecem completamente, atrofiados pelo crescimento infiltrativo e compressivo do tumor. Este age por compressão, de baixo para cima, e, depois, lateralmente, compelindo para os lados e para cima, os tecidos circunvizinhos, que nas primeiras horas tomam o aspecto de cápsula fibrosa. O quadro citológico está na sua maioria representado por enormes macrófagos parasitados com um ou vários núcleos, protoplasma grande e claro; núcleos vacuolados com rede cromática bem corados, um ou dois nucléolos basófilos e condensação cromática na membrana nuclear. A fagocitose é intensa e toda limitada aos macrófagos, que apresentam no protoplasma numerosíssimos parasitos, podendo ainda conter outros macrófagos parasitados no interior de grandes vacúolos. Tem sido possível verificar que muitos parasitas estão contidos dentro de vacúolos (fig. 38) e na maioria das vezes não se apresentam degenerados, o que está de acordo com o conhecido conceito de que é possível o estado simbiótico entre eles e a célula hospedeira. Entre tais elementos, que constituem o corpo tumoral, se encontram outros em menor quantidade, como os neutrófilos, os mononucleares amebóides e os plasmócitos, em número maior que nos estádios anteriores do processo, formando ninhos celulares no tecido macrofágico e acumulando-se em torno dos vasos. Não nos foi dado verificar figuras de mitose entre as células parasitíferas, coisa que somente teve lugar entre os macrófagos livres de leishmanias. Embora disseminados pelo campo, os macrófagos parasitados guardam em algumas partes da lesão uma disposição radiada (fig. 40) em torno dos vasos, CASH e HU (1927), idêntica às que se encontram nas primeiras horas da inoculação, época da diapedese dos mononucleares. O tecido macrofágico chega às camadas subepidérmicas, onde os macrófagos parasitados penetram no corpo mucoso de Malpighi e aí formam ninhos nas várias camadas, atingindo a superfície livre da pele (fig. 6 e 39). NINNI e TRAMONTANO (1934) julgam o revestimento cutâneo, como as mucosas, uma via de eliminação dos parasitos nos animais

menos receptíveis ou a caminho da cura. Entretanto, no caso vertente, os parasitos são encontrados, constantemente, nas camadas epidérmicas muito antes de se ter esboçado qualquer princípio que indicasse regressão do tumor parasitário. A alopecia, tão característica e constante nos cães com leishmaniose, não esteve presente nos cobaios observados por nós, embora a fragilidade capilar nos tenha chamado a atenção, desde os primeiros ensaios da infecção experimental com o parasito em estudo. A queda do pelo foi assinalada por YAKIMOFF (1911), por KOHL (1911), em Tunis; por YAKIMOFF (1915) no Turkestão, e por CUNHA (1938), no Brasil, citados por C. M. TORRES (1941). ADLER e THEODOR, citados por C. M. TORRES (1941) se referem à penetração de células infiltrativas nos folículos pilosos e nas glândulas sebáceas e à presença de macrófagos no derma normal de cães atacados de leishmaniose. Na parasitose do cobáio, observaram-se iguais quadros histopatológicos, com a particularidade de que os folículos pilosos e os bulbos capilares estão aqui invadidos por macrófagos parasitados (fig. 46).

Revisando a evolução das lesões cutâneas na leishmaniose do cobáio, podemos dividi-las em quatro fases principais que se sucedem, sem haver, entre uma e outra, limite certo que as distinga, a não ser quando têm lugar as mudanças típicas dos quadros histopatológicos. Mostram, por conseguinte, uma série de modificações, já descritas, em parte, por BOGLIOLO (1937), MONACELLI (1934), KROUPNIKOFF (1925), etc. Parece tratar-se da série completa de transformações por que passam as lesões na leishmaniose cutânea. Assim sendo, as modificações iniciar-se-iam por uma fase inflamatória aguda, onde preponderam os fenômenos de exsudação e infiltração, lentos a princípio, e a pouco e pouco mais intensas depois. A começar das vinte e quatro horas, instala-se a fase granulomatosa comum, constituída por um infiltrado de células redondas, difuso e sem características de especificidade, que se prolonga até 336 horas, em média, dando lugar à fase tuberculóide, onde a estrutura lembra as lesões produzidas pelo bacilo da tuberculose. Finalmente, se processa a substituição dos infiltrados por grandes células macrófagas parasitadas, modificando, completamente, o quadro anatomo-patológico da lesão e constituindo a fase macrófaga (fig. 47).

## CONCLUSÕES

- 1) Existe uma raça de leishmania ou uma variante adaptada capaz de infectar natural e experimentalmente o cobáio.
- 2) A leishmania de cobáio tem um tropismo marcado para a pele, onde, de preferência, nas extremidades tegumentares e regiões periartríticas, produz lesões tumorais infiltrativas, que tendem sempre a aumentar e geralmente necrosam.
- 3) As preparações, a fresco, do material obtido por punção dos tumores, em mistura com uma gota da solução original de Giemsa, permitem boa observação dos parasitos.
- 4) A leishmania do cobáio pode ser reisolada do baço, fígado, suprarrenal, medula óssea, gânglios linfáticos, sangue e lesões tumorais em meio N. N. N., onde se obtém boa proliferação de formas flageladas, a começar do terceiro dia de inoculação, na temperatura ambiente.
- 5) A leishmania do cobáio mostrou ser 100% infectante nesse animal.
- 6) Os cobaios são infectados pela leishmania em estudo, quando inoculados pelas vias subcutâneas, intraperitoneal, intraesplênica, intramedular, endovenosa, etc., e a generalização se faz naturalmente, sem qualquer artifício.
- 7) O baço e os gânglios linfáticos são os órgãos que, por hipertrofia acentuada, melhor exteriorizam as reações quando se processa a infecção generalizada.
- 8) O cobáio infectado reproduz os mesmos quadros anatomo-patológicos que se observam nos cães, hamsters e camundongos, quando inoculados com *L. donovani*, *L. infantum*, e muito se aproximam aos produzidos pela *L. tropica*.
- 9) Os linfáticos constituem no cobáio uma das vias de disseminação do parasito.
- 10) Na evolução das lesões cutâneas do cobáio infectado, sobrevém, quatro fases distintas sem limites precisos, que se sucedem até a evolução completa da lesão tumoral.
- 11) A evolução das lesões cutâneas passa, primeiramente, por fase inflamatória aguda, transformando-se a seguir, em granulomatosa, tuberculóide e por fim macrófaga.
- 12) As lesões cutâneas produzidas nos cobaios pela leishmania em estudo, constam de infiltração do derma por células mononucleadas e granulócitos oriundos do sangue, além de células originadas no próprio tecido por multiplicação "in loco".

13) Os macrófagos, a princípio pouco parasitados, tornam-se repletos de parasitos, e podem ser encontrados em lugares distantes do ponto de inoculação, como também formam ninhos parasitários no interior da epiderme por vezes bem próximos da superfície livre da pele.

14) O endotélio dos vasos sanguíneos arteriais, reage, desde muito cedo, dividindo suas células, nenhuma sendo vista parasitada por leishmania, ainda nos vasos que atravessam os tumores leishmanióticos.

## REFERÊNCIAS

- BOGLIOLO, L. (1937), Studi delle leishmaniosi – IX Sull'istologia patologia della leishmaniosi cutânea. *Revista di Parasitologia*, **1** (3) : 221-258.
- CASH, J. R. e HU, C. H. (1927), Demonstration of *Leishmania donovani* in the skin and subcutaneous tissue of patients: possible relation to the transmission of the disease. *Journ. Am. Med. Assoc.*, **89** (19) : 1576-1577.
- CHRISTOPHERS, S. R. (1904), On a parasite found in persons suffering from enlargement of spleen in India. *Scient. Mem. Office. Med. Sanit. India*, (8-11).
- CHUNG, H. L.; HOEPLI, R. e FENG, L. S. (1940), Histopathological observations in twelve cases of canine leishmaniasis in Peiping. *Chinese Medical Journal*, **supl. 3** : 212-223.
- GRAIG, C. F. (1942), Laboratory diagnosis of Protozoan Diseases. Lea & Febiger, Philadelphia.
- CULBERTSON, J. T. (1942), Medical Parasitology. N. Y. Morningside Heights. Columbia University Press.
- DUPOND, A. K. (1930), Un cas de Bouton d'Orient a structure de sarcoïde de Boeck. *An. de Derm. et Syph*, **1** : 453-461.
- FRANCO DO AMARAL, A. D. (1941), Contribuição para o estudo da inoculação experimental da *Leishmania brasiliensis*. *An. Fac. Med. Univers. S. Paulo*, **17** (1) : 303-355.
- GUPTA, B. M. (1928), The experimental transmission of Oriental sore (causing generalised infection) in laboratory animals. *Far East Assoc. Trop. Med. Trans.*, 7<sup>th</sup> Cong. Brit. India, **3** : 34-35.
- HINDLE, T. e THOMSON, J. G. (1928), *Leishmania infantum* in Chinese hamsters. *Proc. Roy. Soc.*, **103 B** : 252.
- KUROTCKIN, T. J. e CHUNG, H. L. (1930), Kala-azar infection as a biological method of blocking the Reticulo Endotelial System. *National Medical Journal of China*, **16** : 43-49.
- KROUPNIKOFF (1925), Quelques details sur la clinique et histology du bouton d'Orient. *Rev. Franc. de Derm. et Venereol.*, **1** : 651-679.
- LAL, S. e DOGRA, J. R. (1933), Spread of cutaneous leishmaniosis along lymphatics. *Ind. Med. Gazette*, **68** (11) : 626.
- LAVERAN, A. (1915), Nouvelle contribution a l'étude des infections experimentales de la souris par la leishmaniosis tropica. *Bull. Soc. Pathol. Exotique*, **8** (6) : 363-369.
- LAVERAN, A. (1917), "Leishmanioses". Paris, Mason et Cie.
- LINTON, R. W. (1929), R. E. S. In protozoan infection. *Arch. of Pathol.*, **8** : 488-501.
- MELENEY, H. E. (1924), The histopathology of kala-azar in hamster, monkeys and man. *Am. Jour. of Pathology*, (1) : 147-168.
- MILLS, E. A.; MACHATTIE, C. A. e CHADWICK, C. R. (1930), The histopathology of oriental sore with special reference to its natural occurrence in dog. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **24** (1) : 67-74.
- MONACELLI, M. (1934), Sull'istologia della leishmaniosi cutanea - Boll. e Atti. Reale. *Acad. Med. Roma*, **60** : 73-76.
- NINNI, C. e TRAMONTANO, V. (1934), Transmission de a leishmaniose tropical au cobage. *Soc. Inter. Microb. Boll., Dez. Ital.*, **6** (9) : 338-343.
- PEREIRA, C. e MEDINA, H. (1945), Viragem da coloração por uma laça férrea da hemateína pela prata amoniaca para o estudo das leishmanias, principalmente nos tecidos. *Arquivos do Instituto Biológico*, **16** : 41-48.
- PESSÔA, S. e PEREIRA BARRETO, M. (1945), Sobre a validade da "*Leishmania brasiliensis*" – Vianna, 1911. *Revista Clínica de São Paulo (separata)*, **18** (4) : 117-129.
- REDAELLI, P. (1943), Sul quadro istopatologico del Bouton d'Orient. *Boll. Soc. Medico Cirurgica di Catania*, **2** : 142.
- REY, H. (1943), Cellular reaction in the dermal connective tissue of hamster to *L. brasiliensis*. *Journ. Infec. Dis.*, **72** : 117-124.
- SEI, M. T. (1936), Path. Anat. & dath. hist. of kala-azar. *Journ. of Oriental Medicine*, **24** (2) : 15-16.
- SHORT, H. E. (1923), The pathology of acute experimental kala-azar in monkeys. *Ind. Journ. Med. Res.*, **2** : 186-194.
- TALIAFERRO, W. H. e BLOOM, W. (1945), Inflammatory reactions in the skin of normal and immune canaries and monkeys after the local injections of malarial blood. *Journ. Dis.*, **77** (2) : 108-138.
- TORRES, C. M. (1941), Alterações cutâneas do cão no Kala-azar sul-americano. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **36** (1) : 37-67.
- VILLELA, F.; PESTANA, B. R. e PESSÔA, S. B. (1940), Presença de "*Leishmania brasiliensis*" na mucosa nasal sem lesão aparente, em casos recentes de leishmaniose cutânea. *Arquivos de Hig. e Saúde Pública*, **5** (9) : 21-30.

