

*Aryon de Almeida Barbosa Júnior*

## Alguns Aspectos Anatomopatológicos e Imunopatológicos da Leishmaniose Visceral Murina Experimental

Estudo evolutivo comparado  
em duas linhagens isogênicas

Rio de Janeiro, novembro de 1984



*Aryon de Almeida Barbosa Júnior*

## Alguns Aspectos Anatomopatológicos e Imunopatológicos da Leishmaniose Visceral Murina Experimental

Estudo evolutivo comparado  
em duas linhagens isogênicas

Rio de Janeiro, novembro de 1984

ARYON DE ALMEIDA BARBOSA JUNIOR

ALGUNS ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS  
E IMUNOPATOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE  
VISCERAL MURINA EXPERIMENTAL.

Estudo evolutivo comparado em duas  
linhagens isogênicas.

Tese submetida à Coordenação dos  
Cursos da Área de Pesquisa do Ins-  
tituto Oswaldo Cruz para obtenção  
do Grau de Mestre em Ciências em  
Biologia Parasitária - Área de con-  
centração: Patologia.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ  
Rio de Janeiro, Outubro de 1984

Trabalho realizado no Centro de  
Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ/UFBa)  
Salvador - Bahia, sob a orientação do  
Prof. Dr. Zilton Araújo Andrade.

A Claudia e Gustavo

## AGRADECIMENTOS

Expresso aqui o meu mais sincero reconhecimento a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Cumpre-me agradecer em particular:

- Ao meu mestre, Prof. Zilton Araújo Andrade, fundador de uma escola de patologistas na Bahia, investigador exemplar e eminente professor, que me recebeu e integrou entre seus discípulos e colaboradores, confiando-me este trabalho. Conviver com sua equipe e beneficiar-me do seu dinamismo e competência científica, inseparáveis de cordialidade ímpar no trato das coisas cotidianas, enriqueceram muito a minha formação.

- Ao Dr. Steven Gregory Reed, pela inestimável cooperação na realização do trabalho.

- Ao Dr. Moysés Sadigursky, pelos esclarecimentos e informações que desprendidamente me prestou durante todas as fases do trabalho.

- Ao Prof. José Rodrigues Coura, que facilitou o meu deslocamento para Salvador.

- Ao Dr. Henry Willcox, pelo apoio constante e pelo auxílio nas negociações com a Universidade Federal da Bahia para cumprimento de alguns créditos.

- À Dra. Sônia Gumes Andrade, pelos esclarecimentos e sugestões, e pela participação nos entendimentos com a Universidade Federal da Bahia.

- A Zulmira Santana e a Nilda Oliveira da Silva, pelo excelente trabalho de preparação das seções histológicas.

- A Paulo César Dantas Lima e Edvaldo do Amor Divino, pelo ótimo e cuidadoso trabalho datilográfico.

- A Roselmy Buarque da Silva, pelo trabalho fotográfico.

- A Ana Maria Fixina e Ana Christina Caldeira, pela ajuda com as referências bibliográficas.

- Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, ambiente de trabalho e estudo, pela utilização das instalações, equipamentos e materiais.

- A Universidade Federal da Bahia, que me permitiu cursar algumas disciplinas como aluno especial em pós-graduação.

- Ao Conselho Nacional de Pesquisas, pela concessão de bolsa de estudos.

"... sō depois de bem aclarado este ponto, é que pôde haver interpretação segura dos factos que observâmos ..."

Gaspar de Oliveira Vianna  
(1885 - 1914)

## Í N D I C E

	<u>Página</u>
RESUMO.....	1
INTRODUÇÃO.....	3
REVISÃO DA LITERATURA.....	7
1. ASPECTOS HISTÓRICOS.....	7
2. ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA.....	8
3. ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	10
3.1. A infecção em cães.....	10
3.2. A infecção em primatas.....	12
3.3. A infecção em hamsters.....	13
3.4. A infecção em ratos.....	15
3.5. A infecção em camundongos.....	17
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
1. ANIMAIS.....	21
1.1. Generalidades.....	21
1.2. Divisão dos grupos experimentais.....	21
2. PARASITOS.....	22
3. INFECÇÃO EXPERIMENTAL DOS CAMUNDONGOS.....	22
3.1. Isolamento de amastigotas de <i>Leishmania</i> <i>donovani chagasi</i> do baço de hamsters....	22
3.2. Cálculo do inóculo e método de infecção.	23
4. PROCEDIMENTOS GERAIS.....	23
4.1. Sacrifício dos animais.....	24
4.2. Determinação da carga parasitária.....	24
4.3. Obtenção de soro imune.....	24

4.4. Processamento histológico e técnicas de coloração para microscopia óptica.....	25
4.5. Estudo de imunofluorescência em tecidos .....	26
4.6. Contagem e mensuração dos granulomas hepáticos .....	28
4.7. Cálculo do índice hepático e esplênico .....	29
4.8. Mensuração dos glomérulos renais.....	29
4.9. Avaliação dos depósitos glomerulares....	29
4.10. Análise estatística e representação gráfica .....	29
<b>RESULTADOS</b> .....	31
1. EVOLUÇÃO PONDERAL.....	31
1.1. Peso corporal .....	31
1.2. Peso do fígado .....	31
1.3. Índice hepático .....	32
1.4. Peso do baço .....	32
1.5. Índice esplênico .....	32
2. EVOLUÇÃO DO PARASITISMO HEPÁTICO .....	33
3. EVOLUÇÃO DO PARASITISMO ESPLÊNICO .....	34
4. ESTUDO HISTOPATOLÓGICO .....	34
4.1. Fígado .....	34
4.2. Baço .....	38
4.3. Linfonodos .....	40
4.4. Timo .....	41
4.5. Medula óssea .....	42
4.6. Pulmões .....	42
4.7. Rins .....	44
5. ESTUDO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA EM TECIDO RENAL .....	45
<b>DISCUSSÃO</b> .....	47

CONCLUSÕES.....	55
SUMMARY.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

ANEXOS

Tabelas

Figuras

## RESUMO

Ainda não se estabeleceu qual é o modelo experimental mais adequado para o estudo dos diferentes aspectos da leishmaniose visceral.

Ultimamente, tem sido grande o interesse pelo uso dos camundongos isogênicos como modelos experimentais dessa infecção. Entretanto vários aspectos da leishmaniose visceral murina são pouco conhecidos, e portanto as semelhanças com a infecção humana são ainda incertas e pouco precisas.

No presente trabalho, foram estudados evolutiva e comparativamente, alguns aspectos anatomopatológicos e imunopatológicos da leishmaniose visceral murina experimental em duas linhagens isogênicas.

Utilizaram-se camundongos das linhagens DBA/2 e C57BL/10 infectados pela veia da cauda com  $2 \times 10^6$  amastigotas de *Leishmania donovani chagasi*, de uma cepa proveniente de Imperatriz, Maranhão; e sacrificados periodicamente.

Determinou-se a evolução ponderal, e a evolução do parasitismo hepático e esplênico. Estudou-se histopatologicamente as alterações hepáticas, esplênicas, ganglionares, tímicas, medulares, pulmonares e renais. Adicionalmente foi feito um estudo de imunofluorescência em tecido renal.

As linhagens de camundongos estudadas se comportaram diferentemente diante de exposição semelhante a formas amastigotas de *Leishmania donovani chagasi*, o que aparentemente está relacionado com diferenças imunológicas e genotípicas.

Nas fases iniciais da infecção, o parasitismo hepático foi significativamente maior nos camundongos C57BL/10. O parasitismo esplênico foi menor que o hepático, e seu máximo aconteceu na décima e na vigésima semanas pós infecção, respectivamente nos camundongos C57BL/10 e DBA/2.

As alterações anatomopatológicas mais importantes foram do tipo inflamatório, com formação de granulomas em vários órgãos e plasmocitose difusa. Tais alterações foram mais

conspícuas e apareceram mais precocemente nos camundongos C57BL/10.

Embora não se tenha notado hepatomegalia no período de observação, o principal órgão envolvido foi o fígado, onde a formação de granulomas caracterizou-se por ser um processo dinâmico.

Esplenomegalia foi observada nas fases mais tardias da infecção em ambas as linhagens; enquanto que deposição de substância amilóide no baço só foi notada nos camundongos C57BL/10, a partir da sexagésima sexta semana pós infecção.

Nos moldes deste trabalho, não pudemos caracterizar pneumonite intersticial, nem glomerulonefrite proliferativa.

Os aspectos observados, permitem concluir que os camundongos isogênicos se constituem em modelo experimental de doença espectral, que se correlaciona com alguns aspectos da infecção humana e que pode permitir o esclarecimento de alguns pontos ainda pouco claros da leishmaniose visceral.

## INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral ou calazar é uma protozoose de caráter crônico e predominantemente sistêmico, que compromete o sistema fagocítico mononuclear. Apresenta manifestações clínicas variáveis, de acordo com o tipo de organismo causador e o estado de resistência e competência imunológica do hospedeiro, destacando-se: hipertermia, emagrecimento, hepatoesplenomegalia, pancitopenia e disproteinemia, além de fenômenos hemorrágicos<sup>74,82,92</sup>. A doença assume curso grave na ausência de tratamento adequado, sendo amiúde fatal para o homem<sup>66</sup>. Todavia tem sido relatado recentemente o encontro frequente em áreas endêmicas de algumas formas de apresentação clínica oligossintomáticas<sup>116</sup>.

A doença pode ser encontrada em todos os continentes, principalmente nas áreas quentes e secas do mundo. É endêmica em alguns países (Portugal, Espanha, França, Itália, Turquia, Nepal, Bangladesh, Grécia, Argélia, Iraque, Irã, Sul da União Soviética, Índia, Etiópia, Somália, Quênia, Sudão, Venezuela e Brasil); e esporádica em outros (Paquistão, China, Uganda, Moçambique, Madagascar, Zaire, Angola, República Centro Africana, Gâmbia, Alto Volta, Togo, México, Guatemala, El Salvador, Peru, Guadalupe, Colômbia, Equador, Honduras, Suriname, Argentina, Bolívia e Paraguai)<sup>114</sup>.

No Brasil tem sido registrada em todos os estados litorâneos do Pará à Bahia, e em alguns focos esporádicos nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Goiás, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná<sup>5,69,85,117</sup>.

Os estudos epidemiológicos no Brasil não tem sido muito intensos nos últimos anos, chegando a 3.621 o número de casos brasileiros relatados na literatura até 1976<sup>36,120</sup>; esses dados não refletem a real situação da doença no país e representam, sem dúvida, apenas uma fração do número de casos existentes. Essa casuística aparentemente pequena, não deve induzir à subestimação do problema, e serve para chamar a atenção para a necessidade de novos estudos nesta área.

A infecção humana geralmente acontece no peridomicílio em regiões rurais ou suburbanas, havendo evidências epidemiológicas que incriminam um díptero da família *Phlebotominae*, *Lutzomyia longipalpis* como o principal vetor, e o cão (*Canis familiaris*) e canídeos silvestres (*Cerdocyon thous* e *Lycalopex vetulus*) como reservatórios da leishmaniose visceral para o homem, nos focos endêmicos do Brasil<sup>34, 35, 37, 57</sup>.

Os parasitos apresentam duas formas evolutivas durante o seu ciclo biológico. Nos vertebrados estes organismos se localizam e multiplicam em fagócitos do sistema fagocítico mononuclear sob a forma amastigota, estrutura esférica de dois a cinco micrômetros, que apresenta periplasto envolvendo cinetoplasto e núcleo excêntrico; enquanto que em cultura e no inseto vetor transforma-se na forma promastigota com flagelo livre; multiplicando-se e migrando para porções anteriores do intestino médio e peças bucais do invertebrado<sup>61, 74, 82</sup>.

Entende-se que os parasitos responsáveis pela leishmaniose visceral pertencem à classe *Zoomastigophorea* Calkins, 1909; ordem *Kinetoplastida* Honigberg, 1963; subordem *Trypanosomatina* Kent, 1880; família *Trypanosomatidae* (Doflein, 1901) Grobber, 1905; gênero *Leishmania* Ross, 1903<sup>57</sup>. Entretanto, a sistemática do gênero *Leishmania* prossegue sendo discutida em razão de que o sistema taxonômico atual tem se mostrado inadequado; reconhecendo-se o gênero como um complexo no qual, à luz dos conhecimentos modernos, os parâmetros biológicos clássicos usados no passado apoiados exclusivamente na distribuição geográfica e manifestações clínicas da doença, tem valor apenas limitado para uma precisa identificação e individualização das espécies<sup>53, 86, 96</sup>.

Os organismos do gênero, que causam doença para o homem, são morfologicamente indistinguíveis à microscopia óptica, entretanto podem ser diferenciados por caracteres intrínsecos: ultraestrutura, estrutura e funções químicas (densidade de flutuação do DNA, constituição isoenzimática, padrões respiratórios, sensibilidade a drogas, composição de proteínas e lipídica), efeitos imunológicos no hospedeiro (proteção, resposta humoral e mediada por células); e extrínsecos: comporta

mento em animais de laboratório, em insetos vetores, e em cultura; além da distribuição geográfica e manifestações clínico-patológicas no homem<sup>28,45,56,77,86,98</sup>.

As novas técnicas empregadas ultimamente, tem revelado certo grau de heterogeneidade em alguns grupos de *Leishmania*, particularmente ao nível de subespécie<sup>98</sup>.

O emprego de um sistema trinomial engloba e acomoda, por ora satisfatoriamente, as variantes epidemiológicas e patogênicas da doença. Aceitando-se no caso particular da leishmaniose visceral, que o agente causador seja *Leishmania donovani donovani* na Índia e Bangladesh; *Leishmania donovani infantum* no Mediterrâneo e possivelmente em outras partes do velho mundo; *Leishmania donovani chagasi* no novo mundo e *Leishmania donovani s.l.* em alguns outros lugares como o Sudão<sup>67</sup>.

A compreensão total e completa da patologia da doença humana ainda não foi conseguida em virtude de determinados aspectos morfológicos prosseguirem com alguns pontos pouco claros. Exemplificando, não sabemos ainda o preciso mecanismo, nem tampouco o exato significado das alterações renais, tanto glomerulares quanto intersticiais e tubulares. Não é certo se o aparecimento de fibrose hepática, eventualmente decorrente da diferenciação de fibras reticulínicas a partir da deposição de material ricamente proteico, é uma manifestação peculiar e frequente da doença. Ainda não sabemos seguramente se o processo de pneumonite intersticial observado em alguns pacientes, decorre de fatores gerais condicionados pelo parasitismo e se tal processo se correlaciona com a sintomatologia de tosse. Além disso, o mecanismo exato da pancitopenia e da disproteinemia não são bem conhecidos. As investigações futuras, usando novas técnicas e equipamentos, e o emprego de modelos experimentais que reproduzam tanto quanto possível a doença humana, abrem grandes perspectivas e é justo que se esperem novos progressos nesta área.

Os riscos inerentes à realização de estudos acurados em seres humanos doentes, torna de grande importância o desenvolvimento e a máxima exploração de modelos experimentais, seja para testes de medicamentos e vacinas, seja para conheci-

mento e entendimento da patogênese das lesões produzidas no curso da leishmaniose visceral.

Um grande número de animais experimentais tem sido utilizado nesses ensaios. No entanto, não só a semelhança com a doença humana, como também outros fatores devem ser considerados: a facilidade de obtenção do animal, seu custo de aquisição e de manutenção, a facilidade de reprodução em cativeiro, a longevidade; bem como a facilidade de manuseio, a susceptibilidade e a uniformidade de resposta diante do parasito.

Apesar dos numerosos estudos realizados até agora, alguns desses modelos não foram ainda suficientemente caracterizados. Diante disso, resolvemos tentar caracterizar o modelo experimental da leishmaniose visceral murina, usando duas linhagens isogênicas, através do estudo de alguns aspectos histopatológicos e imunopatológicos.

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1. ASPECTOS HISTÓRICOS

LEISHMAN<sup>60</sup> publica em Londres os seus achados ao examinar o baço de um soldado irlandês procedente da Índia e falecido em 1900 na Inglaterra, relatando a existência de grande número de corpos redondos e ovais de dois a três micrômetros de diâmetro, que quando corados por corantes de Romanovsky, mostravam no seu interior duas massas de cromatina, uma delas arredondada e a outra, geralmente em forma de bastão.

DONOVAN<sup>39</sup> relata o encontro de corpos arredondados, semelhantes aos descritos por LEISHMAN, em material proveniente de punção esplênica de uma criança indiana.

LAVERAN & MESNIL<sup>59</sup> examinando o material de DONOVAN propuseram o nome de *Piroplasma donovani*.

ROSS<sup>95</sup> sustentou que os parasitos descobertos por LEISHMAN & DONOVAN pertenciam a um gênero novo, sugerindo o nome de *Leishmania donovani*.

MANSON & LOW<sup>65</sup> foram ao que parece os primeiros a reconhecer os corpos de LEISHMAN & DONOVAN em um paciente doente de calazar.

Quase ao mesmo tempo, BENTLEY<sup>14</sup> e CHRISTOPHERS<sup>30</sup> na Índia; e CASTELLANI<sup>25</sup> no Ceilão, também o fizeram em pacientes com calazar.

Casos novos da doença foram relatados em anos seguintes na Europa e Ásia<sup>82</sup>.

MIGNONE<sup>75</sup> descreveu o primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral humana na América, em Assunção, Paraguai, em um paciente procedente de Mato Grosso.

MAZZA & CORNEJO<sup>70</sup> registraram dois casos em crianças na Argentina, confirmados pelo encontro dos parasitos através da punção esplênica.

No entanto, uma idéia mais precisa da importância da doença no continente americano só foi tida quando PENNA<sup>84</sup> demonstrou 41 casos com comprovação parasitológica, provenientes

tes de alguns estados brasileiros (Ceará, Bahia, Piauí, Pará, Sergipe, Alagoas, Rio Grande do Norte e Pernambuco).

Depois desta data, novos casos foram descritos nas Américas, principalmente no Brasil<sup>36, 120</sup>.

## 2. ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA.

O primeiro estudo em necrópsia sistemática e completa de um caso de leishmaniose visceral, foi feito por MARCHAND & LEDINGHAN<sup>66</sup>, que puderam observar hepatoesplenomegalia, ulcerações intestinais e parasitismo do sistema fagocítico mononuclear.

Logo a seguir, CHRISTOPHERS<sup>30</sup> em trabalho fundamental, descreve detalhadamente quatro casos de necrópsia, demonstrando a predileção dos parasitos pelas células endoteliais do fígado, baço e medula óssea; e chamando a atenção para a sua capacidade de multiplicação no interior destas células.

Os estudos morfológicos que se seguiram concluíram que a leishmaniose visceral era um processo caracterizado por uma invasão parasitária do sistema fagocítico mononuclear, com a sintomatologia daí decorrente; a semelhança do que ocorre quando da injeção endovenosa experimental de partículas inertes. No entanto, esta visão simplista foi modificada com a introdução do conceito de reação clasmotocitária, na qual o parasito forneceria estímulo suficiente para que as células macrofágicas apresentassem proliferação focal<sup>7, 63, 71, 72</sup>.