YOUNG, C. W. e MARSHALL, H. (1928),  
Peripheral lesion produced by *Leishmania donovani*  
and allied organismus. *Far East Assoc. Trop. Med.*,  
7<sup>th</sup> Cong. India, **3** : 87-88.

## **FIGURAS**

**1 a 47**

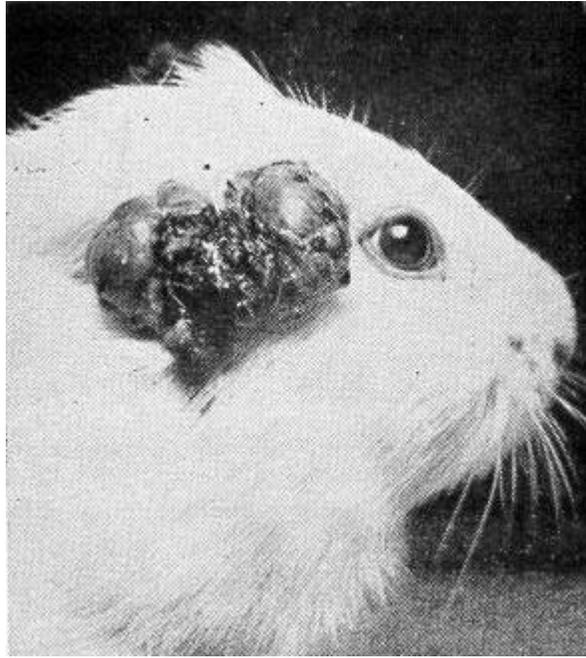


Fig. 1 – Primeiro cobáio espontaneamente infectado apresentando lesão tumoral na superfície externa do pavilhão auricular direito. Original.

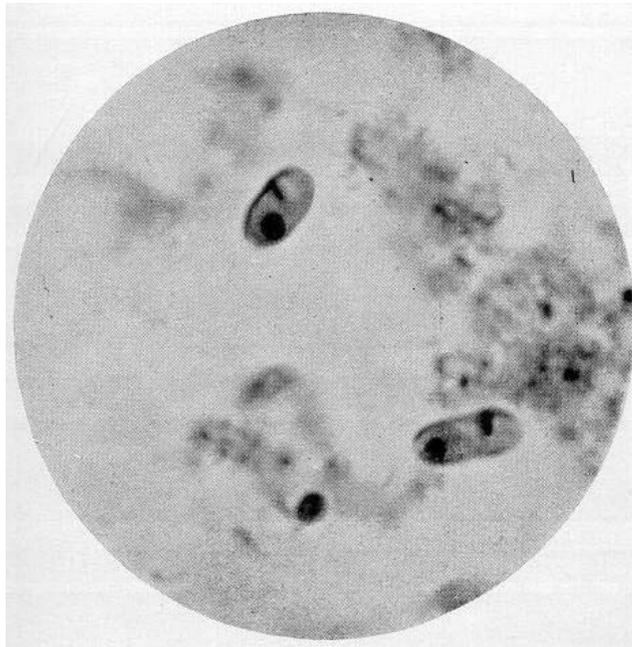


Fig. 2 – Corpúsculos de Leishman-Donovani corados, em preparação a fresco, com uma gota da solução de Giemsa. Original. Sobanski, fot.

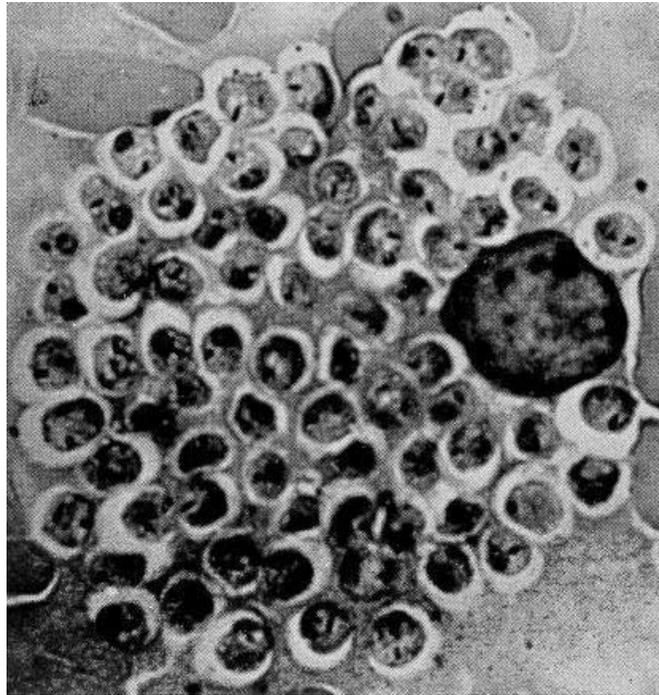


Fig. 3 – Esfregaço de material colhido por raspagem de tumor, fixado pelo líquido de Heidenheim e corado pelo May-Grunwald-Giemsa. Macrófago parasitado. Original. Sobanski, fot.

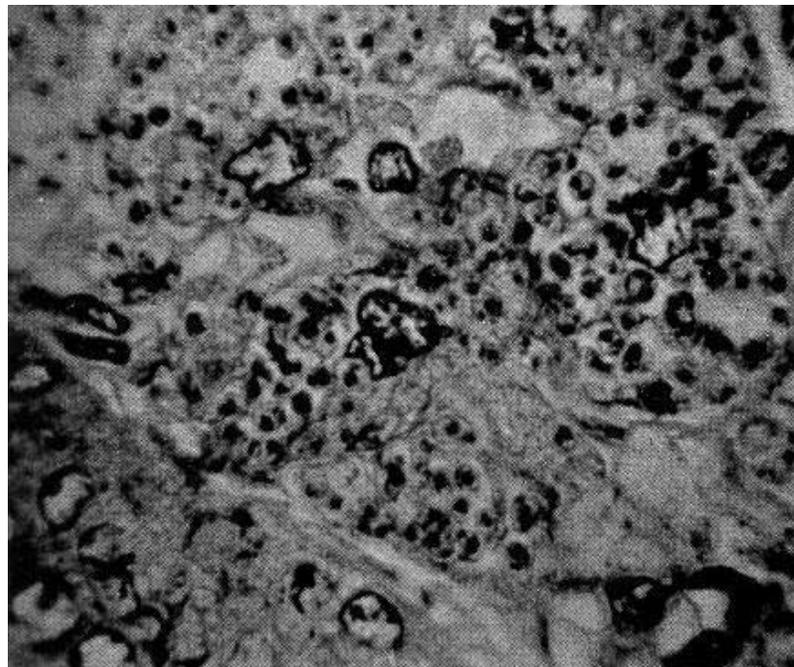


Fig. 4 – Corte de lesão tumoral corado pela hematoxilina-eosina mostrando macrófagos parasitados. Original.

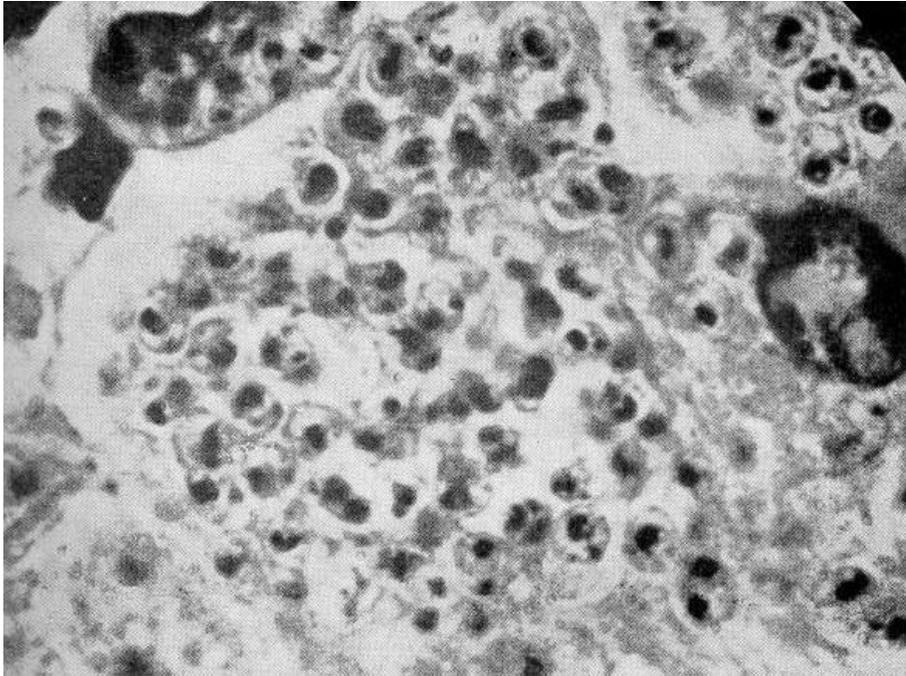


Fig. 5 – Macrófago parasito. Coloração pela laca férrea da hematoxilina e impregnação argêntica. Original. Federman, fot.