As reações celulares e os reflexos morfológicos da disproteinemia mereceram alguns estudos, que embora em pequenas séries de casos, trouxeram contribuição ao entendimento da anatomopatologia da doença.

As alterações hepáticas, dada a frequência e importância, têm sido objeto de interesse dos pesquisadores. Tais alterações são constituídas por inflamação crônica e difusa, com tendência à formação de lesões nodulares compostas de proliferação histiocitária e plasmocitose; além de hiperplasia e

hipertrofia das células de Kupffer, ocasionalmente parasitadas por formas amastigotas<sup>7,9,26,27,82,101,103</sup>.

A nível ultraestrutural<sup>78,115</sup> tem sido observado que o comprometimento dos elementos kupfferianos é muito mais intenso do que os hepatócitos, e que as alterações das organelas citoplasmáticas são mais proeminentes nas células contendo parasitos em desintegração não envoltos por vacúolos<sup>13</sup>. Uma fibrose intralobular foi descrita pela primeira vez por ROGERS<sup>94</sup>, sendo mais tarde revalorizada como manifestação própria da leishmaniose visceral<sup>17,104</sup>. Sua observação entretanto é eventual, podendo ocorrer nos casos de duração excepcionalmente prolongada<sup>9</sup>. Uma explicação que tem sido lembrada para a presença de fibrose, seria através da formação de fibras colágenas sob influência de células diversas em evolução fibrocitária, a partir da deposição intersticial de material ricamente proteico<sup>6</sup>.

As alterações esplênicas são macroscopicamente traduzidas por constante e precoce aumento de volume do órgão. Microscopicamente há uma redução no tamanho da polpa branca e atrofia folicular, com deposição de material eosinofílico, além de necrose e fibrose das áreas centrais dos folículos. Esse processo se acompanha de proliferação de plasmócitos e de histiócitos contendo esparsos parasitos, tanto na polpa vermelha quanto na branca<sup>7,32,73,82,97,119</sup>. O encontro de eritrofagocitose esplênica em alguns casos, sugere uma destruição anormal de hemácias, podendo concorrer para a anemia desses pacientes<sup>82,119</sup>, entretanto esse aspecto não foi observado por outros autores<sup>7,73</sup>.

O envolvimento dos linfonodos não tem sido constantemente registrado. As alterações mais amiúde relatadas são representadas por aumento moderado de volume, fibrose da cápsula, atrofia linfóide com depleção linfocitária das zonas T e B dependentes e deposição de material PAS positivo nos centros germinativos foliculares, além de proliferação de plasmócitos e histiócitos, vistos tanto em áreas paracorticais quanto nos cordões medulares. O grau de parasitismo é variável podendo ser discreto a muito intenso. O aspecto de eritrofagocitose têm sido observado raramente<sup>7,32,82,119</sup>.

A patogênese das alterações medulares com a pancitopenia periférica dela resultante, é ainda assunto controverso. A medula óssea tem sido estudada através de métodos hematológicos<sup>102</sup>, mais adequados e precisos do que os meios rotineiros de exame histopatológico. As alterações mais frequentemente relatadas são representadas por hipoplasia da série mielóide, hiperplasia das células reticulares e plasmocitose; sendo frequente o encontro de parasitos<sup>7,32</sup>.

Nos pulmões, é bem conhecida a ocorrência de um processo de pneumonite intersticial como manifestação da doença. Tal processo, aparentemente correlacionado com a tosse que os pacientes apresentam, é caracterizado por infiltração difusa das paredes septais e do conjuntivo interlobular por células plasmáticas, além de proliferação e entumescimento das células endoteliais dos capilares septais e dos histiócitos pulmonares, que se apresentam eventualmente parasitados. A inflamação pulmonar parece ser independente da presença ou não de parasitos no pulmão<sup>8,9,12,89</sup>.

As alterações renais na leishmaniose visceral ainda não são suficientemente conhecidas. As lesões renais que parecem estar relacionadas com a doença, localizam-se ao nível dos glomérulos, sendo eventualmente representadas por espessamento membranoso hialino e fibrilar do mesângio, com deposição de imunoglobulinas G e M, e da fração C<sub>3</sub> do complemento: além de proliferação de células mesangiais e endoteliais<sup>9,10,24,118,121</sup>. Poucas referências têm sido feitas a respeito do processo inflamatório intersticial. Recentemente, um quadro de nefrite intersticial composto de edema e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário difuso, foi interpretado como uma manifestação da doença<sup>42,80</sup>.

A disproteinemia pode por seu turno condicionar alterações morfológicas<sup>6</sup>. No tecido intersticial, essas alterações são representadas pela presença de pequenos depósitos de substância hialina, que não mostra metacromasia com o violeta de metila, nem afinidade pelo vermelho congo. Tal substância tem distribuição semelhante à da amiloidose de tipo secundário, tratando-se possivelmente de material ricamente proteico transudado do plasma anormalmente consti

tuído para os locais de maior permeabilidade vascular<sup>9</sup>.

### 3. ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM ANIMAIS EXPERIMENTAIS.

#### 3.1 A infecção em cães.

As pesquisas sobre a leishmaniose visceral tiveram um grande avanço, graças às contribuições de NICOLLE<sup>81</sup>, reconhecendo a doença natural em cães, e conseguindo com sucesso infectá-los experimentalmente.

A demonstração de uma maior adaptação dos parasitos à mesma espécie de hospedeiro que deu origem à cepa usada para infecção, foi feita por CUNHA<sup>33</sup>, que utilizando a via intraperitoneal infectou quatro cães novos com culturas de parasitos provenientes de casos humanos e de cães naturalmente infectados. A comprovação da infecção ocorreu mais precocemente nos animais que foram infectados com a cepa de origem canina.

A doença canina, em animais naturalmente infectados, cursa com proeminentes lesões tegumentares e de fâneros, que se caracterizam por eczema furfuráceo com base numa dermite parasitária difusa, com inflamação crônica perivascular e perifolicular; além de hipertrofia ungueal, observável na maioria dos casos<sup>4,22</sup>.

As lesões viscerais amiúde são representadas por aumento variável de peso do fígado e baço. Tais lesões microscopicamente se traduzem por hepatite difusa, com infiltrado linfoplasmocitário, mais conspícuo em zonas periportais; mobilização kupfferiana e granulomas macrofágicos ocasionalmente parasitados. No baço o aspecto mais proeminente é a hiperplasia histiocitária, com os histiócitos às vezes parasitados. Esse aspecto também é visto na medula óssea e linfonodos<sup>4,22</sup>. Nos pulmões, ALENCAR<sup>4</sup> observou infiltração inflamatória crônica no interstício em torno dos brônquios e vasos, encontrando amastigotas através de esfregaços em 23% dos casos. Nos rins, BRENER<sup>22</sup> observou nefrite intersticial e mais tarde, AYALA<sup>11</sup> relatou a presença de alterações glomerulares, representadas por espessamento mesangial difuso e glomerulone

frite proliferativa. No único caso de BRENER<sup>22</sup> em que o pênis foi examinado, observou-se na região periuretral um processo inflamatório com grande número de histiócitos parasitados. Tal fato poderia favorecer eventual transmissão pelo coito, e é um assunto que merece maiores estudos.

A preponderância das lesões tegumentares, ao contrário da infecção humana, bem como a presença de parasitismo cutâneo; às vezes desacompanhado de infecção visceral demonstrável pelo exame direto; a dificuldade de manuseio, e de obtenção de animais em grande escala, além do custo elevado de manutenção, são desvantagens deste animal como modelo experimental para a leishmaniose visceral.

### 3.2 A infecção em primatas.

Os primatas têm sido pouco usados como modelos experimentais da leishmaniose visceral. Tal aspecto se depreende facilmente pelo pequeno número de publicações a respeito encontradas na literatura. Os poucos trabalhos enfocando estes hospedeiros utilizam animais de variadas espécies, contribuindo para a escassez de informações pertinentes.

Alguns aspectos histológicos em macacos, infectados por injeção intraperitoneal de uma emulsão de baço e fígado de doentes humanos e de animais infectados, foram descritos por SHORTT<sup>99</sup> e por MELENEY<sup>71</sup>. Em dois *Pithecus irus*, uma punção hepática no sétimo e décimo dias pôs infecção permitiu evidenciar parasitos. Os animais encontravam-se moribundos seis semanas após.

Inoculando três macacos rhesus (*Macaca mullata*) pela via intraperitoneal, com culturas de uma cepa argentina em meio de Noller, CUNHA<sup>33</sup> conseguiu infectar apenas um deles. Cerca de oito meses após a inoculação o animal encontrava-se moribundo, tendo o exame post-mortem comprovado infecção. As lesões hepáticas eram representadas por infiltração de células inflamatórias mononucleares nos espaços-porta.

A avaliação do modelo experimental da leishmaniose visceral em sagüis foi feita por SILVA<sup>100</sup> e MARSDEN et alii<sup>68</sup> usando *Callithrix penicillata jordani* e *Callithrix jacchus jacchus*. Tais animais foram inoculados com um mililitro de uma suspensão de fígado e baço de hamsters, rica em amastigotas. Através de punção hepática, estes últimos autores encontraram amastigotas em todos os animais no 120º dia após infecção. Em um animal autopsiado cerca

de 85 semanas após o início do experimento, através de esfregaços, encontraram muitas formas amastigotas em fígado e baço, e algumas nos rins; através de estudo histológico, muitas amastigotas na parede intestinal. Os saglís não foram ainda encontrados naturalmente infectados, e os resultados desses dois experimentos mostraram que nos animais examinados não houve desenvolvimento de uma síndrome similar à humana, com hepatoesplenomegalia progressiva.

A dificuldade de obtenção de animais em grande escala, o alto custo de aquisição e manutenção, o difícil manuseio, os baixos níveis de fecundidade em cativeiro e a heterogeneidade de resposta, são desvantagens dos primatas como modelo experimental da leishmaniose visceral.

### 3.3. A infecção em hamsters.

O hamster tem sido até a atualidade o animal mais usado para estudar a leishmaniose visceral experimental. É de fácil manuseio, tem custo de aquisição e manutenção relativamente baratos. É altamente susceptível à *Leishmania donovani*, mesmo quando inoculado com pequeno número de parasitos, morrendo ao fim de 40 a 150 dias<sup>76,110</sup>; a doença que desenvolve tem caráter progressivo, sem tendência à cura espontânea, e se assemelha em muitos aspectos à doença humana<sup>47,112</sup>.

Desde os trabalhos de YOUNG *et alii*<sup>123</sup>, e de MELENEY<sup>71</sup>, já se conhecia a susceptibilidade do hamster à *Leishmania donovani*. Estudando *Cricetus griseus*, MELENEY<sup>71</sup> notou algumas alterações traduzidas por esplenomegalia, plasmocitose e discreta reação endotelial a nível hepático. Em animais infectados com grande inóculo, encontrou parasitos em quase todos os órgãos contendo células reticulares, concluindo que em hamsters o grau de reação tecidual é diretamente proporcional à multiplicação dos parasitos e ao tempo de infecção.

As acentuadas alterações patológicas que o hamster apresenta tem como características mais comuns a plasmocitose intensa e difusa, e a presença de amiloidose em vários órgãos<sup>47,79</sup>. Ocasionalmente há desenvolvimento de edema intenso, com ascite e comprometimento do tecido subcutâneo nos ca-

soz mais graves<sup>47</sup>.

No fígado observa-se a formação de granulomas hepáticos, com parasitismo progressivo de macrófagos e de células de Kupffer; difusa reação inflamatória de predomínio plasmocitário principalmente em espaços porta, que aumenta de intensidade à medida que a infecção se torna mais crônica, além de deposição de material hialino, eosinofílico, PAS positivo, localizando-se preferencialmente na parede de vasos venosos<sup>79</sup>.

Uma pneumonite intersticial foi descrita por DUARTE<sup>40</sup>, que observou espessamento dos septos alveolares por proliferação de células septais, e pela presença de infiltrado inflamatório mononuclear. Esse aspecto foi visto em grau mais discreto por MOREIRA<sup>79</sup>, que notou ainda alguns macrófagos parasitados.

O envolvimento renal na leishmaniose visceral experimental do hamster têm sido descrito por vários autores. DUARTE *et alii*<sup>41</sup>, através de estudos de microscopia óptica e eletrônica combinados com a análise morfométrica glomerular de *Mesocricetus auratus*, infectados experimentalmente com *Leishmania donovani*; demonstraram hiperplasia progressiva das células mesangiais, começando no décimo dia e atingindo o máximo no vigésimo dia após a infecção, seguindo-se de um declínio no número de tais células, e um progressivo aumento na deposição de amilóide na matriz mesangial. Depósitos de material amilóide em mesângio e alças capilares também foram observados por MOREIRA<sup>79</sup>. Relato de extenso envolvimento renal com *Leishmania donovani*, também foi feito por AGU *et alii*<sup>3</sup>. As lesões caracterizavam-se por palidez e aumento do volume renal, espessamento da membrana basal glomerular, distensão de túbulos contornados, constrição dos capilares glomerulares, e infiltração intersticial por células inflamatórias mononucleares. A avaliação quantitativa das células glomerulares ligadas *in vivo* com timidina, mostrou crescente proliferação de células glomerulares, à medida que a infecção progredia. Depósitos granulares de IgG, C<sub>3</sub> e fibrinogênio foram evidenciados nos glomérulos, tanto na membrana basal dos capilares, quanto no mesângio. Embora antígenos de *Leishmania donovani* não tenham sido

identificados neste estudo, os autores implicaram complexos antígeno-anticorpo na patogênese da glomerulonefrite proliferativa observada.

O desenvolvimento da amiloidose secundária como complicação experimental freqüente<sup>47</sup>, aspecto que não é observado na doença humana; a difícil obtenção de animais isogênicos, e os seus hábitos de hibernação reduzindo o período de reprodução<sup>44, 45</sup>, são desvantagens do hamster como modelo experimental da leishmaniose visceral.

### 3.4. A infecção em ratos.

Já se conhecia desde os experimentos de LAVERAN<sup>58</sup> e de ADLER & THEODOR<sup>2</sup>, que os ratos podiam ser infectados com *Leishmania donovani*. Entretanto são relativamente poucos os trabalhos a respeito encontrados na literatura. Esse fato concorre para que ainda sejam pouco conhecidos os diversos aspectos desse modelo experimental da leishmaniose visceral.

A inoculação intraperitoneal de numerosos *Sigmodon hispidus hispidus* com emulsão esplênica de hamsters<sup>44</sup> e de ratos<sup>45</sup> infectados com uma cepa indiana de *Leishmania donovani*; resultou que todos os animais adquiriram uma infecção de caráter progressivo, sem tendência à cura espontânea, havendo, entretanto, considerável variação individual no número de parasitos. Através de contagens detalhadas, verificaram que nas fases iniciais da infecção o número de parasitos presentes é maior em ordem decrescente no fígado, baço e medula óssea. Nas fases tardias o baço continha maior número de parasitos que qualquer outro órgão. Duas semanas após a infecção o fígado exibia áreas de hiperplasia focal, às vezes acompanhadas de infiltrado inflamatório mononuclear e alguns eosinófilos. Quatro semanas após a infecção, essas áreas de hiperplasia eram mais numerosas, acompanhadas de células inflamatórias mononucleares. Nesta época, puderam encontrar amastigotas em 50% dos casos. Seis semanas após a infecção, os parasitos eram abundantes tanto no fígado quanto no baço. A extensão da infil

tração celular variou consideravelmente de animal para animal, e aparentemente não se relacionava com o número de parasitos presentes. O infiltrado inflamatório era constituído predominantemente de células mononucleares, e ocorria mais abundantemente em áreas portais. O baço apresentava-se muito aumentado, devido a hiperplasia focal de células retículo-endoteliais da polpa vermelha. Na 80<sup>a</sup> semana pós infecção, observava-se no fígado um discreto aumento do tecido conjuntivo dos espaços porta, e pequenos focos de fibrose no parênquima, ou em torno de veias centrolobulares.

A infecção de 60 *Mystromys albicaudatus*, através de inoculação intracardíaca de 200.000 amastigotas de *Leishmania donovani* por grama de peso, permitiu a MIKHAIL & MANSOUR<sup>76</sup> observarem que o curso da infecção nestes animais apresenta um padrão caracterizado por aumento progressivo da densidade dos parasitos no fígado e baço, e por manutenção de altos níveis de parasitismo durante o período de observação de mais de um ano, sem sinais aparentes de doença ou tendência à cura espontânea.

A observação de que ratos da espécie *Clethrionomys glareolus* criados em cativeiro são susceptíveis a cepas africanas e mediterrâneas de *Leishmania donovani*, sugeriu a KRAMPITZ *et alii*<sup>55</sup>, que tais animais podem ser hospedeiros mais convenientes que outros roedores de laboratório para estudar a infecção.

O isolamento de cepas de *Leishmania donovani infantum* obtidas de *Rattus rattus*, procedentes de algumas regiões da Itália, estimulou a GRADONI *et alii*<sup>49</sup> a estudarem a infecção experimental nestes animais. Notaram que os roedores apresentavam considerável resistência aos parasitos, exibindo baixos níveis de parasitismo por um longo período.

Os ratos são animais de fácil obtenção e manuseio, tem baixo custo de aquisição e manutenção; se reproduzem bem em cativeiro e tem uma vida relativamente longa, se prestando a estudos de longa duração. No entanto, a relativa resistência e a pouca uniformidade de resposta diante dos parasitos, são desvantagens desses animais como modelo experimental da

leishmaniose visceral.

### 3.5. A infecção em camundongos.

A particularidade dos camundongos desenvolverem infecção visceral quando inoculados intraperitonealmente com formas tissulares e de cultura de *Leishmania donovani*, já era conhecida desde os experimentos de LAVERAN<sup>58</sup> e CHRISTOPHERS *et alii*<sup>31</sup>; tendo sido confirmada posteriormente por PHILIPPE & CHADLI<sup>87</sup>.

A demonstração de que a via de inoculação endovenosa é a que apresenta os melhores resultados em termos de positividade foi feita por PARONIKYAN<sup>83</sup>. Neste experimento, utilizando parasitos de cultura, pôde notar que a dose mínima infectante era de 10.000 flagelados.

Quase ao mesmo tempo, STAUBER<sup>111</sup> estabeleceu bases quantitativas para a infecção; e ACTOR<sup>1</sup> estudando a influência da dieta no curso da infecção, observou que nestes animais, tanto a deficiência proteica quanto vitamínica podem aumentar a gravidade da leishmaniose visceral.