Fig. 6 – Corte de tumor do nariz mostrando macrófagos parasitados e ninho parasitário no interior do corpo mucoso de Malpighi. Col. Hematoxilina-eosina. Original, Sobanski, fot.



Fig. 7 – Primeira reprodução experimental da lesão tumoral leishmaniótica. Original.

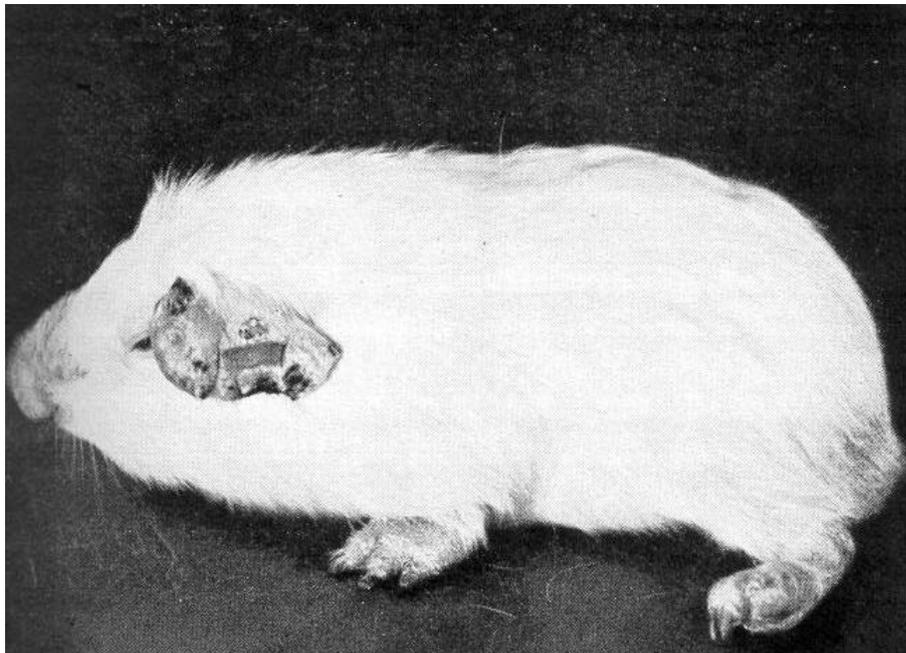


Fig. 8 – Cobáio infectado experimentalmente mostrando lesões tumorais nas zonas periarticulares, orelhas e nariz. Original. Mazza, fot.



Fig. 9 – Lesão tumoral ulcerada e recoberta por inducto crostoso sanguíneo. Original. Conte, fot.



Fig. 10 – Lesão tumoral muito desenvolvida e não ulcerada. Original. Conte, fot.

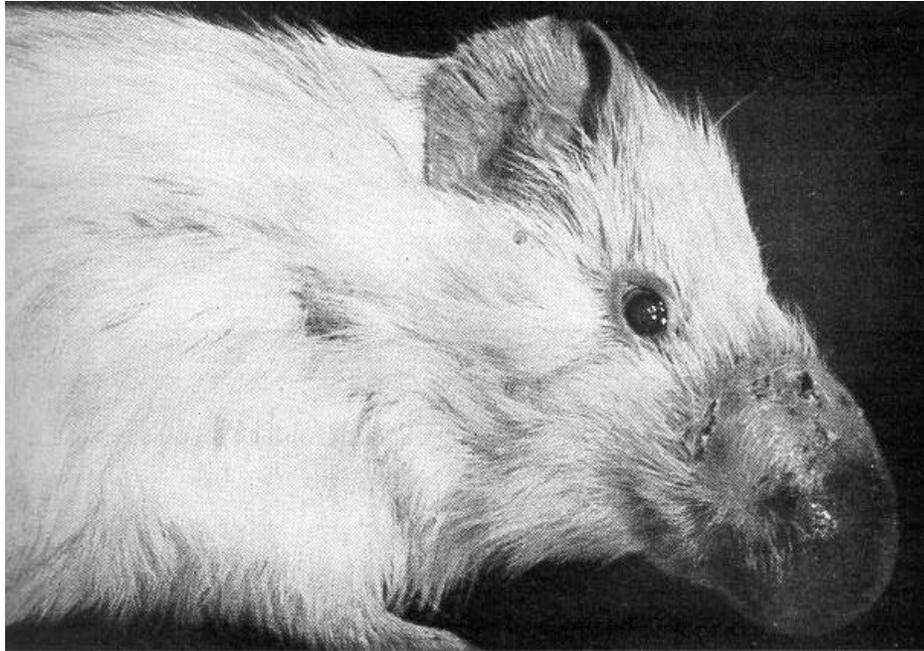


Fig. 11 – Outro aspecto do mesmo cobáio da fig. 10. Original. Conte, fot.



Fig. 12 – Cobáio infectado experimentalmente mostrando lesões tumorais nas regiões periarticulares, nariz, períneo e orelhas. Original. Mazza, fot.



Fig. 13 – Cobáio infectado experimentalmente mostrando generalizações tumorais. Original. Mazza, fot.



Fig. 14 – Cobáio infectado experimentalmente mostrando lesões tumorais nas regiões periarticulares, orelhas, pálpebras, nariz e pele peritesticular. Original. Federman, fot.

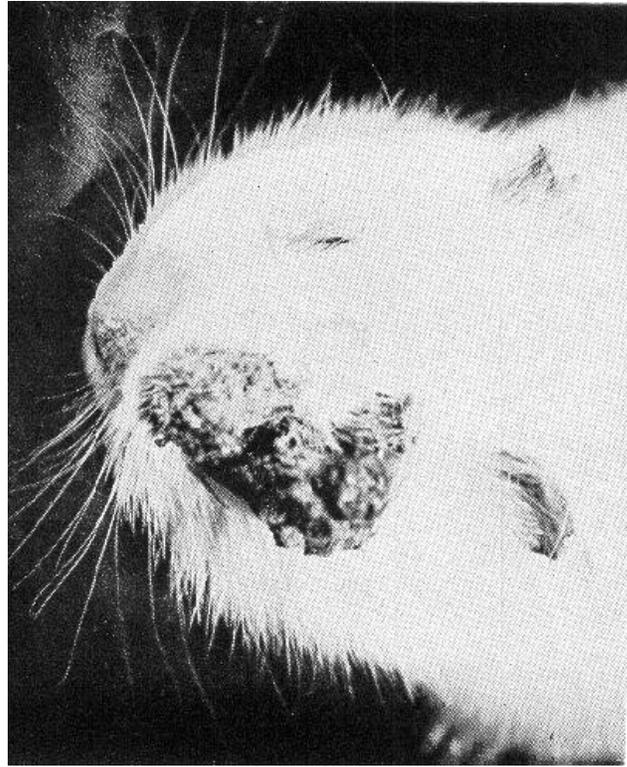


Fig. 15 – Lesão tumoral crostosa da pálpebra superior esquerda.  
Original. Sobanski, fot.

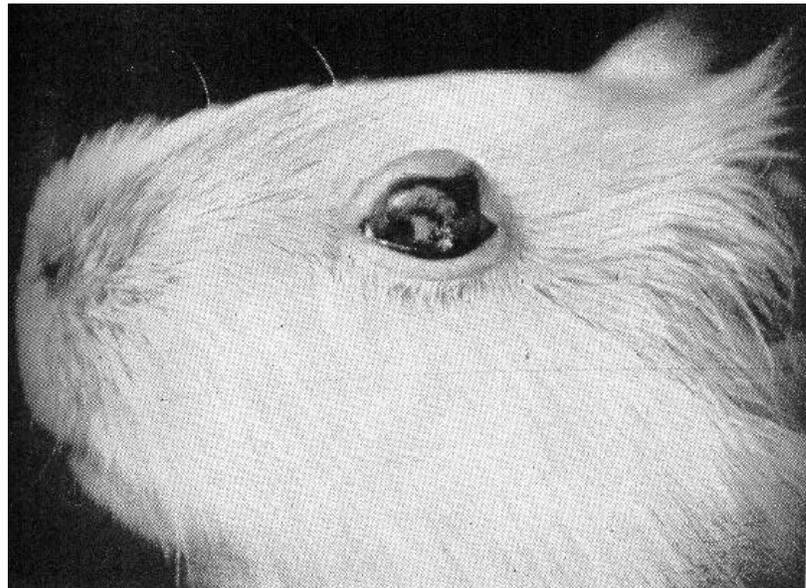


Fig. 16 – Lesão infiltrativa da mucosa conjuntival esquerda e  
opacificação da córnea transparente. Original. Conte, fot.



Fig. 17 – Lesão tumoral periarticular. Original. Federman, fot.

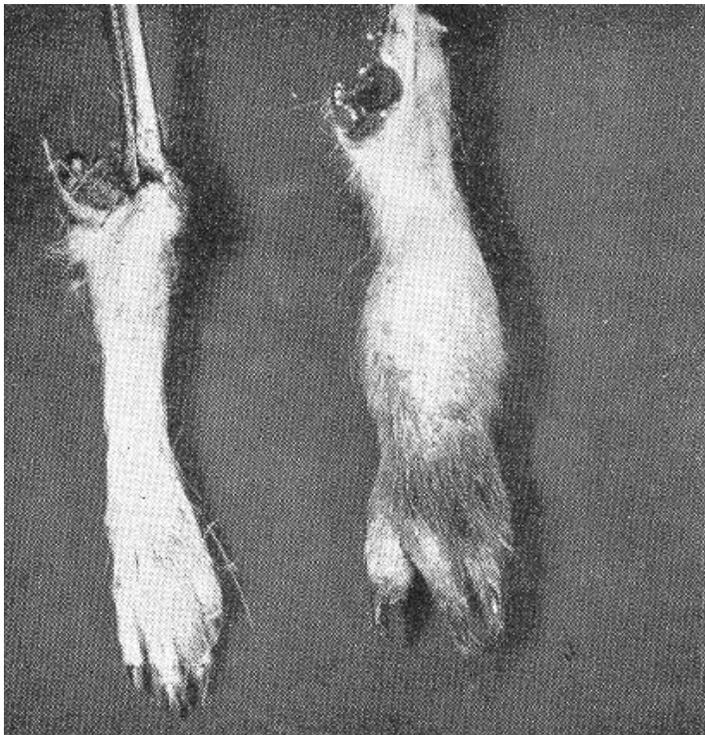


Fig. 18 – Lesão tumoral periarticular. Original. Sobanski, fot.

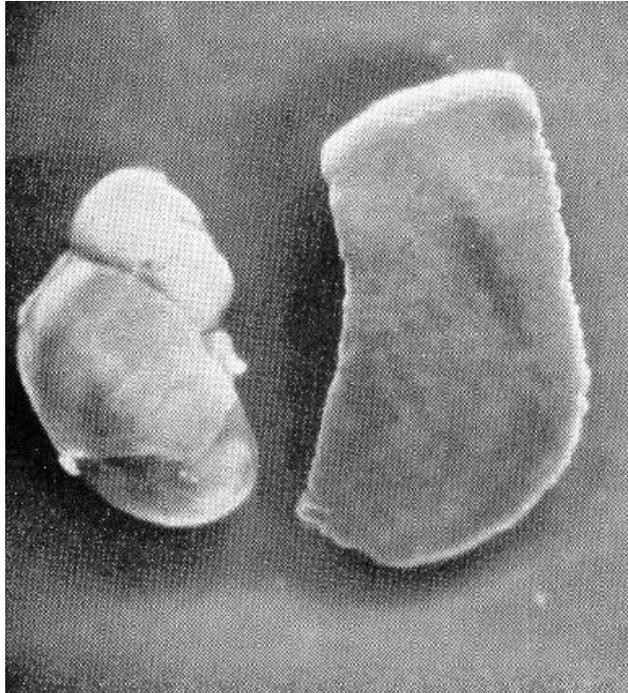


Fig. 19 – Esplenomegalia de cobáio apresentando infecção generalizada. Original. Conte, fot.

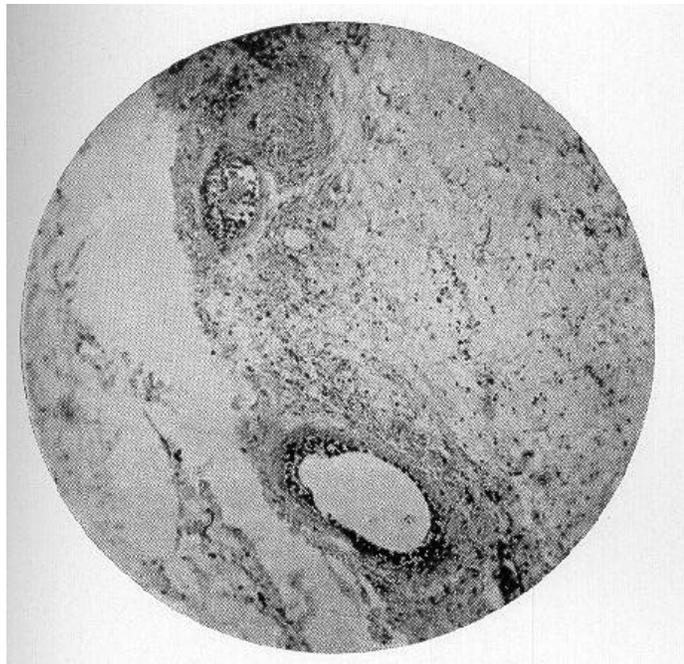


Fig. 20 – 15 minutos após a inoculação. Granulócitos e mononucleares em diapedese. Original. Sobanski, fot.

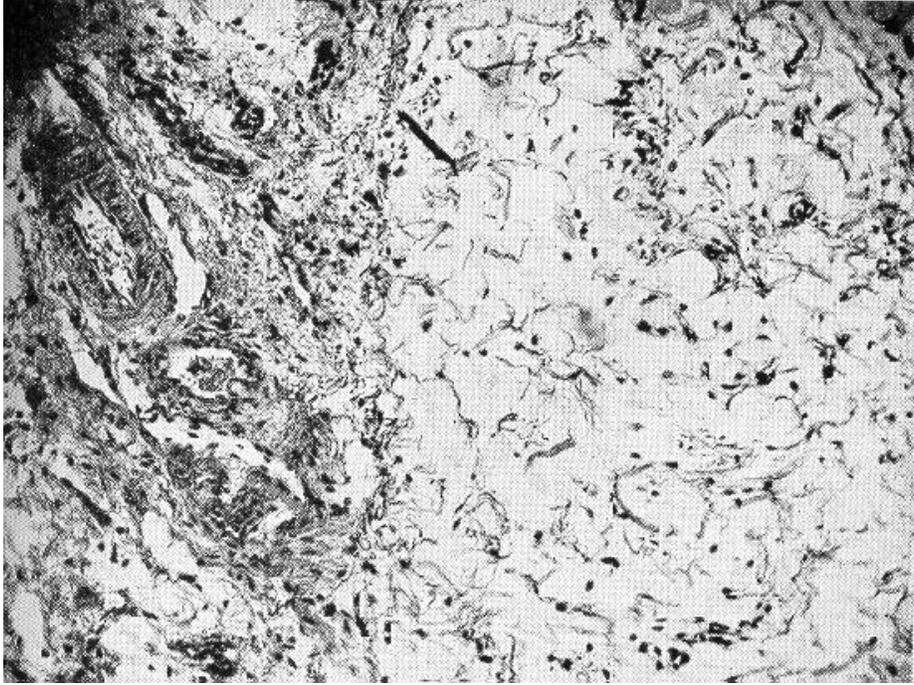


Fig. 21 – 15 minutos após a inoculação. Mobilização histiocitária, infiltração celular interfolicular. Vasos contendo inúmeros granulócitos neutrófilos e mononucleares em ativa diapedese. Início dos fenômenos infiltrativos dos tecidos. Original. Sobanski, fot.

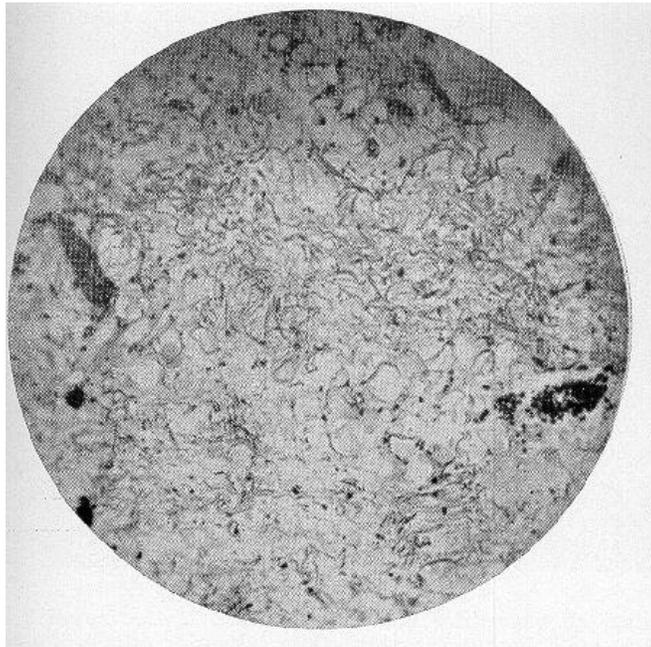


Fig. 22 – Outro aspecto da fase inicial inflamatória. Original. Sobanski, fot.

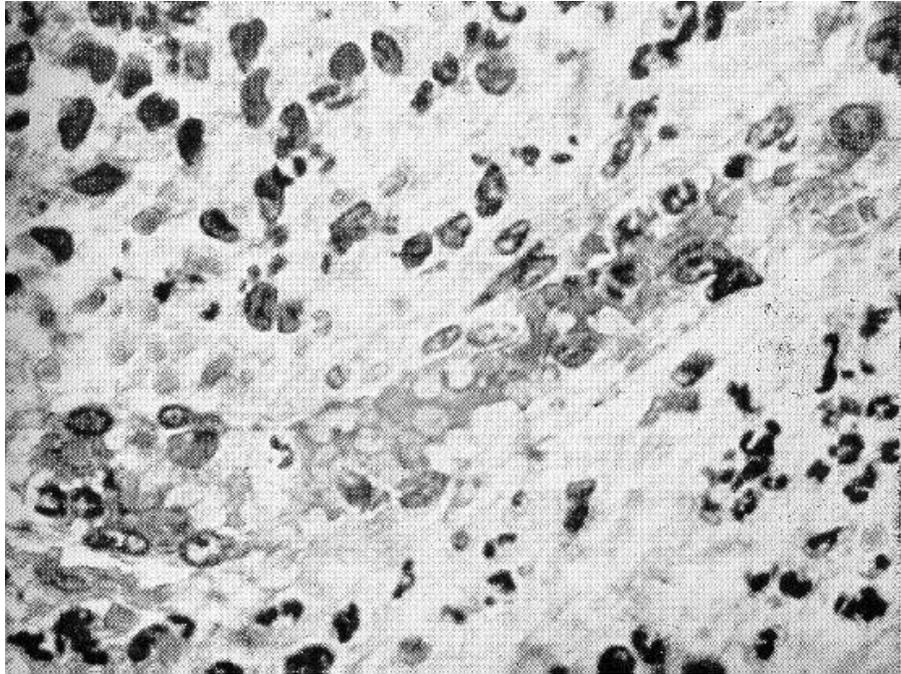


Fig. 23 – Capilar arterial mostrando hipertrofia das células endoteliais.  
Original. Sobanski, fot.

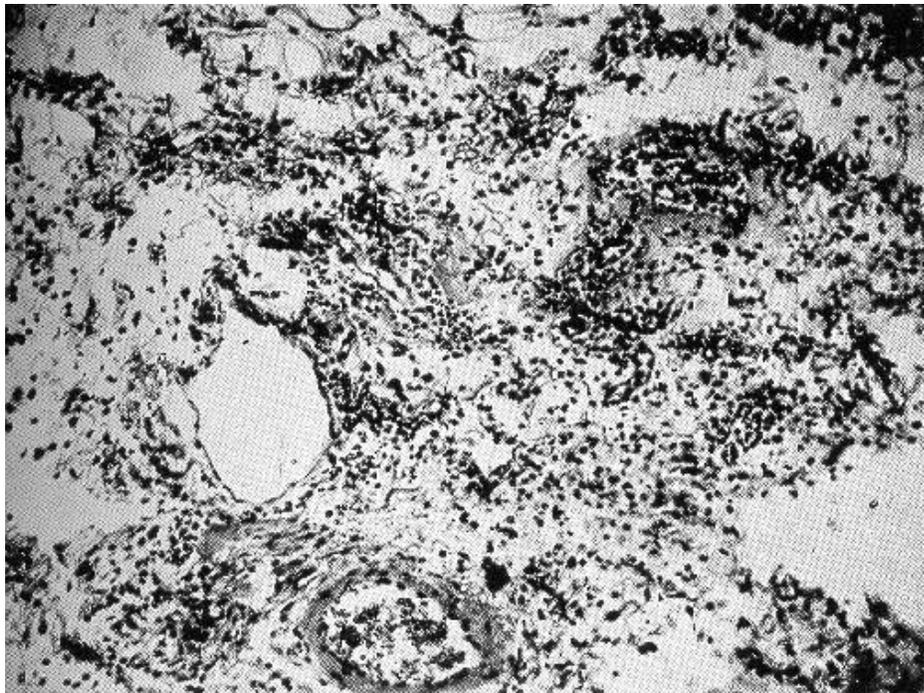


Fig. 24 – 6 horas após a inoculação. Nítida infiltração de granulócitos  
neutrófilos e células redondas monocitóides. Original.  
Sobanski, fot.