Em trabalho fundamental, BRADLEY<sup>20</sup>, estudando a leishmaniose visceral em camundongos isogênicos, notou que o curso da infecção varia a depender da linhagem observada. Em 30 diferentes linhagens, inoculadas endovenosamente com 10.000.000 amastigotas de uma cepa africana de *Leishmania donovani*, cerca da metade apresentou resistência natural. As linhagens restantes, após um aumento do parasitismo celular por semanas ou meses, recuperaram-se então da infecção; como exceção, a linhagem PO apresentou um parasitismo celular progressivo, que após dois anos da infecção mostrava muitas semelhanças com a doença humana. Nesses camundongos, seguindo-se à inoculação endovenosa, observou que a maioria dos parasitos foram fagocitados por macrófagos do fígado e do baço; e nas infecções crônicas surpreendeu nestes órgãos um grande número de parasitos. Em menor número, encontrou ainda parasitos em macrófagos dos linfonodos, paredes alveolares, vilosidades intestinais e dos rins. Através de estudo ultraestrutural, observou no fígado

dos camundongos desta linhagem, a maioria das amastigotas encontradas em macrófagos, havendo entretanto alguns parasitos no interior de hepatócitos; com estas células aparentemente não sofrendo alterações pela presença dos elementos parasitários.

Mais tarde, BRADLEY & KIRKLEY<sup>19</sup>, estudaram o curso da infecção em sete linhagens de camundongos de laboratório, com avaliação da carga parasitária hepática durante período de observação de cerca de 20 semanas. Na fase aguda, o parasitismo celular variou grandemente entre as diferentes linhagens. As linhagens A2G, G2H, HR e Ash, apresentaram-se resistentes na fase aguda; enquanto PO, B10D2 e NMRI mostravam-se muito susceptíveis nesta fase. Os animais da linhagem NMRI apresentaram uma diminuição significativa no número de parasitos na décima primeira semana de infecção; por outro lado, os camundongos PO mostravam níveis elevados de parasitismo do sistema fagocítico mononuclear mais de dois anos após a infecção.

Logo a seguir BRADLEY<sup>18</sup>, avaliando os níveis de parasitismo da fase aguda em 25 linhagens de camundongos isogênicos, infectados com *Leishmania donovani*; notou dois padrões constantes e distintos, o que permitiu agrupá-los em susceptíveis e resistentes. Híbridos obtidos da mesma categoria se assemelhavam em susceptibilidade a seus ancestrais. Estudos de cruzamento mostraram que os fenótipos de resistência ou susceptibilidade são controlados por alelos de um locus único, com a resistência apresentando dominância incompleta sobre a susceptibilidade.

Posteriormente, BRADLEY *et alii*<sup>21</sup> mapearam o locus controlador da susceptibilidade à leishmaniose visceral no camundongo; confirmando que esse controle é exercido por um gen em locus único, designado Lsh, não ligado ao complexo de histocompatibilidade maior.

Algumas informações sobre esse modelo experimental de leishmaniose visceral foram acrescentadas com a demonstração de que camundongos atímicos são mais susceptíveis à *Leishmania donovani*<sup>109</sup>, e que a atividade das células "natural killer" (NK) pode desempenhar um papel importante no controle da infecção<sup>54</sup>. Além disso, determinou-se que a injeção intra-

venosa de BCG é tanto profilática quanto terapêutica em camundongos BALB/c contra amastigotas de *Leishmania donovani*<sup>107</sup>, e que a cortisona e a ciclofosfamida suprimem tais efeitos protetores<sup>109</sup>.

Estudando os aspectos imunológicos da leishmaniose visceral murina em algumas linhagens isogênicas, REZAI *et alii*<sup>93</sup> confirmaram algumas observações feitas anteriormente por BRADLEY, e puderam dividir os animais em dois grupos: os altamente susceptíveis e os relativamente não susceptíveis. Anticorpos específicos foram detectados nas linhagens susceptíveis, no décimo segundo dia após infecção, seguindo-se um aumento progressivo dos seus níveis. Nas linhagens menos susceptíveis, os anticorpos apareceram algum tempo depois, e permaneceram em níveis aproximadamente constantes. Nas linhagens CAF1, C57BL/6 e BALB/c, a reatividade cutânea ao antígeno leishmaniótico desenvolveu-se quando a carga parasitária declinou dos seus valores máximos. Essa reatividade cutânea não foi observada em animais da linhagem DBA/1, os mais susceptíveis; nem nos camundongos A/j, os mais resistentes.

Ainda seguindo a orientação de estudar aspectos relacionados ao curso da leishmaniose visceral murina, é interessante lembrar os resultados obtidos por PREMVATI<sup>88</sup>, que infectou experimentalmente camundongos machos, linhagem B10.LP-a, com 5.000.000 amastigotas injetadas endovenosamente; não tendo observado esplenomegalia ou hepatomegalia nas duas primeiras semanas de infecção, quando aumentava o número de parasitos nestes órgãos. O aumento máximo de peso do fígado e baço ocorreu na quinta semana pós infecção, quando a população de parasitos começava a declinar. Da mesma forma REINER<sup>91</sup>, examinou algumas alterações patofisiológicas em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania donovani*. Os animais desenvolveram infecção crônica com hepatoesplenomegalia e hipergamaglobulinemia. Os camundongos inoculados endovenosamente com 20.000.000 amastigotas, em contraste com os que receberam 800.000 e 4.000.000 não foram capazes de reduzir a carga parasitária hepática no período de oito semanas de observação. A hepatomegalia mensurada na oitava semana pós infecção era diretamente proporcio-

nal ao inóculo recebido.

Os estudos enfocando os aspectos histopatológicos da leishmaniose visceral murina são ainda pouco numerosos. Nessa linha de trabalho, GUTIERREZ *et alii*<sup>50</sup>, estudaram algumas alterações histopatológicas do fígado, baço e medula óssea, em camundongos BALB/c infectados endovenosamente com  $2 \times 10^7$  amastigotas da cepa 2S de *Leishmania donovani*. Observaram que os granulomas foram as lesões histológicas mais importantes, e que seu número a nível hepático aumentou até a oitava semana pós infecção, diminuindo em seguida. Notaram que o processo de formação dos granulomas é dinâmico, com regressão dos granulomas maduros para granulomas mal formados, que finalmente resolveram-se sem seqüelas. Em contraposição, no baço e medula óssea não observaram formação de granulomas maduros.

A tratabilidade, o pequeno tamanho, a facilidade de reprodução em cativeiro, o baixo custo de aquisição e manutenção, fazem do camundongo o animal favorito para estudo em pesquisa biomédica de laboratório. A utilidade do camundongo para esses experimentos foi grandemente aumentada pelo desenvolvimento de linhagens isogênicas, com alto grau de uniformidade de respostas diante de todos os tipos de tratamentos físicos e fisiológicos; tornando-os animais de escolha para uma grande variedade de experimentos, e permitindo o uso de menor número de animais, sem prejudicar a precisão da avaliação do tratamento.

Os camundongos isogênicos portanto reúnem condições de se constituírem em modelo experimental alternativo para o estudo de diversos aspectos da leishmaniose visceral.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. ANIMAIS

#### 1.1. Generalidades.

Foram utilizadas duas linhagens de camundongos isogênicos: DBA/2 e C57BL/10 provenientes da Universidade Federal Fluminense, R.J., de ambos os sexos, com idade variando entre seis e dez semanas, e pesando entre 15 e 22 gramas no começo do experimento.

Os animais foram separados em caixas apropriadas, e mantidos à temperatura ambiente, no Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ/UFBa.), Salvador, Bahia; alimentados com ração Agrovita "cativ 1" para camundongo, granulada sem antibióticos (RAÇÕES AGROVITA LTDA., S.P.); e água *ad libitum*.

#### 1.2. Divisão dos grupos experimentais.

Grupo I - trinta e cinco camundongos DBA/2, infectados e sacrificados em número de 4 a 8 animais cada vez após 1, 3, 5, 10, 20 e 38 semanas.

Grupo II - quatro camundongos DBA/2 normais, sacrificados 10 semanas após o início do experimento. Grupo controle.

Grupo III - quarenta e sete camundongos C57BL/10, infectados e sacrificados em número de 4 a 8 animais cada vez, após 1, 3, 5, 10, 20, 38, 57, 66 e 70 semanas.

Grupo IV - onze camundongos C57BL/10 normais, cinco sacrificados 10 semanas, e seis sacrificados 66 semanas após o início do experimento. Grupo controle.

## 2. PARASITOS

Para infectar os animais, foram utilizados amastigotas de *Leishmania donovani chagasi*, cepa Imperatriz.

A cepa foi isolada da medula óssea de um paciente com leishmaniose visceral, por P.D. MARSDEN em 1979, em meio NNN e mantida por 2 anos em hamsters através de passagens mensais. Culturas foram feitas do baço de hamsters infectados, em NNN ou LIT, por aproximadamente 2 meses, sendo então feito o isolamento fresco.

O paciente que deu origem à cepa, tratava-se de um homem de 51 anos de idade, proveniente de Imperatriz, Maranhão, Brasil; com discrasia sanguínea, na presença de baixos níveis de parasitismo. Clinicamente apresentava intensa epistaxis, hemorragia digestiva de 7 dias de duração, e mal estar geral por aproximadamente 40 dias. O baço era palpável à inspiração profunda. O estudo hematológico mostrou uma anemia moderada, leucopenia e profunda trombocitopenia. Tendo respondido bem ao tratamento com antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime, Rhodia), por 10 dias.

A cepa foi utilizada nos seguintes experimentos publicados: MARSDEN *et alii*<sup>68</sup>; REED *et alii*<sup>90</sup>.

A infecção experimental em hamsters e camundongos, com esta cepa, causa repetidamente altos níveis de parasitismo. A injeção intracardíaca de  $10^7$  amastigotas é rotineiramente fatal para hamsters em 6 a 10 semanas.

A cepa foi caracterizada como pertencente ao grupo *Leishmania donovani* por isoenzimas e enzimas de restrição do KDNA. Encontrando-se depositada nos seguintes laboratórios: FIOCRUZ, R.J. (Dr. Gabriel Grimaldi); WALTER REED ARMY INSTITUTE (Dr. Larry Hendrickt); CORNELL UNIVERSITY MEDICAL COLLEGE (Dr. Jan Kiethly).

## 3. INFECÇÃO EXPERIMENTAL DOS CAMUNDONGOS.

3.1. Isolamento de amastigotas de *Leishmania donovani chagasi* do baço de hamsters.

Em linhas gerais, o baço infectado foi removido assepticamente e homogeneizado em Hank's BSS gelada, e colocado em gelo por 10 minutos. Após o que o sobrenadante foi filtrado através de gaze com ruptura da suspensão por 4 passagens em agulha calibre 22. A suspensão foi então centrifugada a 250g por 10 minutos, o sobrenadante coletado e centrifugado novamente a 250g por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi coletado e centrifugado a 2.100g por 15 minutos, com lavagens dos "pellets" por 3 vezes em Hank's DNAase (20-30mg/ml), centrifugando a 2.100g por 15 minutos. Lise de RBC'S em  $\text{NH}_4\text{Cl}$ : Tris (9:1) por incubação a 37°C por 3 a 5 minutos ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,83%; Tris 0,17M, pH 7,7). Seguindo-se diluição após incubação com Hank's + FCS 5% gelado e centrifugado a 2.100g por 20 minutos; e ressuspensão dos "pellets" em 24ml de PBS/baço e camada de 4ml em gradiente gelado (geralmente usa-se 6-8 gradientes/baço). Preparo do gradiente com antecedência como segue: Em um tubo, colocou-se 2ml de Ficoll 34% em PBS, sobre o que acrescentou-se 2ml de Ficoll a 10% em PBS, adicionando-se em seguida 4ml da suspensão, e centrifugando a 1500g por 30 minutos. A interfase entre as camadas correspondentes a 10% e 34% foi removida, diluída com 10 volumes de PBS, e centrifugada a 4.200g por 15 minutos. Os "pellets" foram lavados 3 vezes em PBS a 4.600g por 10 minutos; com passagem da suspensão final por 4 a 5 vezes, através de agulha 22. Os "pellets" devem ser virtualmente livres de contaminação por células do hospedeiro<sup>43</sup>.

### 3.2. Cálculo do inóculo e método de infecção.

A suspensão final foi ajustada para  $10^7$  amastigotas por mililitro em solução salina glicosada tamponada.

Os animais foram infectados com um total de  $2 \times 10^6$  amastigotas, em um volume de 0,2ml, injetados intravenosamente, utilizando-se a veia da cauda.

## 4. PROCEDIMENTOS GERAIS.

#### 4.1. Sacrifício dos animais.

Os animais depois de pesados, foram anestesiados superficialmente com éter, e exsanguinados para impedir que houvesse congestão visceral intensa.

Imediatamente após, ambos os rins foram retirados. Com o direito sendo empregado para testes de imunofluorescência em tecido; e o esquerdo para estudo histológico.

Fragmentos de tecido de fígado, baço, pulmões, timo e linfonodos mesentéricos foram também submetidos a processamento histológico.

No ponto biológico correspondente a dez semanas de infecção, a pata traseira esquerda dos animais foi seccionada e também submetida a processamento histológico.

#### 4.2. Determinação da carga parasitária.

Utilizou-se o método preconizado por STAUBER<sup>114</sup>: usando-se fragmentos de fígado e baço infectados, após remoção do excesso de sangue em papel filtro, sobre uma lâmina limpa, fez-se cerca de vinte impressões da superfície de corte de cada órgão; fixou-se com metanol, e corou-se pelo Giemsa por 30 minutos.

Em microscópio Olympus "standard", com um aumento de 1.000 vezes, contou-se em vários campos o número de amastigotas e de núcleos celulares, até que o valor deste chegasse a 1.000; calculando-se então a relação entre esses dois números. Essa relação quando multiplicada pelo peso do órgão em miligramas e por um fator de correção equivalente a 200.000, aceitando-se a distribuição uniforme dos parasitos no fígado e baço do hospedeiro, dá um valor que representa aproximadamente a carga parasitária total do órgão estudado<sup>111, 113</sup>.

#### 4.3. Obtenção de soro imune.

Usou-se coelho branco, fêmea, com 2 meses de idade; e *Leishmania donovani chagasi*, cepa WR (caracterizada por iso

enzimas), em Schneider's Drosophila medium + 20% de soro fetal bovino. Promastigotas de *Leishmania donovani chagasi* foram congeladas e descongeladas 15 vezes e centrifugadas a 30.000g por 1 hora. Empregou-se o sobrenadante. A concentração de proteínas foi determinada pela técnica de LOWRY<sup>62</sup>.

Método de imunização: dois mg de adjuvante incompleto de FREUND, foi injetado no coelho subcutaneamente; repetindo-se um e dois meses após. Duas semanas depois da última injeção subcutânea, injetou-se intravenosamente 50mg de antígeno em salina; repetindo-se 2 semanas após. A exsanguinação foi feita 4 dias depois da última injeção intravenosa de antígeno. O soro imune foi obtido do sangue coletado por centrifugação a 250g por 15 minutos.

Titulagem de anticorpos do soro: dez  $\mu$ l de *Leishmania donovani chagasi* cepa WR ( $5 \times 10^6$  promastigotas/ml em PBS + formol a 0,5%), foram colocadas sobre cada escavação circular de uma lâmina de vidro (10 escavações em cada lâmina), e deixadas secar em estufa a 37°C. O soro foi diluído em salina, inicialmente 1:10, e a seguir, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:1640, 1:1280 e 1:2560. Dez  $\mu$ l de cada soro, nas diferentes diluições, foram colocadas sobre cada escavação circular com os antígenos deixados incubar em câmara úmida por 30 minutos, e lavados 3 vezes em PBS por 5 minutos cada vez; secados cuidadosamente e em seguida expostos por 30 minutos em câmara úmida ao conjugado fluoresceinado fração cabra anti IgG de coelho (Cappel Laboratories, U.S.A.), em volume de 10  $\mu$ l, diluído a 1:60 em azul de Evans 1:10000 em salina; lavados 3 vezes em PBS por 5 minutos de cada vez, e secados cuidadosamente. A leitura foi feita em microscópio de fluorescência American Optical, observando-se fluorescência até a 6a. diluição, correspondendo a um título de anticorpos no soro de 1:320.

#### 4.4. Processamento histológico e técnicas de coloração para microscopia óptica.

Blocos de tecido com diâmetro máximo de 5mm, logo após a remoção, foram colocados em solução de BOUIN (70% de so

lução saturada aquosa de ácido pícrico, 23% de solução de formol a 40%, 7% de ácido acético glacial); preparado momentos antes de ser utilizado.

Os fragmentos foram fixados por 12 a 20 horas, sendo em seguida lavados em álcool à 50% por 2 a 4 horas, e armazenados em álcool à 70%.

Para estudar a medula óssea, as patas foram mergulhadas em solução aquosa de ácido nítrico a 5% até que a descalcificação fosse completa.

Os fragmentos de tecido, com exceção dos de rim, foram processados em uma máquina Autotechnicon mono modelo 2A (Technicon Instruments Corporation - U.S.A.). Os fragmentos de rim foram processados manualmente à quente. Este procedimento preserva bem o tecido, e permite obter secções finas<sup>2 3</sup>.

A seguir todos os fragmentos de tecido foram embebidos (dois banhos de 2 a 3 horas cada, à 60°C); e logo após incluídos em parafina (Reagen, Quimibrás Indústrias Químicas, R.J.).

Empregando-se micrótomo (American Optical 820 Spencer, U.S.A.), obtiveram-se cortes finos de aproximadamente dois micrômetros dos blocos de rim, e de cinco micrômetros dos blocos dos demais órgãos estudados.

Todos os órgãos foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). As secções do rim, além do HE, foram submetidas segundo técnicas padronizadas<sup>6 4</sup> às colorações de: PAS (reação do ácido periódico de SCHIFF), PASM (ácido periódico-prata metanamina), tricrômico de MASSON, e a de AZAN (azul de anilina). Algumas secções de fígado foram também coradas pelas técnicas de Gomori para reticulina, Perls para ferro e pelo PAS e algumas das secções de baço pelo PAS, vermelho congo e violeta de metila.

#### 4.5. Preparo do tecido renal para estudo de imunofluorescência.

Blocos com fragmentos de tecido renal congelados em nitrogênio líquido, e mantidos até o momento do uso à tempera

tura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , foram presos em porta-blocos apropriado; e usando-se criôtomos (Cryo microtome, modelo 1500, LIPSHAW-MANUFACTURING COMPANY, DETROIT, U.S.A.), obteve-se seções de aproximadamente 4 micrômetros; que foram a seguir fixadas em acetona gelada e deixadas secar, sendo após guardadas em frasco hermético contendo sílica-gel, a  $4^{\circ}\text{C}$  e usadas dentro de 24 a 48 horas.

Para a feitura de imunofluorescência direta, utilizou-se conjugado fluoresceinado fração cabra, anti IgG, anti IgM e anti  $\text{C}_3$  de camundongo, obtidos no comércio (Cappel Laboratories / C. Chranville, P.A., U.S.A.). O conjugado foi diluído a 1:60 com o azul de Evans 1:10.000 em salina. As lâminas com os cortes, depois de colocadas em salina tamponada com microlitos do conjugado específico, a seguir foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos, após o que lavadas em PBS e montadas com tampão de pH 9.