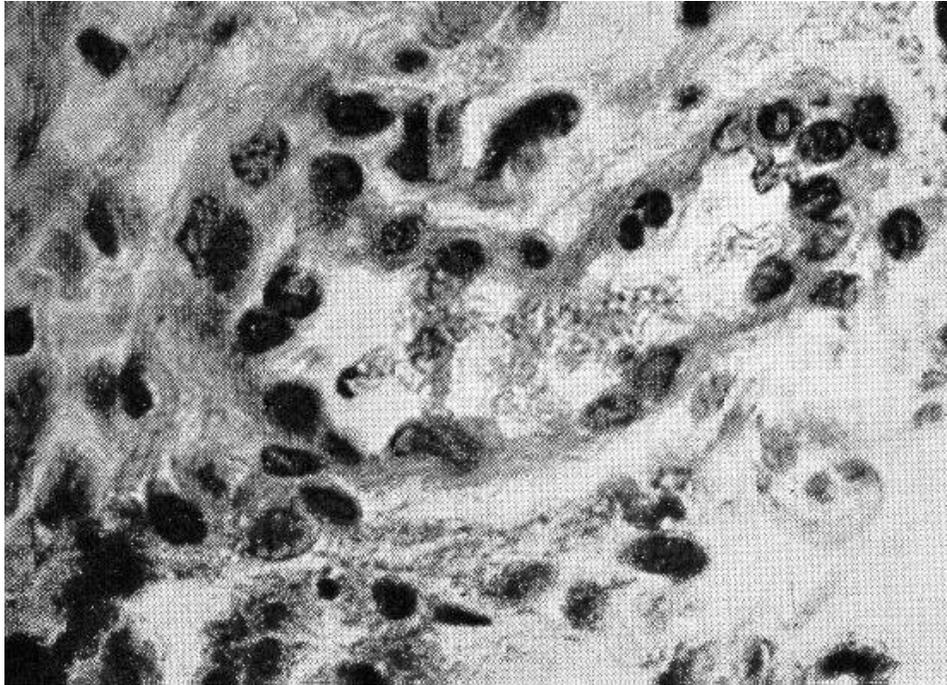


Fig. 25 – Vaso sanguíneo arterial mostrando intumescimento endotelial e células em mitose. Original. Sobanski, fot.

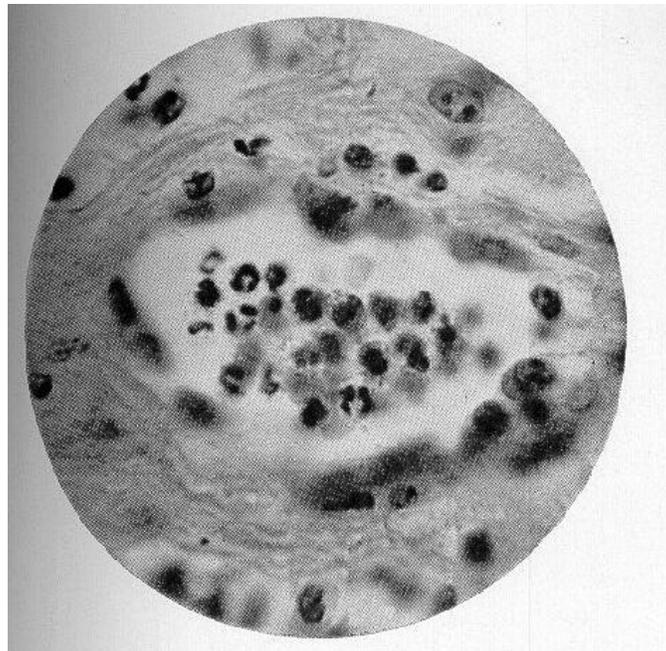


Fig. 26 – Capilar com células endoteliais intumescidas e acúmulo de granulócitos no interior do vaso. Original. Sobanski, fot.

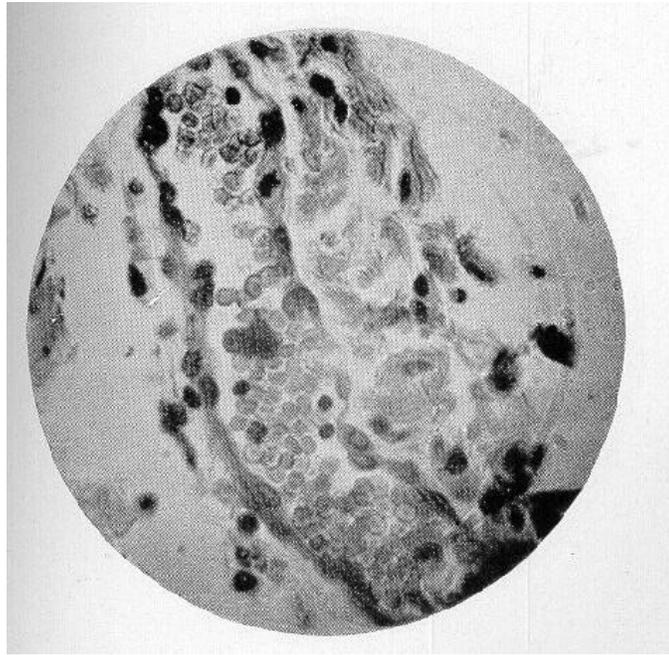


Fig. 27 – Capilar com células endoteliais intumescidas e figuras de mitose. Original. Sobanski, fot.

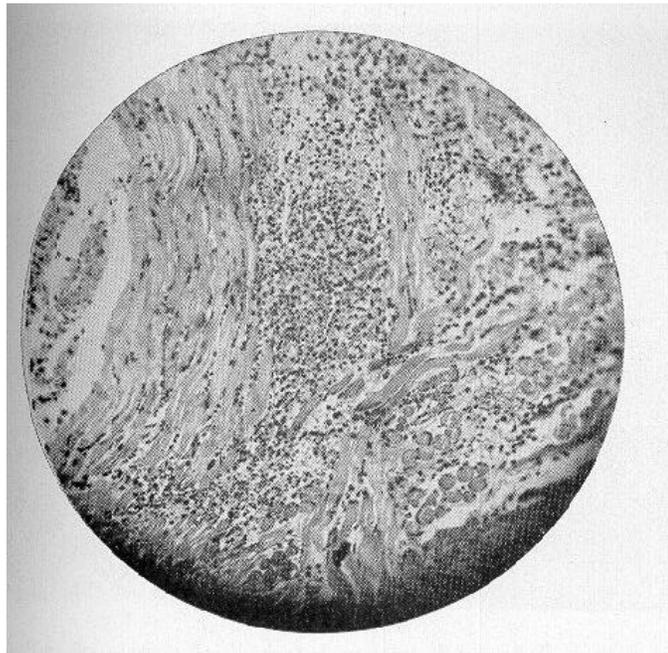


Fig. 28 – Neutrófilos e células monocitóides infiltrando os espaços interfibrilares do conjuntivo e dos feixes musculares. Original. Sobanski, fot.

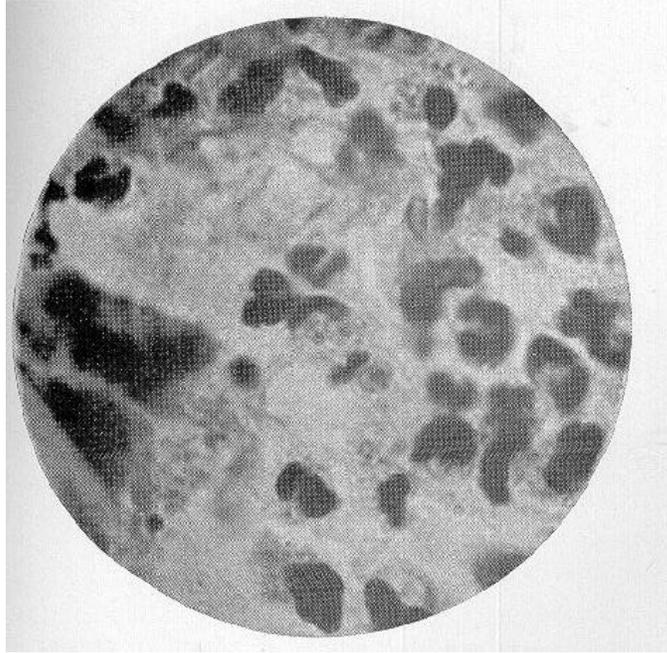


Fig. 29 – Granulócitos neutrófilos fagocitando corpúsculos de Leishman. Original. Sobanski, fot.

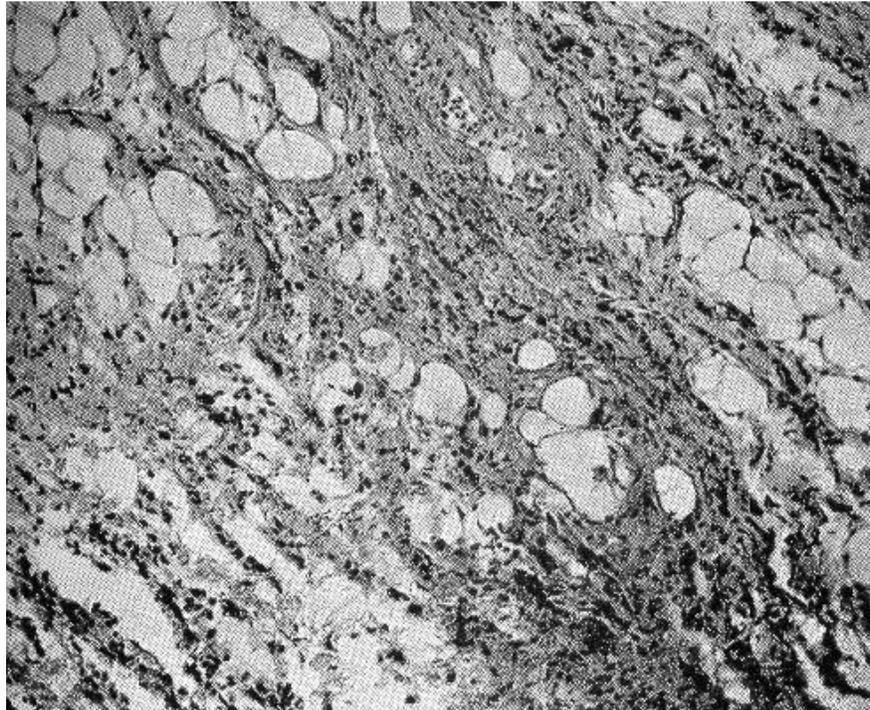


Fig. 30 – Tecido gorduroso do coreon papilar, fibrosado e infiltrado por células redondas amebóides. Original. Sobanski, fot.

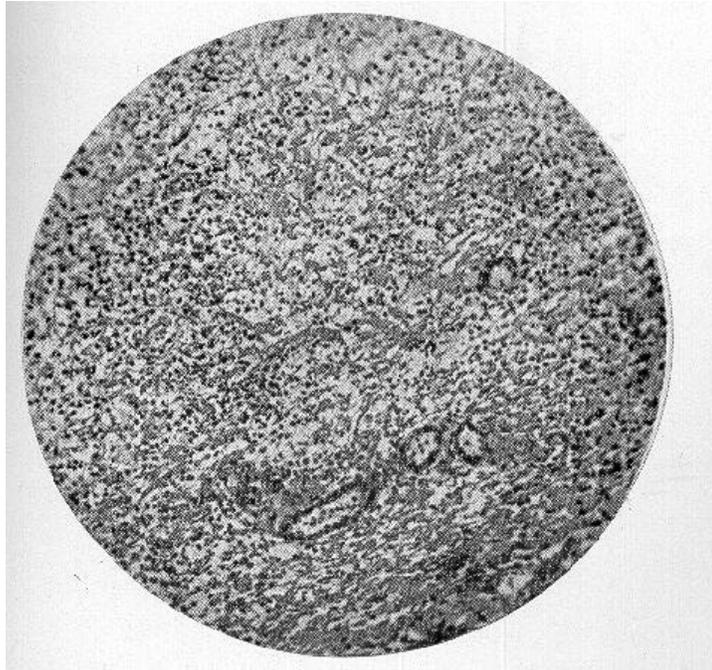


Fig. 31 – Intensa infiltração de células redondas, algumas no interior dos vasos cujo endotélio mostra células intumescidas. Original. Sobanski, fot.

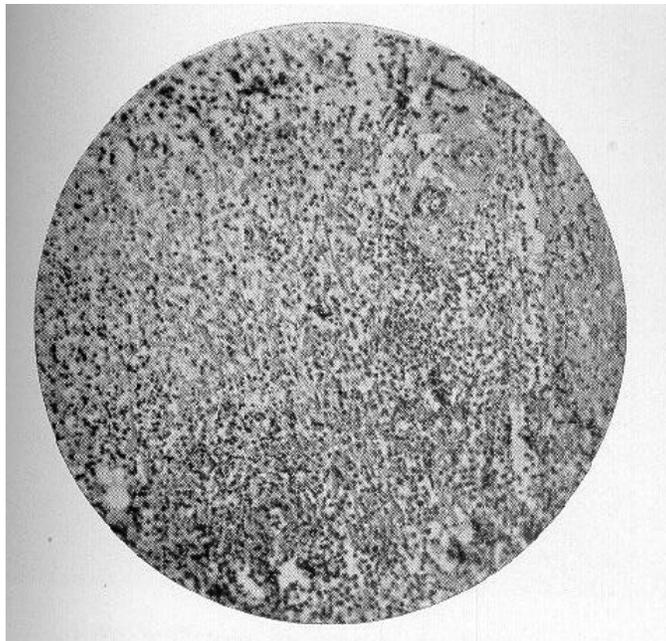


Fig. 32 – Aspecto do infiltrado inflamatório onde se nota disposição perivascular de células redondas o vasculante. Original. Sobanski, fot.

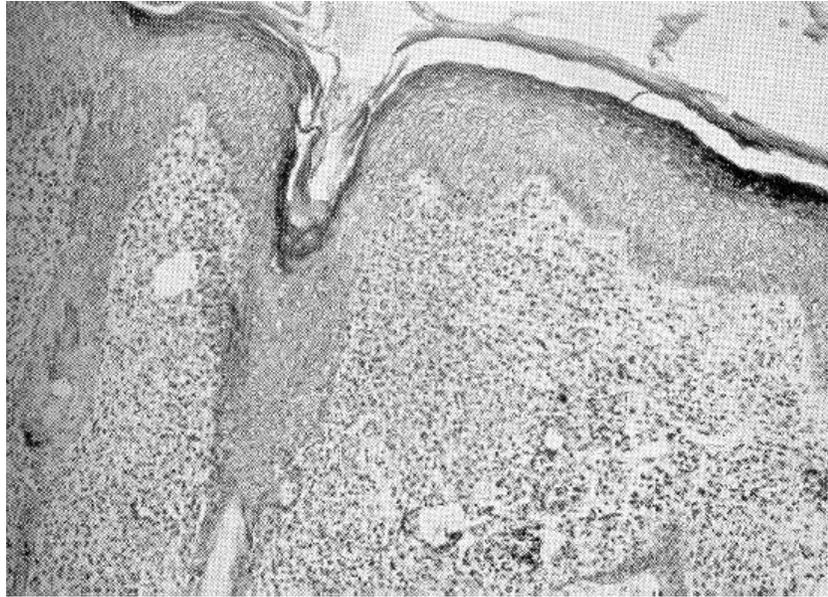


Fig. 33 – Intensa infiltração dos coreons papilar e reticular por células redondas e macrófagos parasitados. Original. Sobanski, fot.



Fig. 34 – Intensa infiltração dos coreons papilar e reticular onde se nota acúmulos de células redondas em torno dos folículos pilosos e dos vasos. Original. Sobanski, fot.

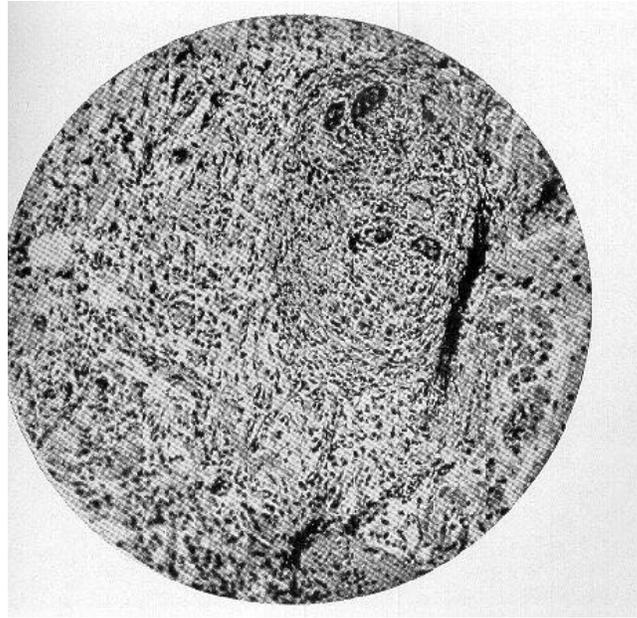


Fig. 35 – Aspecto específico do granuloma mostrando formação nodular onde se distinguem gigantócitos. Original. Sobanski, fot.

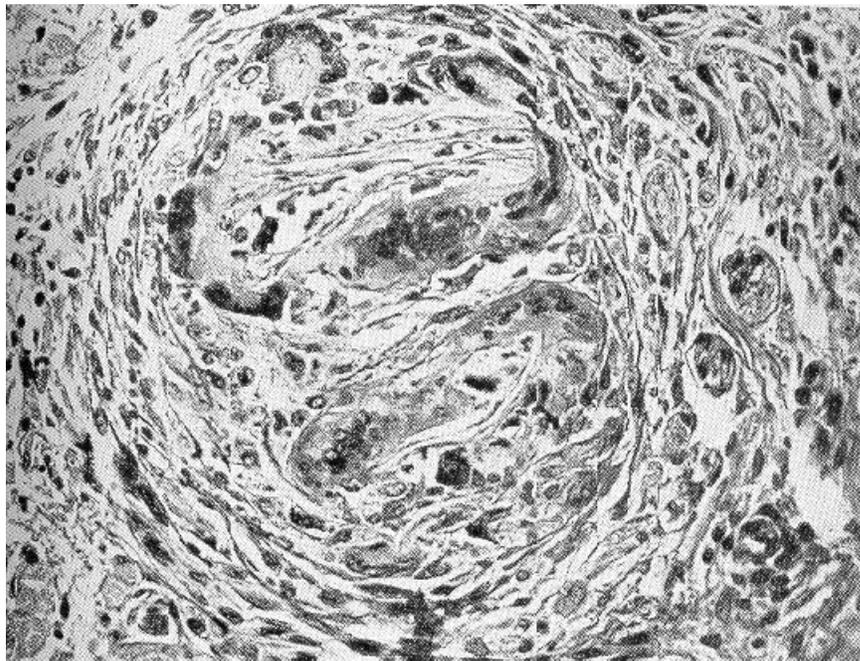


Fig. 36 – Aspecto específico do granuloma mostrando formação nodular onde se distinguem gigantócitos em fase de constituição. Original. Sobanski, fot.