Para a feitura de imunofluorescência indireta, os cortes de rim foram tratados, sem eluição prévia, com 20 microlitros de soro imune de coelho diluído 1:10 em PBS, por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente; lavados em PBS, e a seguir cobertos com 20 microlitros de conjugado fluoresceinado fração cabra, anti IgG de coelho (Cappel Laboratories), diluído a 1:60 com azul de Evans 1:10.000 em salina; por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente, após o que foram lavados em PBS e montados com tampão de pH 9. Para os controles, utilizou-se soro de coelho normal.

A leitura foi feita em microscópio Zeiss de fluorescência com lâmpada de mercúrio de alta pressão HBO 50W, equipado com objetivas Neofluar, condensador de epifluorescência IV FI, filtro de atenuação vermelha BG38, e com câmara automática anexa.

#### 4.6. Contagem e mensuração dos granulomas hepáticos.

Em microscópio óptico, usando a objetiva de 40X, e uma ocular micrométrica a tambor OSM-OLYMPUS (ocular de medição tipo Ramsden, de aumento 10X com escala óptica interna de 8mm, dividida em oito intervalos, cada intervalo mede 1mm e é subdividido em 100 intervalos no tambor externo), delimitou-se o objeto a medir girando o tambor, o que desloca uma cruz e dois traços verticais internos. O tamanho real do objeto é dado multiplicando-se o número de intervalos do tambor correspondente à medida, por 0,22 micrômetros (valor micrométrico da objetiva de 40X).

Primeiro foi medido o maior diâmetro do granuloma, a seguir a ocular micrométrica sofreu uma rotação de 90°, e foi determinado o maior diâmetro perpendicular ao primeiro. A média aritmética desses dois valores foi tomada e aceita como representante do diâmetro do granuloma.

Examinou-se pelo menos três secções histológicas de cinco micrômetros de espessura, de tamanho aproximadamente igual, coradas pelo HE e provenientes do lobo direito do fígado de cada animal; com medição de todos os granulomas representados na secção histológica, em um mínimo de 10 e um máximo de 100 granulomas por grupo.

O número de granulomas por centímetro quadrado da secção histológica foi calculado usando-se uma grade calibrada que delimita uma área de um milímetro quadrado, colocada sobre a lâmina. Todos os granulomas maduros, em dez espaços da grade escolhidos ao acaso, foram contados.

#### 4.7. Cálculo do Índice hepático e esplênico.

Para calcular o índice hepático e esplênico empregou-se a razão entre a relação das médias de peso do órgão em questão e do peso corporal dos animais infectados, e a relação da média de peso do mesmo órgão e do peso corporal dos animais normais.

$$\left[ \frac{\text{peso do órgão}}{\text{peso corporal}} \text{ dos infectados} \div \frac{\text{peso do órgão}}{\text{peso corporal}} \text{ dos normais} \right]$$

#### 4.8. Mensuração dos glomérulos renais.

Para medir os glomérulos empregaram-se secções finas de 2 micrômetros de espessura. Utilizando-se procedimento semelhante ao usado para medir os granulomas hepáticos, o diâmetro dos glomérulos foi mensurado. Foram considerados pelo menos cinco glomérulos para cada animal dos diferentes grupos, nos quais a secção passava através do polo vascular. Dois diâmetros (um passando através do hilo e outro no maior diâmetro perpendicular ao primeiro) foram medidos, tomando-se a média desses dois valores. O glomérulo foi considerado como uma esfera e seu volume foi calculado pela fórmula  $V = \frac{4}{3} \pi R^3$ , onde R é a metade do diâmetro.

#### 4.9. Avaliação dos depósitos glomerulares.

Uma avaliação semiquantitativa dos depósitos de imunoglobulinas, C<sub>3</sub> e antígeno de *Leishmania donovani chagasi* nos glomérulos foi estabelecida como segue: - = fixação negativa ou não significante; ± = deposição segmentar em alguns glomérulos; + = pequena deposição em todos os glomérulos; ++ = grande deposição em todos os glomérulos.

#### 4.10. Análise estatística e representação gráfica.

Todos os dados apresentados nas figuras são valores

médios. As linhas verticais sobre o ponto médio representam 2 desvios padrões da média.

O teste "t" de Student foi usado para avaliar a significância das diferenças entre as médias das duas linhagens de camundongos. O nível de significância escolhido foi 0,01. A comparação das distribuições quanto a variabilidade foi feita pelo coeficiente de variação de Pearson<sup>15</sup>.

## RESULTADOS

### 1. EVOLUÇÃO PONDERAL

#### 1.1. Peso corporal.

A variação do peso corporal dos camundongos da linhagem DBA/2, pode ser observada na tabela 1 e na figura 1. Note-se que não há diferença estatisticamente significativa entre os controles e os animais infectados; e que estes mostraram uma leve tendência a aumentar seu peso à medida que a infecção se tornava mais crônica.

A variação do peso corporal dos camundongos da linhagem C57BL/10, pode ser observada na tabela 2 e na figura 1. Note-se que durante a fase aguda, especificamente na terceira e quinta semanas pós infecção, os animais apresentaram emagrecimento que têm significância estatística; seguindo-se de aumento de peso progressivo e aproximadamente constante, a medida que a infecção se tornava mais crônica.

Quando se compara os animais das duas linhagens com mesmo tempo de infecção (figura 1), percebe-se diferença sem significância estatística.

#### 1.2. Peso do fígado.

A variação do peso do fígado dos camundongos DBA/2, pode ser observada na tabela 1. Note-se que não há diferença estatisticamente significativa em relação aos controles não infectados.

A variação do peso do fígado dos camundongos C57BL/10, pode ser observada na tabela 2. Note-se que não há diferença estatisticamente significativa em relação aos controles não infectados.

### 1.3. Índice hepático.

A variação da relação entre a média do peso do fígado e do peso corporal dos camundongos DBA/2, pode ser observada na tabela 1; e do índice hepático para estes mesmos animais na tabela 1 e na figura 2. Note-se que o índice hepático se mantém durante todo o período de observação com valores próximos de um, indicando o não desenvolvimento de hepatomegalia.

A variação da relação entre as médias do peso do fígado e do peso corporal dos camundongos C57BL/10, pode ser observada na tabela 2; e do índice hepático para estes mesmos animais na tabela 2 e na figura 2. Note-se que o índice hepático se mantém durante todo o período de observação com valores próximos de um, indicando o não desenvolvimento de hepatomegalia.

A comparação do índice hepático das duas linhagens em animais com o mesmo tempo de infecção (figura 2), revela não haver diferença importante na variação do índice hepático durante o período de observação.

### 1.4. Peso do baço.

A variação do peso do baço dos camundongos DBA/2, pode ser observada na tabela 1. Note-se que na vigésima e na trigésima oitava semanas pós infecção há diferença estatisticamente significativa em relação aos controles.

A variação do peso do baço dos camundongos C57BL/10, pode ser observada na tabela 2. Note-se que na décima, vigésima, trigésima oitava, quinquagésima sétima, sexagésima sexta e septuagésima semanas pós infecção, há diferença estatisticamente significativa em relação aos controles.

### 1.5. Índice esplênico.

A variação da relação entre a média do peso do baço e do peso corporal dos camundongos DBA/2, pode ser observada na tabela 1; e do índice esplênico para estes mesmos animais

na tabela 1 e na figura 3. Note-se que o índice esplênico se mantém com valores próximos de um até a décima semana pós infecção aumentando então e permanecendo com valores elevados até o final do período de observação.

A variação da relação entre a média do peso do baço e do peso corporal dos camundongos C57BL/10, pode ser observada na tabela 2; e do índice esplênico na tabela 2 e figura 3. Note-se que o índice esplênico se mantém com valores próximos de um até a quinta semana pós infecção, aumentando então e permanecendo com valores elevados até o final do período de observação.

A comparação do índice esplênico das duas linhagens, em animais com o mesmo tempo de infecção (figura 3), revela que em ambas há desenvolvimento de esplenomegalia nas fases mais crônicas da infecção, com os animais da linhagem C57BL/10, atingindo mais precocemente valores maiores que os da linhagem DBA/2.

## 2. EVOLUÇÃO DO PARASITISMO HEPÁTICO

A evolução da carga parasitária hepática total dos camundongos DBA/2, pode ser observada na tabela 3 e na figura 4. Note-se que nas três primeiras semanas de infecção, o número de parasitos é aproximadamente igual ao do inóculo, elevando-se discretamente na quinta e na décima semanas decrescendo então acentuadamente.

A evolução da carga parasitária hepática total dos camundongos C57BL/10, pode ser observada na tabela 4 e na figura 4. Note-se que já na primeira semana de infecção o número de parasitos é aproximadamente duas vezes e meia maior que o inóculo, aumentando grandemente até a quinta semana; decrescendo então paulatinamente até zero na septuagésima semana pós infecção.

A comparação das médias das cargas parasitárias hepáticas totais dos animais com o mesmo tempo de infecção (figura 4), revela uma diferença significativa estatisticamente entre as duas linhagens de camundongos, que já é patente na primeira semana e assim continua até a quinta semana. Na décima,

vigésima e trigésima oitava, semanas e o número de parasitos no fígado não tem diferença estatisticamente significativa.

### 3. EVOLUÇÃO DO PARASITISMO ESPLÊNICO

A evolução da carga parasitária esplênica total dos camundongos DBA/2, pode ser observada na tabela 5 e na figura 5. Note-se que há um aumento progressivo do número de parasitos, atingindo o máximo na vigésima semana, e declinando na trigésima oitava semana.

A evolução da carga parasitária esplênica total dos camundongos C57BL/10, pode ser observada na tabela 6 e na figura 5. Note-se que há um aumento progressivo do número de parasitos, atingindo o máximo na décima semana, e declinando progressivamente até a quinquagésima sétima semana, mantendo-se então em níveis aproximadamente iguais durante o restante do período de observação.

A comparação das médias das cargas parasitárias esplênicas totais dos animais com o mesmo tempo de infecção (figura 5), revela evolução com parasitismo progressivamente crescente em ambas as linhagens até a décima semana. Na vigésima segunda semana enquanto na linhagem DBA/2 os parasitos continuaram aumentando de número, na linhagem C57BL/10, observou-se tendência contrária, com o número de parasitos decrescendo acentuadamente. Na trigésima oitava semana, na linhagem DBA/2, há uma inversão de tendência com o nível de parasitos diminuindo, embora ainda permanecendo com valores maiores do que os observados na décima semana. Na linhagem C57BL/10, a tendência ao declínio se mantém.

### 4. ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

#### 4.1. Fígado.

O fígado em ambas as linhagens manteve-se com a arquitetura lobular preservada, durante todo o período de obser

vação.

As variações dos diâmetros médios dos granulomas hepáticos e do número de granulomas hepáticos por centímetro quadrado da secção histológica, podem ser observadas na figura 6 e na figura 7.

Nos camundongos DBA/2, o fígado, principalmente nas fases iniciais da infecção, manteve-se próximo da normalidade. As alterações observadas eram focais e muito discretas (figura 8). Tais alterações eram representadas inicialmente por pequenas coleções lobulares focais de mononucleares e mais tardiamente por granulomas macrofágicos que eventualmente apresentavam área de amolecimento e necrose central. A coloração para reticulina não demonstrou deposição de fibras colágenas nestes granulomas. O diâmetro médio dos granulomas hepáticos manteve-se durante o período de observação com valores próximos de 40 micrômetros, com uma leve tendência a aumentar nas fases mais crônicas da infecção. O número dos granulomas era baixo nas fases iniciais elevando-se progressivamente à medida que a infecção se tornava mais crônica, atingindo o máximo na trigésima oitava semana. Raramente observava-se células de Kupffer com alguns parasitos. Os espaços porta apenas tardiamente mostravam-se infiltrados por pequeno número de células inflamatórias mononucleares. Discreta quantidade de pigmento castanho em pequenos acúmulos era visto nos espaços porta e ocasionalmente nos granulomas, durante todo o período de observação. Tal pigmento, dava reação negativa para ferro e não se decolorava pelo permanganato de potássio e foi visto também nos controles normais, aparentemente não se relacionando com a infecção.

Nos camundongos C57BL/10, o fígado apresentava alterações conspícuas e difusas durante todo o período de observação. Na primeira semana pós infecção havia granulomas compostos de pequenos macrófagos e alguns linfócitos, distribuídos esparsamente pelo lóbulo. Esses granulomas eram arredondados, com bordas discretamente irregulares, diâmetro médio de 40µm e número médio por cm<sup>2</sup> da secção histológica de 10. Os espaços porta apresentavam discreto infiltrado inflamatório mono-

nuclear e pequena quantidade de pigmento castanho, com características semelhantes ao anteriormente descrito.

Na terceira semana (figura 9), havia em média 41 granulomas por  $\text{cm}^2$ , a maioria arredondados, com diâmetro médio de  $73\mu\text{m}$ ; compostos de poucas células epitelióides circundadas por histiócitos e colar de pequenos linfócitos, entremeados por raros polimorfonucleares neutrófilos. Alguns parasitos eram vistos no citoplasma de macrófagos e ocasionalmente no das células de Kupffer. Havia necrose hepatocelular isolada, notando-se escassos corpúsculos de Councilman. Os espaços porta apresentavam discreto infiltrado inflamatório mononuclear e pequena quantidade de pigmento castanho.

Na quinta semana, havia em média 56 granulomas por  $\text{cm}^2$ , arredondados, com diâmetro médio de  $71\mu\text{m}$ . A distribuição e composição celular dos granulomas era semelhante à da terceira semana, mostrando entretanto maior número de células macrofágicas, e maior tendência a coalescer (figura 10). Poucos parasitos eram vistos no citoplasma de macrófagos. Os aspectos de necrose hepatocelular isolada, com alguns corpúsculos de Councilman; e espaços porta com discreta infiltração de mononucleares, contendo pequena quantidade de pigmento castanho persistiam.

Na décima semana a média de granulomas era de 40 por  $\text{cm}^2$ , com diâmetro médio de  $55\mu\text{m}$ . Os demais aspectos observados eram semelhantes aos da quinta semana, notando-se além disso alguns polimorfonucleares neutrófilos subcapsulares.

Na vigésima semana, a média de granulomas era de 30 por  $\text{cm}^2$ , com diâmetro médio de  $56\mu\text{m}$ ; compostos de maior número de linfócitos. As lesões granulomatosas eram vistas tanto no parênquima quanto nos espaços porta, havendo maior tendência à localização subendotelial (figura 11). Os espaços porta exibiam moderado infiltrado inflamatório mononuclear linfocitário e continham discreta quantidade de pigmento castanho.

Na trigésima oitava semana a média de granulomas era 15 por  $\text{cm}^2$ , com diâmetro médio permanecendo estável. A distribuição e a composição celular dos granulomas eram similares às da vigésima semana. Às vezes, próximo a tais granu-

lomas notavam-se alguns corpúsculos de Councilman. A infiltração inflamatória mononuclear linfocitária de espaços porta tornou-se sensivelmente mais acentuada (figura 12), com muitas dessas células apresentando núcleos chanfrados. Notando-se de permeio alguns polimorfonucleares.

Na quinquagésima sétima semana tanto o número quanto o diâmetro dos granulomas hepáticos permaneceram estacionários. A composição celular era muito pouco diferente da observada na trigésima oitava semana, havendo menor número de células epitelioides e alguns polimorfonucleares, com raros focos de calcificação. Alguns hepatócitos mostravam poliploidia nuclear, com cromatina ocasionalmente dispersa. Nos espaços porta chamava a atenção o denso infiltrado inflamatório mononuclear linfocitário e escassos polimorfonucleares além de proliferação ductular (figura 13), com alguns ductos biestratificados ocasionalmente contendo células inflamatórias polimorfonucleares, configurando uma colangite (figura 14).

Na sexagésima sexta semana, o número e o diâmetro dos granulomas permanecia estacionário. As lesões distribuíam-se preferentemente em áreas subendoteliais, compunham-se de células epitelioides e eram envolvidas por fino halo eosinofílico (figura 15), ocasionalmente com área de amolecimento central (figura 16). Em alguns desses granulomas notavam-se focos de calcificação de vários tamanhos (figura 17). Nos sinusóides observava-se metaplasia mielóide com áreas multifocais de proliferação de megacariócitos (figura 18). Os espaços porta exibiam ainda edema discreto e moderado infiltrado inflamatório mononuclear, às vezes tendendo a infiltrar as bordas do parênquima (figura 19).

Na septuagésima semana (figura 20), os granulomas eram compostos predominantemente de linfócitos, ocasionalmente infiltrados por alguns polimorfonucleares, e com freqüência confluindo (figura 21). Os espaços porta permaneciam apresentando discreto a moderado infiltrado inflamatório mononuclear, e discreto pigmento castanho.

A coloração para reticulina demonstrou a partir da quinta semana pós infecção, escassa deposição de fibras colâ-

genas nos granulomas hepáticos. Tal aspecto se tornou discretamente mais acentuado à medida que a infecção se tornava mais crônica.

#### 4.2. Baço.

Nos camundongos da linhagem DBA/2 o baço apresentava alterações que embora discretas foram se acentuando à medida que a infecção se tornava mais crônica.

Na primeira, terceira e quinta semanas, a arquitetura esplênica estava preservada, não havendo evidências de formação de granulomas.

Na décima semana a arquitetura esplênica manteve-se preservada. Na polpa vermelha notavam-se ocasionais focos de hiperplasia histiocitária (figura 22) e áreas de depleção linfocitária (figura 23).

Na vigésima semana, a arquitetura esplênica apresentava-se distorcida por numerosos granulomas macrofágicos, às vezes circundados por coroa de pequenos linfócitos e ocasionalmente parasitados, distribuídos ao acaso na polpa vermelha (figura 24). Além disso, chamava a atenção atrofia da polpa branca e intensa depleção linfocitária da polpa vermelha.

Na trigésima oitava semana a arquitetura esplênica permanecia distorcida, entretanto com presença de menor quantidade de granulomas (figura 25), ao lado dos quais notavam-se numerosos megacariócitos. Os aspectos de atrofia da polpa branca e de depleção linfocitária da polpa vermelha persistiam.

Nos camundongos da linhagem C57BL/10, as alterações esplênicas eram mais conspícuas, também se tornando mais acentuadas à medida que a infecção se tornava mais crônica.

Na primeira e terceira semanas a arquitetura esplênica apresentava-se preservada. Havia ampliação da polpa vermelha com ocasionais focos de necrose de células isoladas, e depleção linfocitária discreta.

Na quinta semana a arquitetura esplênica mantinha-se preservada; havendo na polpa vermelha áreas de proliferação

celular, coleções focais de macrófagos e alguns acúmulos de pigmento acastanhado (figura 26).

Na décima semana já se apreciava distorção de arquitetura esplênica, com atrofia da polpa branca e aumento da polpa vermelha, onde se localizavam as alterações mais proeminentes. Tais alterações eram representadas por extensas áreas de reação epitelióide e formação de granulomas macrofágicos bem definidos, raramente parasitados, às vezes circundados por coroa de pequenos linfócitos e ocasionalmente tendendo a coalescer (figura 27).

Na vigésima semana, a arquitetura esplênica permanecia distorcida, persistiam a atrofia da polpa branca, hiperplasia celular e alguns granulomas macrofágicos na polpa vermelha.

Na trigésima oitava semana a arquitetura esplênica permanecia distorcida. A polpa vermelha apresentava-se discretamente hiperplasiada, com alguns focos de proliferação linfocitária e de plasmocitogenese.

Na quinquagésima sétima semana a arquitetura esplênica permanecia distorcida. A considerável ampliação da polpa vermelha com presença de granulomas, contrastava com o despoamento linfocitário dessa área. A atrofia da polpa branca era acentuada, percebendo-se ocasionalmente hialinização da artéria centro folicular.

Na sexagésima sexta semana a arquitetura esplênica permanecia distorcida. As alterações, além da presença dos granulomas macrofágicos e da atrofia da polpa branca, consistiam em deposição no espaço extracelular dos folículos linfóides, de material pouco espesso, hialino, eosinofílico e PAS fracamente positivo (figura 28). Tal material mostrava metacromasia com o violeta de metila, e afinidade pelo vermelho congo, apresentando tonalidade verde-maçã à luz polarizada.

O material anteriormente descrito, continuava a ser visto com as mesmas características na septuagésima semana (figura 29). Nessa época persistiam também a distorção da arquitetura esplênica, com acentuada atrofia da polpa branca; e polpa vermelha com muitos granulomas. Tais granulomas começa-

vam a ser circundados por alguns polimorfonucleares neutrófilos e por muitos linfócitos.

#### 4.3. Linfonodos.

Somente os linfonodos mesentéricos foram incluídos para processamento histológico e estudados.

Nos camundongos da linhagem DBA/2, os linfonodos mesentéricos apresentaram alterações discretas, com a arquitetura folicular mantendo-se preservada durante todo o período de observação.

Na primeira semana pós infecção havia discreta dilatação da zona hilar, e também discreta histiocitose dos seios medulares sem distribuição regular.

Na terceira semana os seios se diferenciavam mais nitidamente, observando-se uma hiperplasia reticular pronunciada.

Na quinta semana os aspectos observados anteriormente eram mais conspícuos; sendo dignos de nota uma proliferação de células linfóides em zonas paracorticais, e alguns acúmulos focais de macrófagos com ocasional formação de células gigantes multinucleadas, vistos nos seios medulares.

Na décima, vigésima e trigésima oitava semanas, persistiam os aspectos de hiperplasia reticular difusa e atrofia dos folículos linfóides corticais, com despovoamento progressivo de linfócitos.

Nos camundongos da linhagem C57BL/10, os linfonodos mesentéricos apresentaram alterações que apesar de discretas eram mais conspícuas do que as observadas nos camundongos da linhagem DBA/2. A arquitetura folicular esteve durante todo o período de observação igualmente preservada.

Na primeira e terceira semanas pós infecção os folículos linfóides apresentavam centros germinativos proeminentes, notando-se às vezes focos de reação epitelióide nos seios medulares (figura 30).

Na quinta, décima e vigésima semanas, a reação folicular era proeminente. Nos cordões corticais e medulares,

assinalava-se o aparecimento de plasmocitose sem distribuição regular (figura 31). Nos seios medulares a reação epitelióide observada anteriormente persistia.

Na trigésima oitava semana a plasmocitose e a reação epitelióide dos seios medulares acentuaram-se, percebendo-se ocasionalmente fusionalamento celular. Notava-se também discreta histiocitose de seios corticais.

Na quinquagésima sétima, sexagésima sexta e septuagésima semanas tornaram-se mais intensos os aspectos de plasmocitose dos seios e cordões, e histiocitose dos seios com fusionalamento celular e ocasional formação de células gigantes multinucleadas (figura 32).

Em um dos animais, na sexagésima sexta semana pós infecção, notava-se apenas uma célula gigante multinucleada exibindo pequena inclusão citoplasmática arredondada, de contornos regulares (figura 33).

#### 4.4. Timo.

O timo esteve representado em todos os pontos biológicos. Tal representação se deu de maneira inconstante e irregular, permitindo entretanto uma observação seqüencial.

Nos animais de ambas as linhagens estudadas a arquitetura do órgão esteve preservada, e a diferenciação entre a cortical e a medular foi evidente durante todo o período de observação.

Nos camundongos da linhagem DBA/2, o timo mostrou alterações muito discretas. Tais alterações começaram a ser notadas a partir da décima semana pós infecção, e consistiam em discreto aumento do número de células tímicas epiteliais na medular. Com a evolução da infecção, estas células se apresentavam mais frouxamente arranjadas. Na trigésima oitava semana pós infecção a cortical mostrava atrofia aparente, com discreta diminuição do número de linfócitos.

Nos camundongos da linhagem C57BL/10, o timo mostrou alterações que embora discretas foram mais conspícuas do que as observadas nos animais da linhagem DBA/2. Tais alterações

começaram a ser notadas a partir da vigésima semana pós infecção, consistindo em ampliação da medular com aumento discreto mas progressivo do número de células tímica epiteliais (figura 34). A partir da trigésima oitava semana a cortical exibia maior número de células grandes e de citoplasma abundante contendo material PAS positivo; ocasionalmente configurando aspecto em "céu estrelado".

#### 4.5. Medula óssea.

A medula óssea somente foi submetida a processamento histológico no ponto biológico correspondente a dez semanas de infecção. Tal fato se justifica por esse órgão poder ser melhor e mais adequadamente estudado por métodos hematológicos muito mais sensíveis do que os histológicos comuns, que no caso particular requerem descalcificação tecidual; processo que produz freqüentemente alterações citológicas.

Nos camundongos da linhagem DBA/2 não foram notadas quaisquer alterações seja na estrutura geral, seja nas linhagens celulares tanto quantitativa quanto qualitativamente. Também pouco foram encontrados elementos parasitários.

Nos camundongos da linhagem C57BL/10 observou-se uma aparente e discreta diminuição numérica de todas as linhagens celulares; proliferação de plasmócitos e de macrófagos (figura 35). Estes últimos vistos conspicuamente, freqüentemente formando pequenos granulomas. Muitas destas células histiocitárias continham pequena quantidade de pigmento castanho, semelhante ao encontrado no fígado e baço. Não foram vistos elementos parasitários nas secções examinadas apesar da pesquisa exaustiva.

#### 4.6. Pulmões.

Nos camundongos da linhagem DBA/2, os pulmões exceto pelo desenvolvimento de processo broncopneumônico em dois animais, na quinta e décima semanas respectivamente, não apresentaram alterações histológicas importantes durante o pe-

ríodo de observação.

Nos camundongos da linhagem C57BL/10, os pulmões mostraram algumas alterações, que embora discretas, tinham caráter evolutivo e foram vistas em todos os animais. As alterações mais conspícuas e importantes ocorreram nos septos interalveolares. Aparentemente de menor significado no processo patológico, durante todo o período de observação havia discreto aumento dos macrófagos alveolares, alguns deles visualizados nas luzes alveolares, ocasionalmente fagocitando pigmento acastanhado. Apesar da pesquisa exaustiva, a nível pulmonar, não foram encontrados elementos parasitários durante o período de observação, nem tampouco corpúsculos de inclusão viral, infiltração de células inflamatórias polimorfonucleares ou necrose do epitélio brônquico.

Na primeira semana pós infecção, havia múltiplos focos irregulares de espessamento septal mais numerosos no parênquima pulmonar próximos aos bronquíolos respiratórios, mas presentes também em regiões subpleurais. O espessamento septal era resultado de discreta congestão e edema, além de pequeno aumento da celularidade. Alguns acúmulos focais de células inflamatórias mononucleares eram vistos circundando principalmente brônquios, bronquíolos e vasos sanguíneos.

Na terceira semana as alterações eram discretamente mais acentuadas. Ocasionalmente notavam-se vasos sanguíneos com tumefação endotelial, apresentando algumas lesões nodulares em posição subendotelial, semelhantes às observadas no fígado, e compostas principalmente de macrófagos (figura 36).

Na quinta semana persistiam o espessamento septal e os focos de infiltração inflamatória peribrônquica e perivascular, às vezes vistos próximos a áreas subpleurais (figura 37).

Na décima semana, as alterações não mostraram mudanças importantes, tanto qualitativamente quanto quantitativamente.

Na vigésima e trigésima oitava semanas, os focos de infiltração inflamatória mononuclear começaram a apresentar discreta mudança na sua composição celular, com predomínio de plasmócitos e aparecimento de alguns macrófagos (fi-

gura 38).

Na quinquagésima sétima semana a composição celular dos focos inflamatórios consistia de alguns macrófagos, plasmócitos e linfócitos, esses últimos tendendo a predominar sobre os anteriores.

Na sexagésima sexta semana, esta tendência persistiu, acentuando-se na septuagésima semana. Nesse tempo um dos animais exibía área de reação gigantocelular em torno a depósitos de colesterol (figura 39), configurando foco de pneumonia colesterólica. Outro animal, sacrificado nessa mesma época, apresentou intensa reação linfoproliferativa e descamação celular para o interior do alvéolo.

Os animais normais que serviram de controles, apresentaram escasso tecido linfóide em localização peribrônquica que entretanto se tornava mais proeminente à medida que os animais envelheciam.

#### 4.7. Rins.

A variação do volume glomerular dos camundongos da linhagem DBA/2 e C57BL/10 pode ser observada na tabela 7. Note-se que em ambas as linhagens nas fases mais tardias da infecção, ocorreu um aumento significativo do volume glomerular.

Nos camundongos da linhagem DBA/2 o estudo do tecido renal não mostrou alterações importantes nas fases iniciais da infecção. Na trigésima oitava semana pós infecção, observaram-se alterações discretas e focais, representadas por discreto espessamento mesangial e discreta infiltração inflamatória mononuclear intersticial, mais conspícua no córtex e menos intensa na medular. As células inflamatórias compunham-se de linfócitos e plasmócitos, algumas vezes vistas em pequenos acúmulos focais em torno de alguns glomérulos (figura 40), e mais escassamente em posição peritubular. Nessa época, um dos animais apresentou lesões focais de pielonefrite crônica, com discreto componente exsudativo.

Nos camundongos da linhagem C57BL/10 o estudo histológico do tecido renal mostrou algumas alterações que além de

discretas e focais, somente começaram a ser observadas a partir da trigésima oitava semana pós infecção. Tais alterações em algumas áreas eram representadas por espessamento homogêneo do mesângio, mais nítido ao nível do hilo (figura 41), que às vezes se acompanhava de deposição de material PAS positivo. Em alguns glomérulos as alterações consistiam de aumento discreto e ocasional da celularidade (figura 42). Na sexagésima sexta semana pós infecção, em algumas áreas principalmente da cortical, o interstício apresentava discreto infiltrado inflamatório mononuclear difusamente distribuído entre os túbulos. Um dos animais sacrificados na septuagésima semana pós infecção, desenvolveu reação linfoproliferativa, exibindo a nível renal intensa atrofia tubular, esclerose vascular, cilindros no interior dos túbulos e presença de material amilóide no tecido intersticial ao redor dos túbulos alterados.

Os animais não infectados, após dez semanas do início do experimento exibiam às vezes alguns focos de pielonefrite crônica; e após 66 semanas, ocasionalmente apresentavam espessamento mesangial discreto.

##### 5. ESTUDO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA EM TECIDO RENAL.

Embora usando padronização técnica, as reações não foram feitas todas numa mesma ocasião.

Os resultados do estudo de imunofluorescência nos rins dos camundongos da linhagem DBA/2 estão sumarizados na figura 44. Tais resultados representam estimativa média de uma análise semiquantitativa dos depósitos glomerulares dos animais em cada ponto biológico.

Depósitos segmentares e granuloses de IgG em alguns glomérulos foram vistos em posição subendotelial na primeira, terceira, quinta, décima e trigésima oitava semanas pós infecção. Com características semelhantes, depósitos de IgM foram vistos na terceira e na décima semanas pós infecção; enquanto que a fração C<sub>3</sub> do complemento só foi detectada na décima semana pós infecção. O método utilizado não conseguiu demonstrar a presença de antígenos de *Leishmania* nos glomérulos. Os ca-

camundongos normais não apresentaram depósitos glomerulares.

Os resultados do estudo de imunofluorescência nos rins dos camundongos da linhagem C57BL/10 estão sumarizados na figura 45. Tais resultados representam estimativa média de uma análise semiquantitativa dos depósitos glomerulares dos animais em cada ponto biológico.

Depósitos segmentares e granulosos de IgG em alguns glomérulos foram vistos em posição subendotelial (figura 43), na terceira, quinta e vigésima semanas pós infecção. Na décima semana, tais depósitos eram vistos na grande maioria dos glomérulos. Com características semelhantes, depósitos de IgM foram vistos na décima, vigésima e trigésima oitava semanas pós infecção; enquanto que a fração C<sub>3</sub> do complemento foi vista na terceira, quinta e décima semanas pós infecção. Com o método utilizado, não se conseguiu demonstrar a presença de antígenos de *Leishmania* nos glomérulos. Os camundongos normais no ponto biológico correspondente a dez semanas exibiam em alguns glomérulos depósitos segmentares de IgG. No ponto biológico de sessenta e seis semanas, encontrou-se depósitos de IgM e da fração C<sub>3</sub> do complemento.

## DISCUSSÃO

A procura do modelo mais conveniente e adequado para o estudo dos diversos aspectos da leishmaniose visceral experimental ainda está longe de ser encerrada.

Ultimamente, dado a seu baixo custo, facilidade de manuseio e principalmente pela possibilidade de submetê-los a variados tratamentos biológicos, tem sido grande o interesse dos pesquisadores pelo uso dos camundongos isogênicos como modelo experimental desta infecção.

Embora várias linhagens de camundongos isogênicos se jejam susceptíveis de se infectarem cronicamente com *Leishmania donovani*, as manifestações da infecção nestes animais não são completamente conhecidas, e portanto as suas semelhanças com a leishmaniose visceral humana são ainda incertas e pouco precisas.

Os resultados do presente estudo, enfocando alguns aspectos da relação parasito-hospedeiro na leishmaniose visceral murina experimental, indicam claramente que os camundongos das linhagens observadas comportam-se diferentemente diante de uma exposição semelhante a formas amastigotas de *Leishmania donovani chagasi*.

As formas amastigotas de *Leishmania donovani* são primariamente parasitos das células do sistema fagocítico mononuclear; e em camundongos, segundo BRADLEY *et alii*<sup>20</sup>, seguindo-se a inoculação intravenosa a maior parte dos parasitos são fagocitados por macrófagos do fígado e baço, onde pode-se encontrar grande número de parasitos nas infecções crônicas.

Nos camundongos C57BL/10, o parasitismo hepático numa primeira fase aumenta acentuadamente até a quinta semana, diminuindo numa segunda fase até níveis tão baixos que não puderam ser detectados pelo método utilizado. Enquanto que nos camundongos DBA/2 o número de parasitos a nível hepático aumenta muito discretamente até a décima semana, diminuindo então paulatinamente.

Estas observações estão de acordo com as feitas ante

teriormente por BRADLEY<sup>18</sup> para estas duas linhagens de camundongos isogênicos.

Por outro lado, o parasitismo esplênico aumentou até a décima e vigésima semanas pós infecção, nos camundongos C57BL/10 e DBA/2 respectivamente, decrescendo então.

O número de parasitos no baço, determinado pelo método de contagem utilizado, foi sempre menor do que o observado a nível hepático; exceto nos camundongos C57BL/10 no ponto biológico correspondente à septuagésima semana, e nos camundongos DBA/2 na vigésima e trigésima oitava semanas pós infecção, quando aquele foi maior do que este. Além disso é digno de nota um fato anteriormente notado por REZAI *et alii*<sup>93</sup>, também observado no presente experimento, que o nível máximo de parasitismo esplênico foi atingido algumas semanas depois que o nível máximo do parasitismo hepático foi alcançado.

É interessante a observação de que o aumento do parasitismo esplênico nos camundongos C57BL/10 ocorreu simultaneamente com a diminuição do parasitismo hepático, e com a diminuição do número e tamanho dos granulomas hepáticos. Esse aspecto, como sugeriram GUTIERREZ *et alii*<sup>50</sup>, poderia estar relacionado com o despreendimento de macrófagos infectados ou mesmo de parasitos dos granulomas hepáticos em resolução; os quais entrariam na corrente circulatória alcançando o baço em maior número.

Nos camundongos DBA/2 também ocorreu aumento do parasitismo esplênico, ao mesmo tempo em que o número de parasitos a nível hepático diminuía. No entanto, o número dos granulomas hepáticos aumentou discreta mas progressivamente e seu tamanho permaneceu aproximadamente constante durante todo o período de observação.

Essa diferença de comportamento é difícil de ser justificada somente pelo mecanismo lembrado por GUTIERREZ *et alii*<sup>50</sup>, e sua explicação deve considerar as características imunológicas e genotípicas próprias de cada linhagem estudada.

A variável susceptibilidade das diversas linhagens de camundongos isogênicos à *Leishmania donovani* parece ser inicialmente controlada por gen ou grupos de gens em locus deno

minado Lsh, e influenciada pelo complexo H-2<sup>16,21</sup>. Entretanto, no caso particular faz-se necessário a distinção entre imunidade natural e imunidade adquirida. A imunidade natural ou inata a cada linhagem de camundongo, pode atuar limitando a proliferação parasitária na fase inicial da infecção; enquanto que a imunidade adquirida só se torna evidente a partir da quinta semana pós infecção, agindo de modo a diminuir o número de parasitos a nível hepático<sup>36</sup>.

As diferenças nas taxas de parasitismo hepático e esplênico em cada linhagem de camundongo, uma vez que a inoculação foi endovenosa, podem talvez estar relacionadas com uma atividade de filtração muito maior do fígado quando comparado com o baço, devido ao volumoso fluxo de sangue hepático<sup>88</sup>; mas também com diferenças específicas de cada órgão na população de linfócitos e macrófagos residentes.

Os aspectos anteriormente abordados, indicam que a relação parasito-hospedeiro, na dependência da sensibilidade orgânica e do desenvolvimento de mecanismos destrutivos eficazes, determina os níveis do parasitismo e de eliminação dos parasitos.

Estas diferentes respostas, peculiares de cada órgão e de cada linhagem de camundongo, implicam na necessidade de um maior entendimento dos eventos celulares específicos<sup>50</sup>.

Embora o papel desempenhado pela imunidade celular mediada por células T pareça ser da maior importância para o desenvolvimento da imunidade adquirida na leishmaniose visceral murina<sup>105,106</sup>, não se pode descartar completamente a possibilidade de haver uma associação pelo menos parcial entre esta e anticorpos humorais específicos<sup>52</sup>.