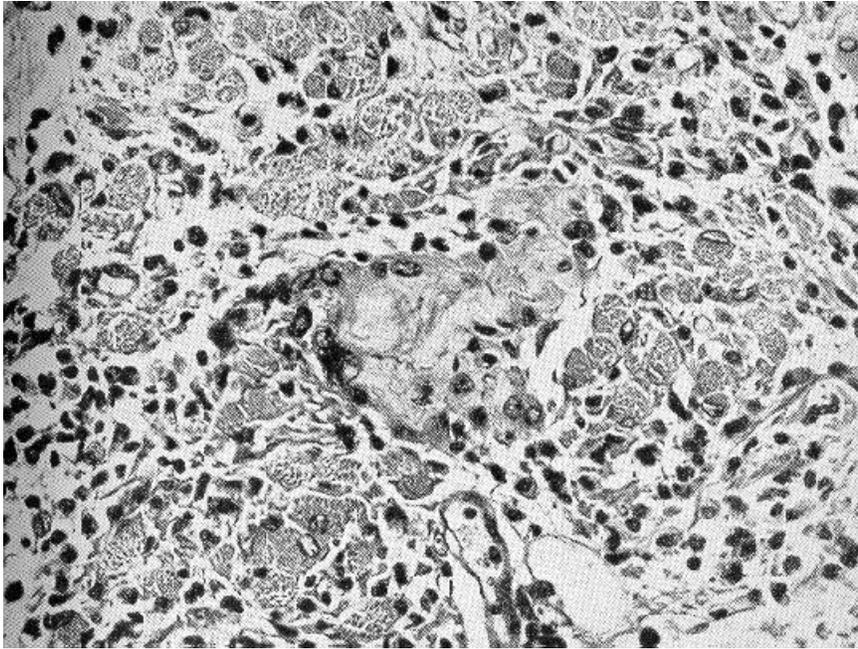


Fig. 37 – Formação gigantocitária iniciada entre fibras musculares infiltradas por macrófagos parasitados. Original. Sobanski, fot.

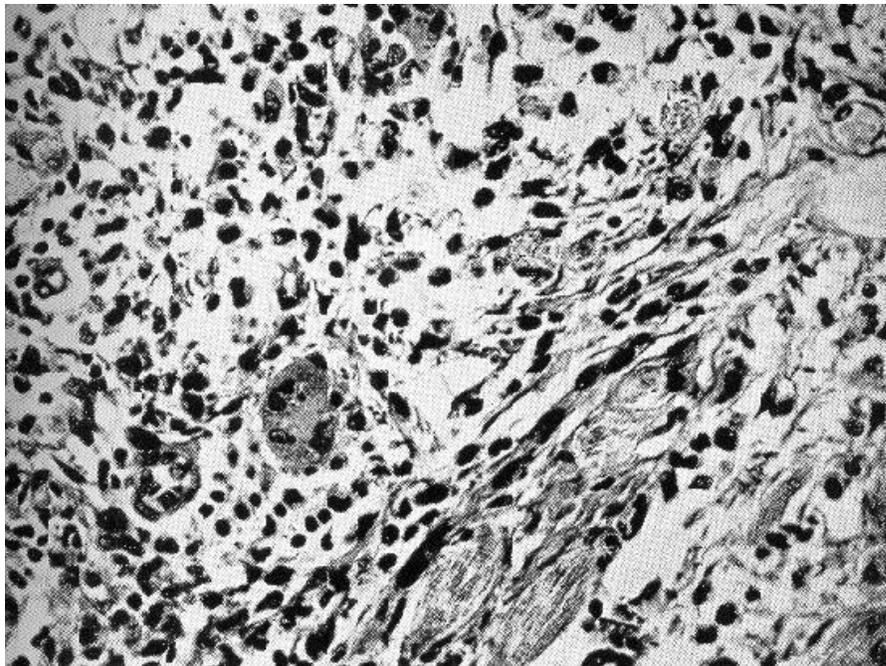


Fig. 38 – Agrupamento de macrófagos parasitados mostrando célula gigante contendo inúmeras leishmanias no protoplasma e no interior de vacúolos. Original. Sobanski, fot.

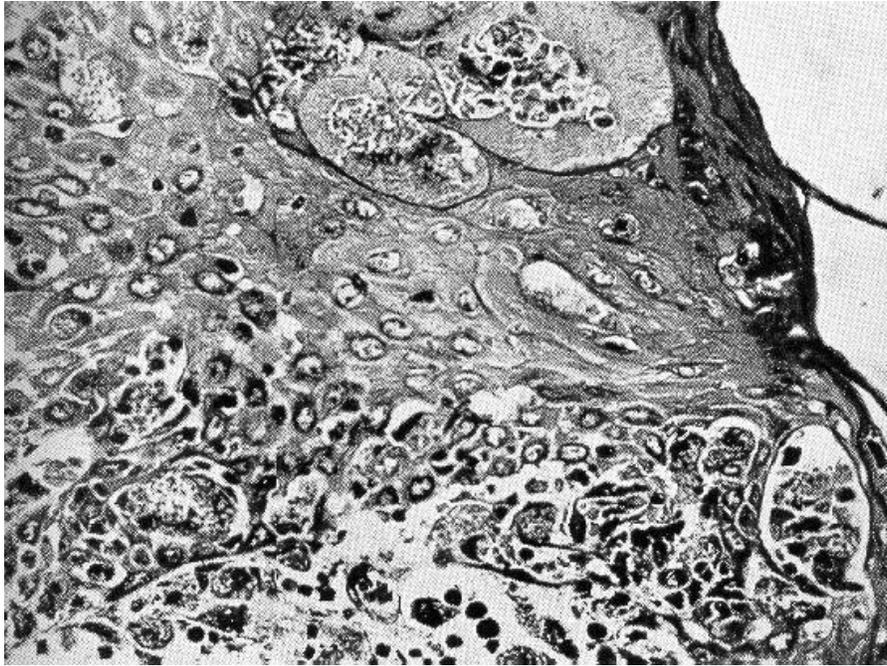


Fig. 39 – Corte de pele mostrando macrófagos intensamente parasitados invadindo o corpo mucoso de Malpighi onde formam ninhos parasitários. Original. Sobanski, fot.

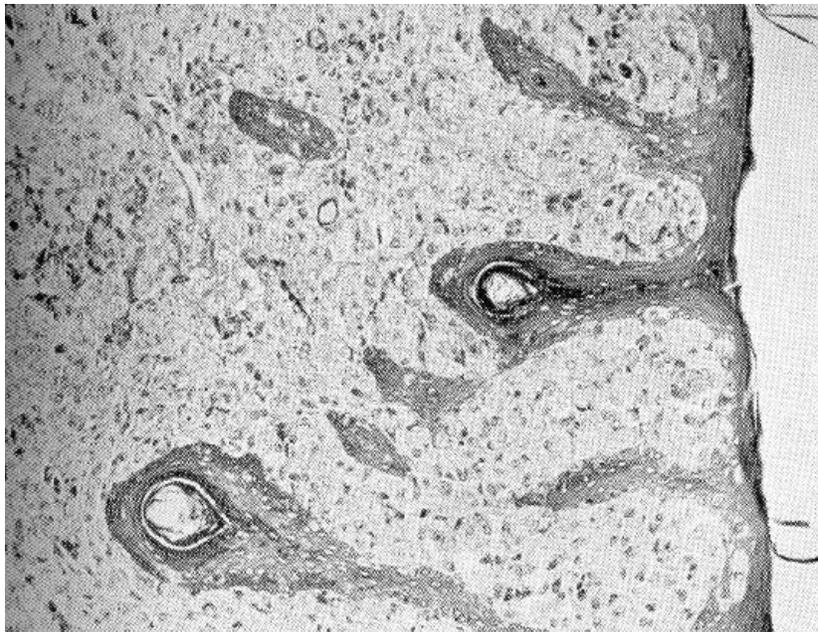


Fig 40 – Pele intensamente parasitada mostrando acantose e pérolas córneas no interior do tecido macrofágico. Original. Sobanski, fot.

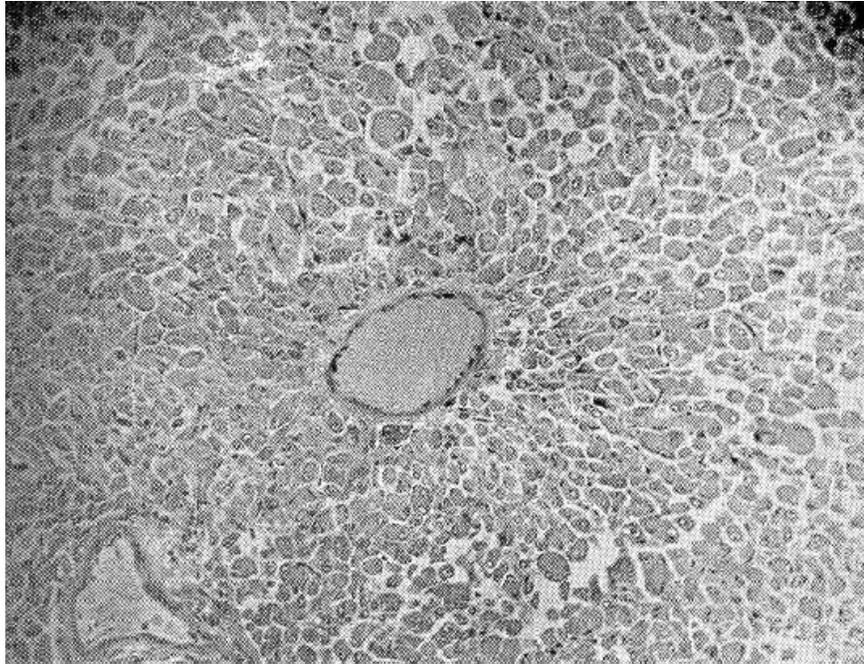


Fig. 41 – Macrófagos e sincícios parasitados adotando disposição radiada em torno de capilares. Original. Sobanski, fot.

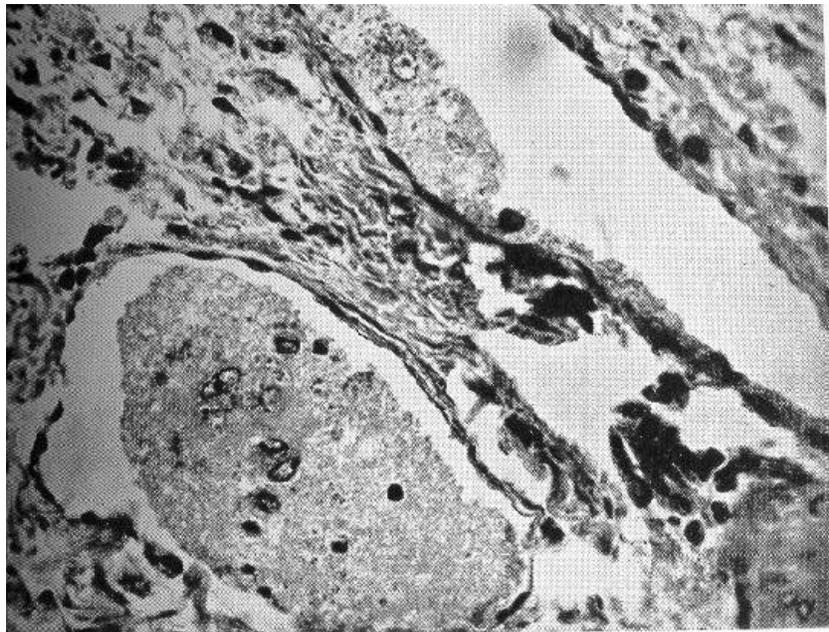


Fig. 42 – Corte capilar linfático da pele mostrando no interior grande número de corpúsculos de Leishman livres e macrófagos parasitados. Original. Sobanski, fot.