HERMAN<sup>51</sup> demonstrou num sistema *in vitro*, que sob certas condições específicas, o soro hiperimune de camundongo anti-amastigotas de *Leishmania donovani* através ação de anticorpos citofílicos e opsonizantes, exerce influência na ligação, fagocitose e parasitismo de macrófagos por esses parasitos.

A leishmaniose visceral murina experimental, nas duas linhagens de camundongos isogênicos observadas, caracteriza-

se histopatologicamente por lesões sistêmicas do tipo inflamatório, principalmente com formação de granulomas em vários órgãos e por plasmocitose difusa. Tais lesões, comparativamente foram mais proeminentes nos camundongos da linhagem C57BL/10 do que nos DBA/2; havendo um paralelismo entre as lesões histológicas mais acentuadas e a infecção mais exuberante, tendo como referência o parasitismo hepático e esplênico.

Não obstante a ausência, com o inóculo utilizado, de hepatomegalia no período de observação, o fígado foi indubitavelmente o principal órgão envolvido pela infecção.

As alterações hepáticas mostraram evolução dinâmica, representadas não só pela variação de tamanho e número dos granulomas, mas também pela alteração na sua composição celular. A partir da quinta semana pós infecção, os granulomas hepáticos começaram a ser infiltrados por linfócitos. Adicionalmente o número destas células nos espaços porta tornou-se maior com a evolução da infecção. Esse último aspecto foi mais intenso nos camundongos da linhagem C57BL/10.

Em conexão com estes dados, GUTIERREZ *et alii*<sup>50</sup> notaram mudanças na relação entre o número de granulomas hepáticos maduros e imaturos, ao longo da infecção de camundongos BALB/c.

A deposição discreta de fibras colágenas nos granulomas hepáticos dos camundongos C57BL/10, embora possa estar relacionada, não nos parece corresponder à fibrose hepática intralobular descrita por ROGERS<sup>94</sup>.

As alterações esplênicas mais significativas foram acentuada diminuição da população linfocitária, principalmente nas regiões timodependentes, e mais tardiamente hiperplasia histiocitária com formação de granulomas e focos de plasmocitogênese. Tais alterações são compatíveis com as relatadas por GUTIERREZ *et alii*<sup>50</sup> em camundongos BALB/c, e por MOREIRA<sup>79</sup> em hamsters.

A esplenomegalia observada nas fases mais tardias do experimento, é uma particularidade registrada com frequência nos casos de leishmaniose visceral humana<sup>7</sup>; e pode ser devida, segundo PREMVATI<sup>88</sup>, à enorme resposta proliferativa dos

tecidos infectados.

Adicionalmente o aparecimento, apesar de discreto, de amiloidose nos camundongos C57BL/10 a partir da sexagésima sexta semana pós infecção, contribuiu para o aumento do peso do órgão. Esse último aspecto pode ter determinado uma superestimação do parasitismo esplênico nas fases finais, uma vez que o método usado para o seu cálculo considera o peso do órgão. Nessa eventualidade, a tendência levemente crescente observada na curva de parasitismo esplênico dos camundongos C57BL/10 na septuagésima semana, seria facilmente explicável.

As alterações histológicas dos linfonodos mesentéricos apesar de discretas, se parecem em alguns aspectos com as descritas por VERESS *et alii*<sup>119</sup> em casos fatais de leishmaniose visceral humana.

Pouco temos a comentar sobre as alterações histopatológicas da medula óssea, exceto para assinalar o aparecimento nos camundongos C57BL/10, de pequenos granulomas bem definidos no ponto biológico correspondente a dez semanas pós infecção. GUTIERREZ *et alii*<sup>50</sup> observaram aspectos semelhantes em camundongos BALB/c, entretanto os granulomas permaneceram mal formados durante o período de observação de 24 semanas.

As discretas alterações pulmonares observadas, não nos permitiram caracterizar seguramente o quadro de pneumonite intersticial leishmaniótica descrito em casos de leishmaniose visceral humana<sup>7,8,89</sup>. As lesões granulomatosas subendoteliais ocasionalmente observadas, podem ser decorrentes de despreendimento de parasitos isolados ou de macrófagos infectados, a partir do fígado ou baço, que se alojaram a nível pulmonar sem necessariamente relacionarem-se com o quadro de pneumonite. As outras alterações inflamatórias notadas neste órgão podem ser inespecíficas, e tem sido observadas em outros animais mantidos no mesmo ambiente não "germ free".

Em relação às alterações renais, o emprego de técnicas rotineiras de microscopia óptica não permitiu a caracterização de maneira constante e clara, de depósitos ao nível glomerular, tampouco de aspectos de proliferação celular, seja endotelial, epitelial ou mesangial. A identificação inequívoca dessas células

las é possível unicamente em secções semifinas e ultrafinas. Usando tais técnicas, DUARTE *et alii*<sup>41</sup> demonstraram proliferação de células mesangiais duas a três semanas após infectarem hamsters com *Leishmania donovani*. Glomerulonefrite proliferativa em hamsters infectados também foi demonstrada por AGU *et alii*<sup>3</sup> através de técnica autoradiográfica usando timidina tritiada.

As discretas alterações inflamatórias observadas a nível renal, dependeriam de estudos sorológicos e bacteriológicos próprios para afastar uma possível etiologia bacteriana, antes de relacioná-las à infecção pela *Leishmania donovani chagasi*.

Contrastando com as discretas alterações renais observadas, a presença ocasional de alguns depósitos de imunoglobulinas e da fração C<sub>3</sub>, do complemento poderia sugerir que os depósitos glomerulares resultam da deposição de complexos imunes circulantes, como tem sido demonstrado em algumas doenças infecciosas<sup>122</sup>.

Nesse sentido, sugestão semelhante foi feita por BRITO *et alii*<sup>24</sup>, após observarem depósitos glomerulares de imunoglobulinas e depósitos mesangiais eletrodensos em três casos humanos. Entretanto, nestes casos, a possibilidade de que o envolvimento glomerular tenha sido coincidente não pode ser excluída desde que, em tais depósitos, antígenos de *Leishmania* não foram identificados.

A deposição de complexos imunes circulantes é considerada como o mais comum mecanismo imunopatológico de glomerulonefrite. No entanto, a demonstração desses complexos só é possível com a utilização de métodos sorológicos sensíveis<sup>12</sup>.

Recentemente, CARVALHO *et alii*<sup>12</sup>, estudando casos humanos de leishmaniose visceral através de técnicas radioimunológicas, não observaram diferenças estatisticamente significantes nos níveis séricos da fração C<sub>3</sub> do complemento e na presença e nos níveis de complexos imunes circulantes, comparando pacientes que apresentavam e pacientes sem indícios de doença renal.

Ressalte-se que o não encontro de antígenos de *Leishmania donovani chagasi* agregados aos depósitos de imunoglobulinas, nos moldes do presente trabalho, mesmo nas fases iniciais da infecção quando há excesso de antígeno circulante, não apóia a idéia de um mecanismo patogênético glomerular ligado a complexos imunes circulantes.

Alterações semelhantes amiúde são observadas em outras doenças infecciosas de longa duração, e não podem ser consideradas como especificamente relacionadas com esse agente etiológico particular<sup>24</sup>.

Estes aspectos devem ser interpretados com cautela, necessitando-se de novos estudos para melhor esclarecer este ponto.

A visão global da leishmaniose visceral humana permite que ela seja encarada da mesma forma que a hanseníase ou a leishmaniose cutâneo-mucosa, como uma doença contendo um espectro imunológico próprio. Reconhecendo-se dois pólos extremos: o de não resistência, definido pela própria leishmaniose visceral em sua forma avançada; e o de resistência, que incluiria as formas oligossintomáticas, ainda não bem caracterizadas clínico-patologicamente. Havendo possivelmente posições intermediárias entre estes dois extremos<sup>116</sup>.

Tal visão ressalta a importância de um modelo experimental adequado para o estudo das diversas particularidades espectrais da leishmaniose visceral.

Nesse particular, a leishmaniose visceral murina é um modelo no qual as reações do hospedeiro são variáveis e geneticamente determinadas, como talvez possa ser o caso no homem. Além disso, a possibilidade de manipulações experimentais, tais como por exemplo a manipulação do seu sistema imunológico, podem ser de utilidade na dissecação dos mecanismos das alterações imunes, e no estabelecimento da relação entre imunodepressão e o desenvolvimento da doença<sup>91</sup>.

Por estas razões, a leishmaniose visceral murina experimental em camundongos isogênicos é considerada como um bom modelo de doença espectral<sup>19,89</sup>.

Além de estudos imunopatológicos, de patogenia e de outros estudos básicos, é de se esperar que o modelo murino sirva amplamente para ensaios quimioterapêuticos ou imunoproliféricos e imunoterapêuticos. Espera-se também que a caracterização de alguns aspectos anatomopatológicos e imunopatológicos feita no presente trabalho, venha a ser de alguma utilidade para estes estudos futuros.

## CONCLUSÕES

01. Os camundongos isogênicos das linhagens DBA/2 e C57BL/10 podem ser infectados pela injeção endovenosa de  $2 \times 10^6$  amastigotas de *Leishmania donovani chagasi*; e esse inóculo não é letal para esses animais.

02. Os camundongos DBA/2 e C57BL/10 apresentam comportamento diferente diante do mesmo inóculo de formas amastigotas de *Leishmania donovani chagasi*.

03. Com o inóculo utilizado, nenhuma das duas linhagens estudadas desenvolveu hepatomegalia no período de observação.

04. Os camundongos da linhagem DBA/2 desenvolveram esplenomegalia, a partir da vigésima semana pós infecção; e os da linhagem C57BL/10 a partir da décima semana pós infecção.

05. O parasitismo hepático dos camundongos C57BL/10, com o inóculo utilizado, é maior significativamente do que o dos camundongos DBA/2 nos pontos biológicos correspondentes à primeira, terceira e quinta semanas pós infecção.

06. O parasitismo esplênico dos camundongos C57BL/10, com o inóculo utilizado, é maior significativamente do que o dos camundongos DBA/2 nos pontos biológicos da quinta e décima semanas pós infecção. Na vigésima e trigésima oitava semanas ocorre inversão desse aspecto, com o parasitismo esplênico dos camundongos DBA/2 tornando-se maior significativamente do que o dos camundongos da linhagem C57BL/10.

07. Na leishmaniose visceral murina as alterações histológicas mais importantes são do tipo inflamatório, representadas por reação granulomatosa em vários órgãos e por plasmocitose difusa.

08. As alterações inflamatórias são comparativamente mais precoces e mais conspícuas nos camundongos da linhagem

C57BL/10 do que nos da linhagem DBA/2.

09. Na leishmaniose visceral murina a formação de granulomas hepáticos é um processo dinâmico.

10. O diâmetro médio dos granulomas hepáticos dos camundongos da linhagem C57BL/10, durante todo o período de observação exceto na primeira semana é maior significativamente do que o dos camundongos da linhagem DBA/2. Enquanto o número de granulomas dos camundongos C57BL/10 é maior significativamente do que o dos camundongos da linhagem DBA/2 até a vigésima semana pós infecção.

11. Deposição de pequena quantidade de substância amilóide no baço somente ocorreu em alguns camundongos da linhagem C57BL/10 a partir da sexagésima sexta semana pós infecção.

12. As observações feitas no presente trabalho, levam-nos a considerar os camundongos isogênicos como um modelo experimental de doença espectral, que se correlaciona com alguns aspectos da infecção humana e que pode permitir o esclarecimento de alguns pontos ainda pouco claros da leishmaniose visceral.

## SUMMARY

The most suitable experimental model to study the different aspects of visceral leishmaniasis has not yet been established.

Recently, great interest has been devoted to the use of inbred strains of mice as experimental host for this infection. However, some manifestations of murine visceral leishmaniasis remains poorly understood, and hence their similarities to the human disease seem uncertain.

In the present study, we observed some histopathological and immunopathological aspects of the experimental infection, using inbred mice as experimental model.

DBA/2 and C57BL/10 strains were infected via the tail vein with  $2 \times 10^6$  amastigotes of *Leishmania donovani chagasi* obtained from Imperatriz, Maranhão. The animals were sacrificed at different time-intervals.

Body weight, spleen and liver weights, and parasite densities in liver and spleen were estimated. The histopathologic changes in liver, spleen, lymph nodes, thymus, bone marrow, lungs and kidneys were examined and respective findings appear below. Search of immunofluorescent studies in the kidney sections revealed only mild differences from control cases.

We observed great variations between the two mice strains studied in their responses to *Leishmania donovani chagasi*. This may be due to genetic as well as immunological differences.

In the earlier stages of infection, the liver parasite burdens were significantly greater in C57BL/10 mice than DBA/2 mice. The parasite burdens were lower in the spleen as compared to the liver.

The most important histologic lesions found were granuloma formation and diffuse plasmocytosis, which were more prominent in C57BL/10 mice.

The main affected organ was the liver, although no

hepatomegaly was observed.

Splenomegaly could be observed during the later phase of infection. Secondary amyloidosis of the spleen was observed 66 weeks after infection in C57BL/10 mice.

The present observations show that the spectrum of visceral leishmaniasis in these two strains of mice could be correlated with some aspects of human visceral leishmaniasis, and that the murine model could prove useful for future studies on immunology, immunoprophylaxis, pathogenesis and chemotherapy.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACTOR, P. Protein and vitamin intake and visceral leishmaniasis in the mouse. *Exper. Parasitolo.*, 10:1-20, 1960.
2. ADLER, S. & THEODOR, O. Skin infection in canine visceral leishmaniasis. *Brit. Med. J.*, 2:1179, 1931.
3. AGU, W.E.; FARRELL, J.P.; SOULSBY, J.L. Proliferative glomerulonephritis in experimental *Leishmania donovani* infection of the golden hamster. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 4:353-68, 1981.
4. ALENCAR, J.E. de *Calazar canino; contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil*. Fortaleza, 1959. 342p. Tese.
5. AMATO NETO, V. & BLANCO FILHO, F. Leishmaniose visceral adquirida no estado de São Paulo (Brasil). *Rev. Saúde públ. S. Paulo*, 15:643-5, 1981.
6. ANDRADE, Z.A. Aspectos morfológicos da disproteinemia do Calazar. *Rev. Assoc. Méd. bras.*, 5:413-21, 1959.
7. \_\_\_\_\_. *A patologia da Leishmaniose visceral (Calazar)*. Salvador, Faculdade de Medicina da UFBA., 1958. 53p. il. mimeog. Tese.
8. \_\_\_\_\_. Pneumonite intersticial no Calazar. *O Hospital (Rio de Janeiro)*, 55:371-81, 1959.
9. \_\_\_\_\_ & ANDRADE, S.G. Alguns novos aspectos da patologia do Calazar (estudo morfológico de 13 casos necropsiados). *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 8:259-66, 1966.
10. \_\_\_\_\_ & IABUKI, K. A nefropatia do Calazar. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 14:51-4, 1972.
11. AYALA, M.A.R. Alterações renais no Calazar canino espontâneo. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 7:353-8, 1973.
12. CARVALHO, E.M.; ANDREWS, B.S.; MARTINELLI, R.; DUTRA, M.; ROCHA, H. Circulating immune complexes and rheumatoid factor in visceral leishmaniasis and schistosomiasis. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 32:61-8, 1983.
13. BAMBIRRA, E.A.; TAFURI, W.L.; RASO, P. Alterações ultraestruturais do fígado na leishmaniose visceral (Calazar). Estudo de três casos. *Rev. Goiana Med.*, 26:47-54, 1980.
14. BENTLEY, C.A. A short note on the parasite of Kala-azar. *Indian med. Gaz.*, 39:81-2, 1904.

15. BERQUÓ, E.S.; SOUZA, M.P. de; GOTLIEB, S.L.D. *Bioestatística*, 1a. ed. rev., São Paulo, EPU, 1981.
16. BLACKWELL, J.; FREEMAN, J.; BRADLEY, O. Influence of H-2 complex on acquired resistance to *Leishmania donovani* infections in mice. *Nature*, 283:72-4, 1980.
17. BOGLIOLO, L. Nova contribuição ao conhecimento da anatomia patológica da leishmaniose visceral. A propósito de um caso brasileiro e especial referência à fibrose hepática leishmaniótica. *O Hospital* (Rio de Janeiro), 50:393-440, 1956.
18. BRADLEY, D.J. Regulation of *Leishmania* populations within the host. II Genetic control of acute susceptibility of mice to *Leishmania donovani* infection. *Clin. Exp. Immunol.*, 30:130-40, 1977.
19. \_\_\_\_\_ & KIRKLEY, J. Regulation of *Leishmania* populations within the host. I. The variable course of *Leishmania donovani* infections in mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 30:119-29, 1977.
20. \_\_\_\_\_; POOLE, J.C.F.; LAMB, R.M. Some observations on chronic visceral leishmaniasis of the mouse. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 67:21-2, 1973.
21. \_\_\_\_\_; TAYLOR, B.A.; BLACKWELL, J.; EVANS, E.P.; FREEMAN, J. Regulation of *Leishmania* populations within the host. III Mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.*, 37:7-14, 1979.
22. BRENER, Z. *Calazar canino em Minas Gerais*. Belo Horizonte, Faculdade de Medicina da Universidade de Minas Gerais, 1957. 89p. Tese.
23. BRITO, E.G.V. *Patologia renal na esquistossomose mansônica hepatoesplênica*. Salvador, 1973. 116p. Tese.
24. BRITO, T.; HOSHINO-SHIMUZU, S.; AMATO NETO, V.; DUARTE, I.S.; PENNA, D.O. Glomerular involvement in human Kala-azar. A light, immunofluorescent, and electron microscopic study based on kidney biopsies. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 24:9-18, 1975.
25. CASTELLANI, A. Leishman-Donovan bodies in Ceylon. *Arch. Schiff-u. Tropenhyg.*, 24:253-62, 1903.
26. CAZAL, P. L'hepatite leishmanienne démontrée par la ponction-biopsie. *Ann. Biol. clin.*, 7:113-20, 1949.
27. \_\_\_\_\_ & CHARVOLIN, P. Les réactions cellulaires au cours du Kala-azar. *Rev. Hématol.*, 6:51-63, 1951.

28. CHANCE, M.L.; PETERS, W.; SHCHORY, L. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. I. Observations on DNA. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 68:307-16, 1974.
29. CHATTERJEE, H.N. Postmortem femoral bone marrow studies of Kala-azar. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 39: 315-20, 1946.
30. CHRISTOPHERS, S.R. On a parasite found in persons suffering from enlargement of the spleen in India. Calcutta, Government printing, 1904. (Scientific Mem. of the Government of India. New Series, 11). Apud ANDRADE, Z.A. *A patologia da leishmaniose visceral (Calazar)*. Salvador, Faculdade de Medicina da UFBa., 1958. 53p. il. mimeog. Tese.
31. \_\_\_\_\_; SHORT, H.E.; BARRAUD, P.J. The result of intraperitoneal inoculation of mice with cultures of *Leishmania donovani*. *India Med. Res. Mem.*, 4:77-87, 1926.
32. COUTINHO, E.M. *Contribuição para o estudo anátomo-patológico da leishmaniose visceral do Brasil*. Recife, Universidade de Pernambuco. 1982. 182p. Tese.
33. CUNHA, A.M. da Infecções experimentais na Leishmaniose visceral americana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 33: 581-616, 1938.
34. DEANE, L.M. & DEANE, M.P. Encontro de cães naturalmente infectados por *Leishmania donovani* no Ceará. *O Hospital* (Rio de Janeiro), 45:703-7, 1954.
35. \_\_\_\_\_. Encontro de leishmânias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. *O Hospital* (Rio de Janeiro), 45:419-21, 1954.
36. \_\_\_\_\_. Leishmaniose visceral nas Américas do Sul e Central. *Arq. Hig. Saúde púb. S. Paulo*, 29:89-94, 1964.
37. DEANE, M.P. & DEANE, L.M. Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposa (*Lycalopex vetulus*) naturalmente parasitada pela *Leishmania donovani*. *O Hospital* (Rio de Janeiro), 46:651-3, 1954.
38. DeTOLLA Jr., L.J.; SEMPREVIVO, L.H.; PALCZUK, N.C.; PASSMORE, H.C. Genetic control of acquired resistance to visceral leishmaniasis in mice. *Immunogenetics*, 10: 353-61, 1980.
39. DONOVAN, C. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Brit. Med. J.*, 11:79, 1903.

40. DUARTE, M.I.S. *Pneumonite intersticial no Calazar*. São Paulo, Faculdade de Medicina da USP, 1979. 138p. il. Tese.
41. \_\_\_\_\_; SESSO, A.; BRITO, T. Relationship between glomerular mesangial cell proliferation and amyloid deposition as seen by ultrastructural and morphometric analysis in experimental Kala-azar of the hamster. *Amer. J. Pathol.*, 92:85-98, 1978.
42. \_\_\_\_\_; SILVA, M.R.; GOTO, H.; NICODEMO, E.L.; AMATONETO, V: Interstitial nephritis in human Kala-azar. *Trans. Roy, Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77:531-7, 1983.
43. DYWER, D.M. Antibody-induced modulation of *Leishmania donovani* surface membrane antigens. *J. Immunol.*, 117:2081-91, 1976.
44. FULTON, J.D. & JOYNER, L.P. Infections by *Leishmania donovani* in the cotton rat. *J. gen. Microbiol.*, 2:103-9, 1948.
45. \_\_\_\_\_ & NIVEN, J.S.F. Studies on Protozoa - Part III - Visceral leishmaniasis in the cotton rat (*Sigmodon hispidus*). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 44:717-28, 1951.
46. GARDENER, P.J.; CHANCER, M.L.; PETERS, W. Biochemical, Taxonomy of *Leishmania* II. Electrophoretic variation of malate dehydrogenase. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 68:317-25, 1974.
47. GELLHORN, A.; VAN DYKE, H.B.; PYLES, W.J.; TUPIKOVA, N. A. Amyloidosis in hamsters with leishmaniasis. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 61:25-30, 1946.
48. GOODWIN, L.G. Oedema in hamsters infected with *Leishmania*. *Nature*, 156:476, 1945.
49. GRADONI, L.; POZIO, E.; GRAMICCIA, M.; MAROLI, M.; BETTINI, S. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VII. Studies on the black rat (*Rattus rattus*) in the epidemiology of visceral leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77:427-31, 1983.
50. GUTIERREZ, Y.; MAKSEM, J.A.; REINER, N.E. Pathologic changes in murine leishmaniasis (*Leishmania donovani*) with special reference to the dynamics of granuloma formation in the liver. *Amer. J. Pathol.*, 114:222-30, 1984.
51. HERMAN, R. Cytophilic and opsonic antibodies in visceral leishmaniasis in mice. *Infect. Immun.*, 28:583-93, 1980.
52. \_\_\_\_\_ & FARREL, J.P. Effects of cyclophosphamide on visceral leishmaniasis in the mouse. *J. Protozool.*, 24:429-36, 1977.

53. HOMMEL, M. The genus *Leishmania*: biology of the parasites and clinical aspects. *Bull. Inst. Pasteur*, 75:5-102, 1978.
54. KIRKPATRICK, C.E. & FARREL, J.P. Leishmaniasis in beige mice. *Infect. Immun.*, 38:1208-16, 1982.
55. KRAMPITZ, H.E.; WEBER, B.; SCHEFFER, K. *Acta Tropica*, 34:293-311, 1977. Apud MOLINEAUX, D.H. *Microtus Agrestis* and *Clethrionomys glareolus* as experimental hosts of New World *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 73:85-7, 1979.
56. LAINSON, R. & SHAW, J.J. Leishmaniasis of the New World: Taxonomic problems. *Brit. Med. Bull.*, 28:44-8, 1972.
57. \_\_\_\_\_. Role of animals in the epidemiology of South American Leishmaniasis. In: LUMSDEN, W.H.R. & EVANS, D.A. *Biology of the Kinetoplastida*. London, Academic Press, 1979. v.2. p.1-116.
58. LAVERAN, A. Infections des souris et des rats au Kala-azar méditerranéen et au Kala-azar indien. *Bull. Soc. Pathol. exot.*, 5:715-21, 1912.
59. \_\_\_\_\_ & MESNIL, F. Sur un protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani*), parasite d'une fièvre de l'Inde. *C. R. Acad. Sci (Paris)*, 137:957-61, 1903.
60. LEISHMAN, W.B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Brit. Med. J.*, 1:1252-4, 1903.
61. LEON, L.A. Leishmaniasis y leishmaniasis. Quito, Editorial Universitario, 1957. 172p.
62. LOWRY, O.H.; ROSEBROGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-75, 1951.
63. LUBITZ, J.M. Pathology of Kala-azar. Report of a case. *Amer. J. Trop. Med.*, 28:275-86, 1948.
64. LUNA, L.G. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3.ed., New York, McGraw-Hill, 1968.
65. MANSON, P. & LOW, G.C. The Leishman Donovan body and tropical splenomegaly. *Brit. Med. J.*, 1:183, 1904.
66. MARCHAND, F. & LEDINGHAN, J.C.G. On the question of Trypanosoma infection in man. *Lancet*, 1:149-50, 1904.

67. MARINKELLE, C.J. The control of leishmaniasis. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 58:807-18, 1980.
68. MARSDEN, P.D.; CUBA, C.C.; VEXENAT, A.; SILVA, M.C.; BARRETO, A.C. Experimental *Leishmania chagasi* infections in the marmoset *Callithrix jacchus jacchus*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 75:314-5, 1981.
69. MARTINS, J.; SOUZA, J.C.; SILVA, E. Primeiros casos autóctones de calazar no Espírito Santo. *O Hospital* (Rio de Janeiro), 73:745-74, 1968.
70. MAZZA, S. & CORNEJO, A.J. Primeros casos autóctones de Kala-azar infantil comprobados en el norte de la república. *Bol. Inst. Clin. Quirur.*, 2:140-4, 1926.
71. MELENEY, H.E. Histopathology of Kala-azar in hamster, monkey and man. *Amer. J. Pathol.*, 1:147-68, 1925.
72. \_\_\_\_\_. Kala-azar in China with special reference to its histopathology in experimental infected hamsters. *Proc. Roy. Soc. Med. Hyg.*, 18:33-40, 1925.
73. MENON, T.B. The splenic reaction in Kala-azar. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 33:75-86, 1939.
74. MIESCHER, P.A. & BELEHU, A: Leishmaniasis: Hematologic aspects. *Semin. Hematol.*, 19:93-9, 1982.
75. MIGONE, L. Un cas de Kala-azar à Asunción ( Paraguay ). *Bull, Soc. Pathol. exot.*, 6:118-20, 1913.
76. MIKHAIL, J.W. & MANSOUR, N.S. *Mystromys albicaudatus*, the african white-tailed rat, as an experimental host for *Leishmania donovani*. *J. Parasitol.*, 59:1085-7, 1973.
77. MILES, M.A.; POVOA, M.M.; SOUZA, A.A.; LAINSON, R.; SHAW, J.J. Some methods for the enzymic characterization of Latin American *Leishmania* with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74:243-52, 1979.
78. MIWA, S. & TANIKAWA, K. Electron microscopic observation of the liver in malaria and Kala-azar. *Kurume Med. J.*, 12:489-96, 1965.
79. MOREIRA, R.A.M. *O Calazar no hamster. Alguns aspectos imunopatológicos*. Salvador, Universidade Federal da Bahia, 1981. 120p. il. Tese.
80. NICODEMO, E.L.; DUARTE, M.I.S.; NICODEMO, A.C.; AMATONE TO, V. Aspectos clínico-laboratoriais da nefrite intersticial da Leishmaniose visceral. *Rev. Paul. Med.*, 102:19-22, 1984.

81. NICOLLE, C. Reproduction experimentale du Kala-azar chez le chien. Origine canine probable de cette affection. *Bull. Soc. Pathol. exot.*, 1:188-90, 1908.
82. PAOLA, D. & SILVA, J.R. Histopathologie der Kala-azar. *Ergeb. Pathol.*, 39:1-52, 1966.
83. PARONIKYAN, G.M. Experimental visceral leishmaniasis in white mice (search for new antileishmaniasis drugs). *Med. Parasitol.*, 23:85-9, 1959.
84. PENNA, H.A. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil-méd.*, 48:949-51, 1934.
85. PESSOA, S.B. & VIANNA MARTINS, A. Parasitologia médica, 10ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1978. p.120-2.
86. PETERS, W. Introduction to the workshop. In: CHANCE, M.L. & WALTON, B.C. eds., *Biochemical characterization of Leishmania*, Geneva, UNDP/WORLD BANK/WHO, 1982. p.1-8.
87. PHILIPPE, E. & CHADLI, A. La leishmaniose experimentale de la souris. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 38:241-54, 1961.
88. PREMVATI, G. Correlation of hyperplasia, splenomegaly and hepatomegaly with parasite population. I. B10. LP-a mice infected with *Leishmania donovani*. *J. Trop. Med. Hyg.*, 82:105-9, 1979.
89. RASO, P. & SIQUEIRA, J.T. Subsídio ao conhecimento da anatomia patológica da leishmaniose visceral, com especial referência às lesões pulmonares e cardíacas. *Hospital (Rio de Janeiro)*, 65:145-63, 1964.
90. REED, S.G.; BARRAL NETTO, M.; INVERSO, J.A. Treatment of experimental visceral leishmaniasis with lymphokine encapsulated in liposomes. *J. Immunol.*, 132:3116-9, 1984.
91. REINER, N.E. Host-parasite relationship in murine leishmaniasis: Pathophysiological and immunological changes. *Infect. Immun.*, 38:1223-30, 1982.
92. REZAI, H.R.; ARDEHALI, S.M.; AMIRHAKIMI, G.; KHARAZMI, A. Immunological features of Kala-azar. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 27:1079-83, 1978.
93. \_\_\_\_\_; FARREL, J.; SOULSBY, E.L. Immunological responses of *L. donovani* infection in mice and significance of T cell in resistance to experimental leishmaniasis. *Clin. Exper. Immunol.*, 40:508-14, 1980.

94. ROGERS, L. A peculiar intralobular cirrhosis of the liver produced by the protozoal parasite of Kala-azar. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 2:147-52, 1908.
95. ROSS, R. Further notes on Leishman's bodies. *Brit. Med. J.*, 11:1401, 1903.
96. SCHNUR, L.F.; CHANCE, M.L; EBERT, F.; THOMAS, S.C.; PETERS, W. The biochemical and serological taxonomy of visceralizing *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 75:131-44, 1981.
97. SENGUPTA, P.C. & BHATTACHARYA, B. The spleen in Kala-azar. *J. Ind. Med. Ass.*, 21:1, 1951.
98. SHAW, J.J. Taxonomy of the genus *Leishmania*. Traditionalist's view and modern concepts. In: CHANCE, M.L. & WALTON, B.C. *Biochemical characterization of Leishmania*. Geneva, UNDP/WORLD BANK/WHO, 1982. p.9-24.
99. SHORTT, H.E. The pathology of acute experimental Kala-azar in monkeys. *Ind. J. med. Res.*, 2:186-95, 1923.
100. SILVA, A.A. *Susceptibilidade de saglis do gênero Callithrix a alguns protozoários parasitas do homem*. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 1974. Tese. Apud MARSDEN, P.D.; CUBA, C.C.; VEXENAT, A.; SILVA, M.C.; SILVA, A.C.; BARRETO, A.C. Experimental *Leishmania chagasi* infections in the marmoset *Callithrix jacchus jacchus*. *Trans. Roy. Soc. Med. Trop. Hyg.*, 75:314-5, 1981.
101. SILVA, J.R. *Leishmaniose visceral (Calazar)*. Rio de Janeiro, 1957. 498p. Tese.
102. \_\_\_\_\_ & OLIVEIRA, H.P. Alterações hematológicas na leishmaniose visceral (Calazar). *Bol. Cent. Est. Hosp. Ser. Estado*, 12:151-214, 1960.
103. \_\_\_\_\_ & PAOLA, D. Alterações histoquímicas no sistema reticuloendotelial hepático no calazar. *Med. Cirurg. Farm.*, 254:211-5, 1957.
104. \_\_\_\_\_. O problema das fibroses hepáticas na leishmaniose visceral americana. *Rev. Assoc. méd. bras.*, 4:8-21, 1958.
105. SKOV, C.B. & TWOHY, D.W. Cellular immunity to *Leishmania donovani*. I. The effect of T cell depletion on resistance to *L. donovani* in mice. *J. Immunol.*, 113:2004-11, 1974.

106. SKOV, C.B. & TWOHY, D.W. Cellular immunity to *Leishmania donovani*. II. Evidence for synergy between thymocytes and lymph node cells in reconstitution of acquired resistance to *L. donovani* in mice. *J. Immunol.*, 113: 2012-9, 1974.
107. SMRKOSKI, L.L. & LARSON, C.L. Effect of treatment with BCG on the course of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Infect. Immun.*, 16:249-57, 1977.
108. \_\_\_\_\_; REED, S.G. Effect of visceral leishmaniasis on congenitally athymic mice. *Infect. Immun.*, 25:1078-80, 1979.
109. \_\_\_\_\_; REED, S.G.; LARSON, C.L. Effect of cortisone and cyclophosphamide on the immunological role of BCG in BALB/c mice challenged with *Leishmania donovani*. *Amer. Trop. Med. Hyg.*, 29:26-20, 1980.
110. STAUBER, L.A. Characterization of strains to *Leishmania donovani*. *Exper. Parasitol.*, 18:1-11, 1966.
111. \_\_\_\_\_. Host resistance to the Khartoum strain of *Leishmania donovani*. *Rice Inst. Pamph.*, 45:80-96, 1958. Apud BRADLEY, D.J. & KIRKLEY, J. Regulation of *Leishmania* populations without the host. I. The variable course of *Leishmania donovani* infection in mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 30:119-29, 1977.
112. \_\_\_\_\_. Leishmaniasis in the hamster. In: COLE ed. *Some Physiological Aspects and Consequences of Parasitism*. New Brunswick, Rutgers University Press, 1955. p.76-90. Apud AGU, W.E.; FARREL, J.P.; SOULSBY, E.J.C. Complement increases in experimental *Leishmania donovani* infection of the golden hamster. *Int. J. Parasitol.*, 11:133-6, 1981.
113. \_\_\_\_\_; FRANCHINO, E.M.; GRUN, J. An eight-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in the golden hamster. *J. Protozoal.*, 5:269-73, 1958.
114. STUECHLER, D. Endemiegebiete Tropischer Infektionskrankheiten: Karten und Texte für die Praxis. Bern, Verlag Hans Huber, 1981.
115. TANIKAWA, K. & HOJIRO, O. Electron microscopic observation of the liver in Kalazar. *Kurume Med. J.*, 12:148-54, 1965.
116. TEIXEIRA, R. *Experiências vividas com a Leishmania visceral 1954-1980*. (Aspectos epidemiológicos, sorológicos e evolutivos). Salvador, Faculdade de Medicina da UFBA., 1980. 313p. Tese.

117. TOLEDO, L.M.; MARZOCHI, K.B.F.; MARZOCHI, M.C.A.; CAMILLO-COURA, L. Leishmaniose visceral na cidade do Rio de Janeiro: casos clínicos do serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP) do Hospital Universitário, UFRJ. In: Congr. Soc. bras. Med. trop., 17<sup>o</sup>, Caldas Novas, Go, 1981. *Resumos dos trabalhos*. p.111.
118. UEBEL, H. Über Eiweißstoffwechselstörungen bei infantiler visceraler Leishmaniose unter besonderer Berücksichtigung der pathologisch-anatomischen Veränderungen. *Z. Tropenmed. Parasitol.*, 2:327-37, 1951.
119. VERESS, B.; OMER, A.; SATIR, A.A.; EL HASSAN, A.M. Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. *Immunology*, 33:605-10, 1977.
120. WARD, R.D. New World Leishmaniasis; a review of the epidemiological changes in the last 3 decades. *Proc. int. Congr. Entomol.*, 15<sup>o</sup> Washington, D.C., 1977. p. 505-22.
121. WEISINGER, J.R.; PINTO, A.; VELAZQUEZ, G.A.; BRONSTEIN, I.; DESSENE, J.J.; DUQUE, J.F.; MONTENEGRO, J.; TAPANES, F.; RECAGNO DE ROUSSE, A. Clinical and Histological kidney involvement in human Kala-azar. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 27:357-9, 1978.
122. WILSON, C.B. & DIXON, F.J. Antigen quantitation in experimental immune complex glomerulonephritis I. Acute serum sickness. *J. Immunol.*, 105:279-90, 1970.
123. YONG, C.W.; SMYLY, H.J.; BROWN, C. Experimental Kala-azar in hamster *Cricetulus griseus*. *Amer. J. Hyg.*, 6:254-75, 1926.

Tabelas

Tabela 1. Variação do peso corporal, peso do fígado e peso do baço em camundongos DBA/2 infectados endovenosamente com  $2 \times 10^6$  amastigotas de *Leishmania donovani chagasi*.