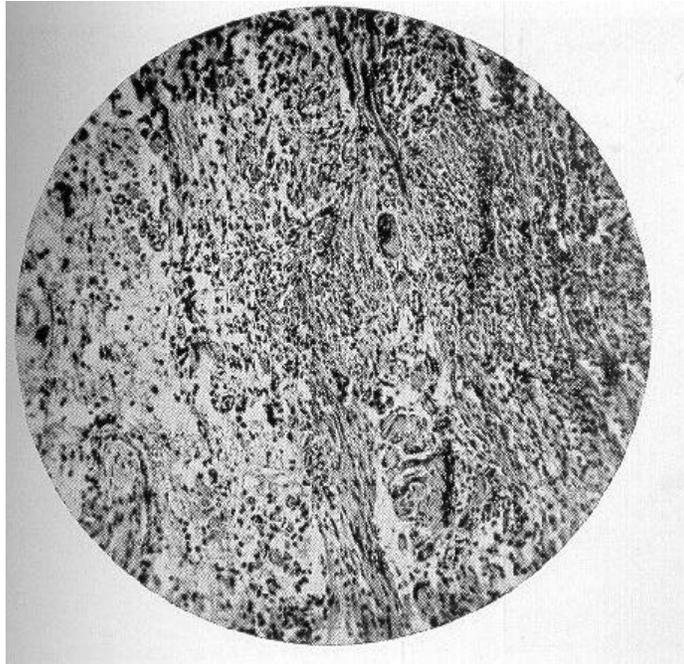


Fig. 43 – Aspecto específico do granuloma onde se nota formações gigantocitárias e esboço de formações nodulares. Original. Sobanski, fot.

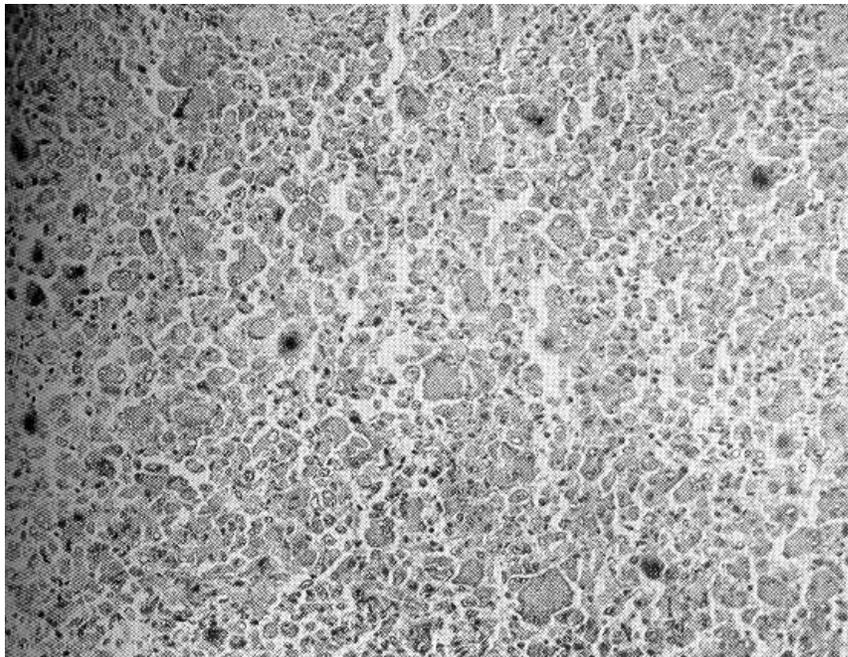


Fig. 44 – Aspecto geral de uma lesão leishmaniótica onde se nota a substituição completa dos elementos normais da pele por macrófagos e sincícios parasitados. Original. Sobanski, fot.

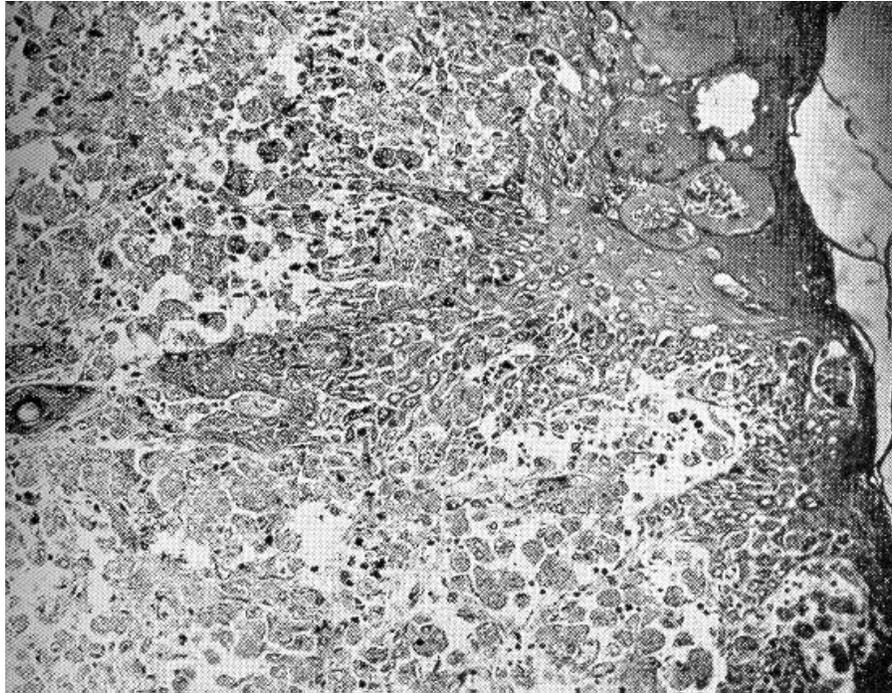


Fig. 45 – Profundas acantoses no seio do tecido macrófágico. Original. Sobanski, fot.

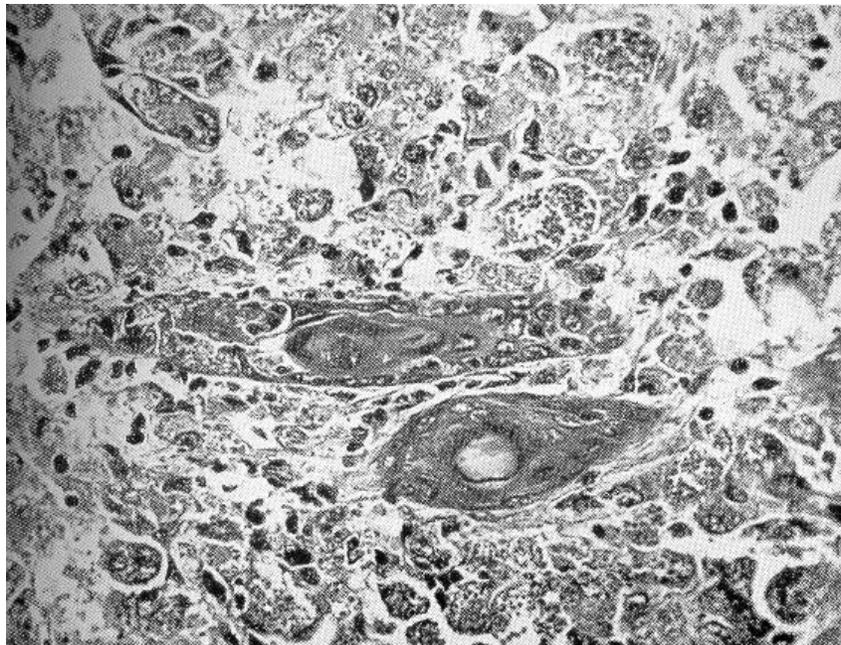


Fig. 46 – Corte de folículo piloso mostrando no interior grandes macrófagos parasitados. Original. Sobanski, fot.

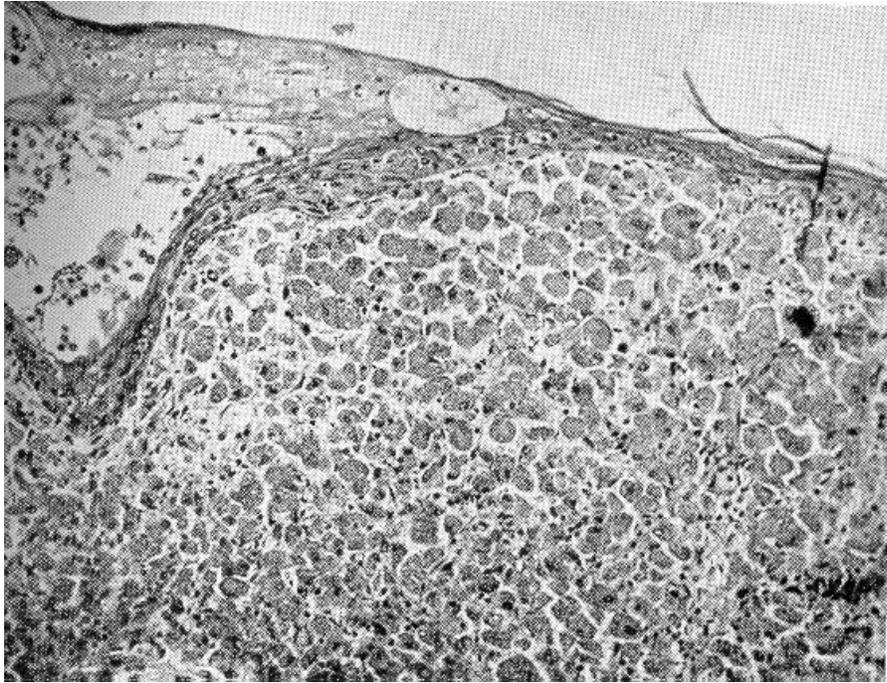


Fig. 47 – Aspecto geral de lesão leishmaniótica do nariz onde se nota completa substituição dos elementos normais da pele por macrófagos parasitados, alguns situados no interior do corpo mucoso de Malpighi. Original. Sobanski, fot.