Semanas pós infecção	Número de animais	Peso corporal (gramas)	Peso do fígado (gramas)	Relação entre médias $\frac{\text{peso do fígado}}{\text{peso corporal}}$	Índice hepático	Peso do baço (gramas)	Relação entre médias $\frac{\text{peso do baço}}{\text{peso corporal}}$	Índice Esplênico
1	4	20,9 ± 1,7	1,2 ± 0,1	0,057	0,97	0,11 ± 0,02	0,0053	1,1
3	7	20,2 ± 2,7	1,2 ± 0,4	0,059	1	0,12 ± 0,04	0,0059	1,18
5	8	23,8 ± 2,9	1,3 ± 0,3	0,055	0,93	0,11 ± 0,03	0,0046	0,92
10	8	25,3 ± 2,7	1,5 ± 0,25	0,059	1	0,12 ± 0,02	0,0047	0,94
20	4	23,3 ± 0,3	1,3 ± 0,04	0,056	0,95	0,19 ± 0,01*	0,0081	1,62
38	4	25,2 ± 1,6	1,3 ± 0,06	0,052	0,88	0,18 ± 0,01*	0,0071	1,42
Normal	4	21,9 ± 1	1,3 ± 0,05	0,059	1	0,11 ± 0,01	0,005	1

\* P < 0,01

Tabela 2. Variação do peso corporal, peso do fígado e peso do baço em camundongos C57BL/10, infectados endovenosamente com  $2 \times 10^6$  amastigotas de *Leishmania donovani chagasi*.

Semanas pós infecção	Número de animais	Peso corporal (gramas)	Peso do fígado (gramas)	Relação entre médias peso do fígado / peso corporal	Índice hepático	Peso do baço (gramas)	Relação entre médias peso do baço / peso corporal	Índice Esplênico
1	4	21,4 ± 0,75	1,13 ± 0,07	0,053	1,15	0,1 ± 0,01	0,0048	1,2
3	7	20,1 ± 2,3 *	0,94 ± 0,16	0,047	1,02	0,09 ± 0,02	0,0045	1,13
5	8	20,6 ± 2,6 *	1 ± 0,12	0,048	1,04	0,11 ± 0,02	0,0053	1,33
10	7	22,2 ± 3,9	1,19 ± 0,32	0,054	1,17	0,21 ± 0,02 *	0,0095	2,38
20	4	21,7 ± 1,5	0,98 ± 0,16	0,045	0,98	0,16 ± 0,01 *	0,0074	1,85
38	4	23,5 ± 0,8	1 ± 0,06	0,043	0,94	0,18 ± 0,02 *	0,0077	1,93
57	4	25,1 ± 2,8	1,2 ± 0,2	0,048	1,04	0,17 ± 0,02 *	0,0068	1,7
66	5	27,2 ± 2,6	1,5 ± 0,1	0,055	1,19	0,18 ± 0,02 *	0,0066	1,65
70	4	29 ± 4,2	1,5 ± 0,27	0,052	1,13	0,19 ± 0,03 *	0,0066	1,65
Normal	11	25,2 ± 3,4	1,17 ± 0,26	0,046	1	0,1 ± 0,03	0,004	1

\* P < 0,01

Tabela 3. Variação do peso do fígado, carga parasitária hepática total, diâmetro médio dos granulomas hepáticos e do número de granulomas hepáticos por centímetro quadrado da secção histológica em camundongos DBA/2 infectados endovenosamente com  $2 \times 10^6$  amastigotas de *Leishmania donovani chagasi*.

Semanas pós infecção	Peso do fígado (gramas)	Carga parasitária hepática total ( $\times 10^5$ )	Diâmetro médio dos granulomas hepáticos (micrometros)	Número de granulomas/cm <sup>2</sup>	Coefficiente de variação (Pearson)
1	1,2 $\pm$ 0,1	16,7 $\pm$ 3,2	35,8 $\pm$ 9,2	2 $\pm$ 0,8	0,4
3	1,2 $\pm$ 0,4	23,9 $\pm$ 13	32 $\pm$ 9,7	3 $\pm$ 1	0,33
5	1,3 $\pm$ 0,3	37,6 $\pm$ 33,9	38,3 $\pm$ 17,6	6 $\pm$ 2	0,33
10	1,5 $\pm$ 0,25	38,1 $\pm$ 28,3	38,4 $\pm$ 12,7	7 $\pm$ 2	0,29
20	1,3 $\pm$ 0,04	12,4 $\pm$ 5,5	44,7 $\pm$ 10,3	17 $\pm$ 6	0,35
38	1,3 $\pm$ 0,06	7,6 $\pm$ 6,7	45,7 $\pm$ 12,2	22 $\pm$ 4	0,18

Tabela 4. Variação do peso do fígado, carga parasitária hepática total, diâmetro médio dos granulomas hepáticos e do número de granulomas hepáticos por centímetro quadrado da secção histológica, em camundongos C57BL/10 infectados endovenosamente com  $2 \times 10^6$  amastigotas de *Leishmania donovani chagasi*.

Semanas pós infecção	Peso do fígado (gramas)	Carga parasitária hepática total ( $\times 10^5$ )	Diâmetro médio dos granulomas hepáticos (micrometros)	Número de granulomas/cm <sup>2</sup>	Coefficiente de variação (Pearson)
1	1,13 $\pm$ 0,07	50,9 $\pm$ 5	39,1 $\pm$ 13,2	12 $\pm$ 2	0,16
3	0,94 $\pm$ 0,16	367,3 $\pm$ 260	73,2 $\pm$ 15,6	42 $\pm$ 8	0,19
5	1 $\pm$ 0,12	667,2 $\pm$ 396	71,6 $\pm$ 16,7	59 $\pm$ 8	0,13
10	1,19 $\pm$ 0,32	88,6 $\pm$ 73	57,4 $\pm$ 12	41 $\pm$ 8	0,19
20	0,98 $\pm$ 0,16	13,7 $\pm$ 3,4	59,6 $\pm$ 16,7	30 $\pm$ 2	0,06
38	1 $\pm$ 0,06	6,4 $\pm$ 2,5	60,1 $\pm$ 20	17 $\pm$ 2	0,12
57	1,2 $\pm$ 0,2	3,6 $\pm$ 1,6	56,1 $\pm$ 22,5	16 $\pm$ 5	0,31
66	1,5 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 1,7	54,8 $\pm$ 23,6	14 $\pm$ 5	0,35
70	1,5 $\pm$ 0,27	0 $\pm$	58,9 $\pm$ 22,8	16 $\pm$ 6	0,37

Tabela 5. Variação do peso do baço e da carga parasitária esplênica total em camundongos DBA/2 infectados endovenosamente com  $2 \times 10^6$  a mastigotas de *Leishmania donovani chagasi*.

Semanas pós infecção	Peso do baço (gramas)	Carga parasitária esplênica total ( $\times 10^4$ )
1	0,11 $\pm$ 0,02	6,9 $\pm$ 5,6
3	0,12 $\pm$ 0,04	8,5 $\pm$ 4,9
5	0,11 $\pm$ 0,03	17,1 $\pm$ 6,8
10	0,12 $\pm$ 0,02	177,2 $\pm$ 16,5
20	0,19 $\pm$ 0,01	1208,5 $\pm$ 171,3
38	0,18 $\pm$ 0,01	422,8 $\pm$ 17,5

Tabela 6. Variação do peso do baço e da carga parasitária esplênica total em camundongo C57BL/10 infectados endovenosamente com  $2 \times 10^6$  amastigotas de *Leishmania donovani chagasi*.

Semana pós infecção	Peso do baço (gramas)	Carga parasitária esplênica total ( $\times 10^4$ )
1	0,1 $\pm$ 0,01	13,7 $\pm$ 8,5
3	0,09 $\pm$ 0,02	15,5 $\pm$ 9,4
5	0,11 $\pm$ 0,02	77,2 $\pm$ 23,9
10	0,21 $\pm$ 0,02	372,9 $\pm$ 119,5
20	0,16 $\pm$ 0,01	53,1 $\pm$ 11,2
38	0,18 $\pm$ 0,02	20,7 $\pm$ 15,3
57	0,17 $\pm$ 0,02	9,1 $\pm$ 6,4
66	0,18 $\pm$ 0,02	6,5 $\pm$ 3,5
70	0,19 $\pm$ 0,03	9 $\pm$ 3,2

Tabela 7. Variação do volume glomerular em camundongos DBA/2 e C57BL/10 infectados endovenosamente com  $2 \times 10^6$  amastigotas de *Leishmania donovani chagasi*.

Semanas pós infecção	Volume glomerular em mm <sup>3</sup> (DBA/2)	Volume glomerular em mm <sup>3</sup> (C57BL/10)
1	80,6 ± 37	90,4 ± 33,4
3	78,5 ± 31,4	84,9 ± 24,4
5	94 ± 23,7	89,3 ± 37,8
10	98,7 ± 21,4	108,2 ± 32,5
20	110 ± 22 *	110,4 ± 33
38	113 ± 27,9*	117,3 ± 23,9
57	. . .	136,9 ± 24,2*
66	. . .	166 ± 26 *
70	. . .	140,6 ± 32 *
NORMAL	80,8 ± 21	99 ± 24

\* P < 0,01

Figuras

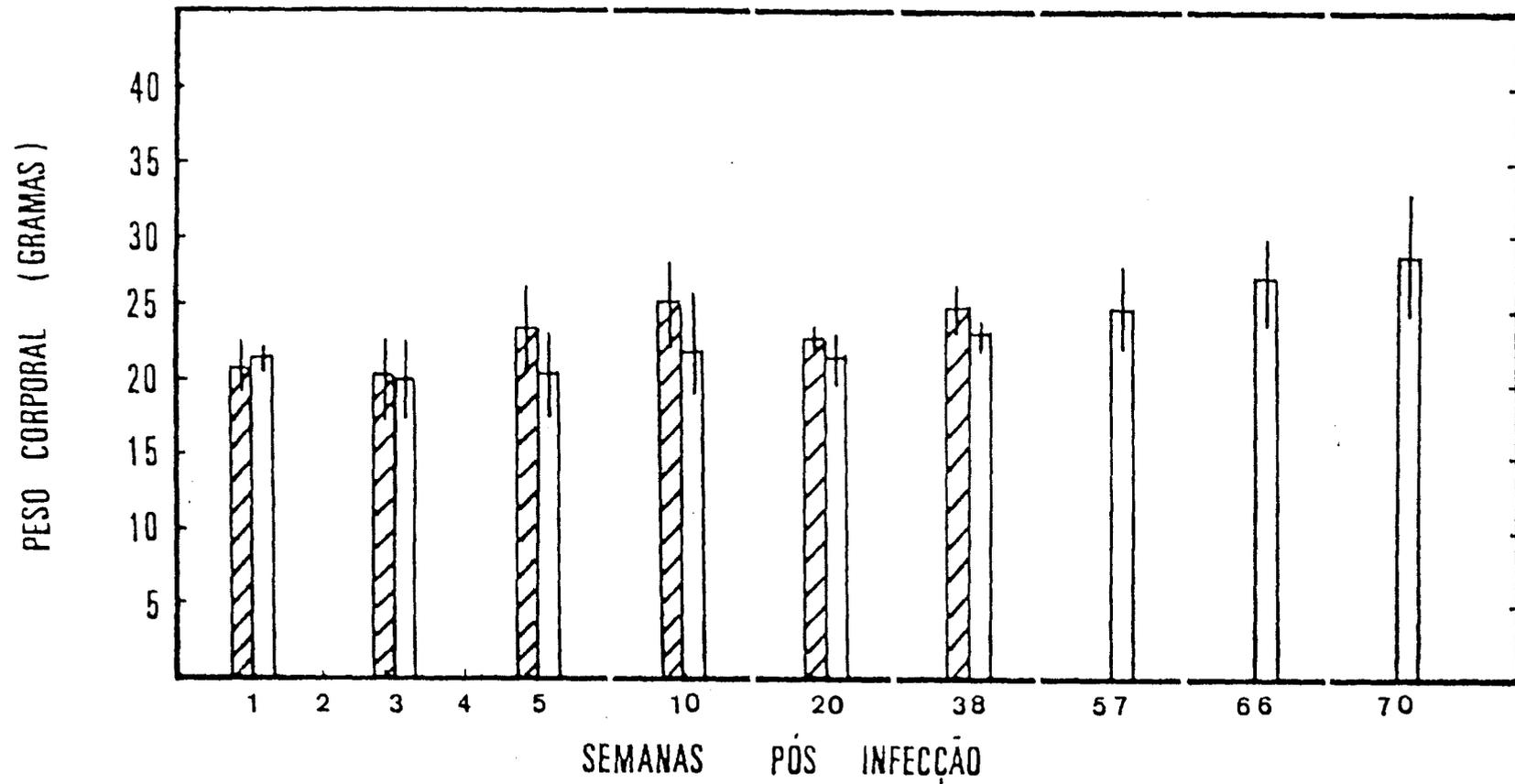


Figura 1. Evolução das médias de peso corporal em duas linhagens de camundongos isogênicos infectados endovenosamente com  $2 \times 10^6$  amastigotas de *Leishmania donovani chagasi*. (  DBA/2,  C57BL/10).

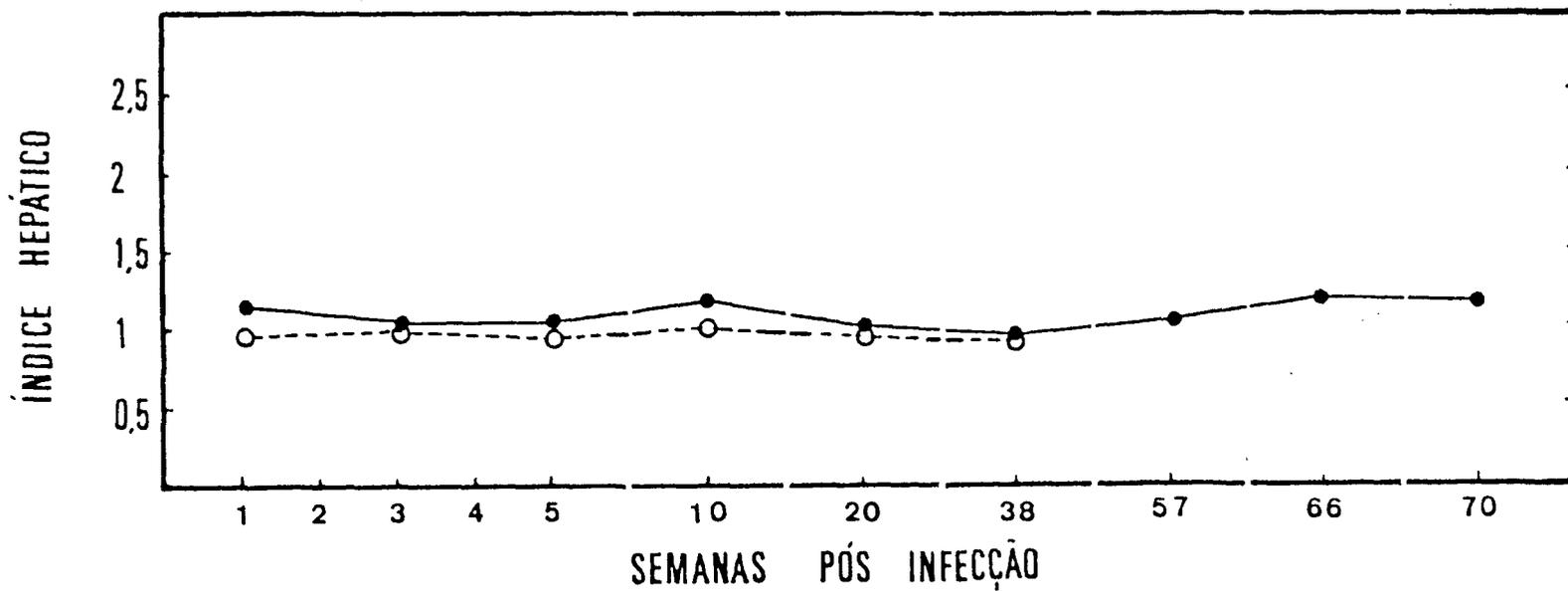


Figura 2. Evolução do índice hepático em duas linhagens de camundongos isogênicos infectados endovenosamente com  $2 \times 10^6$  amastigotas de *Leishmania donovani chagasi*. (○ DBA/2, ● C57BL/10).

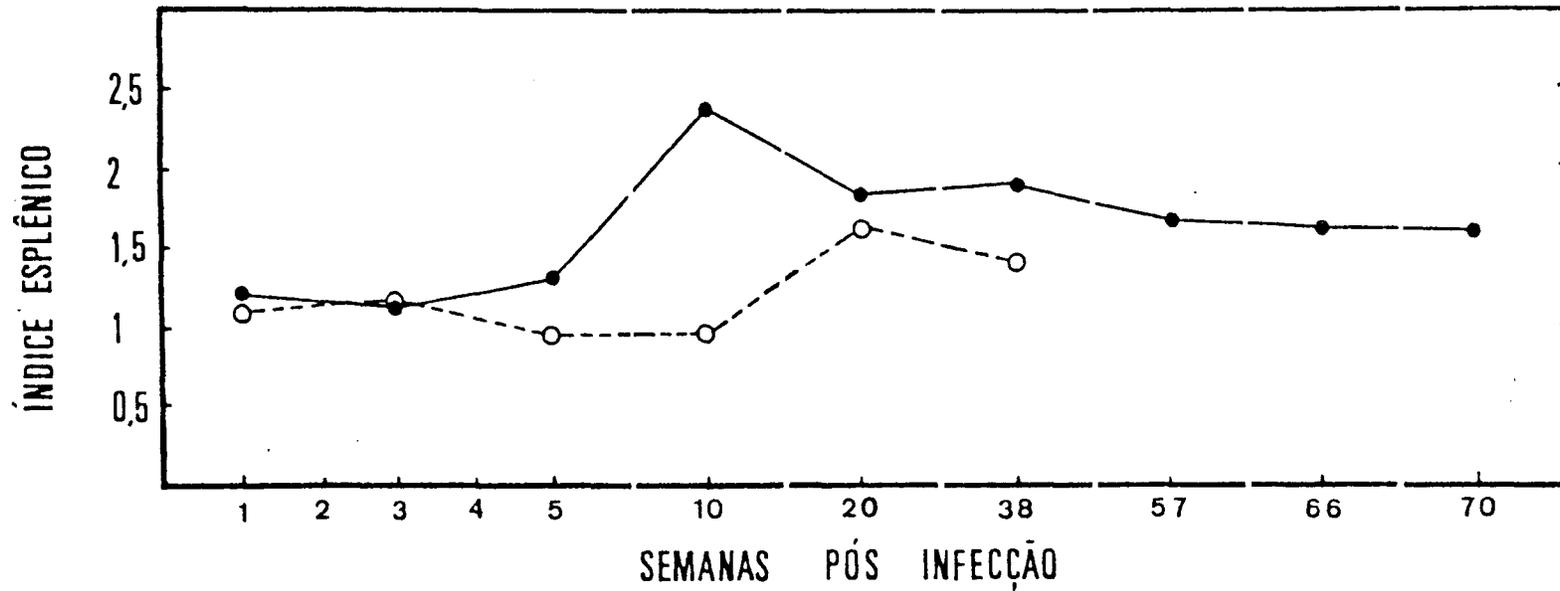


Figura 3. Evolução do índice esplênico em duas linhagens de camundongos isogênicos infectados endovenosamente com  $2 \times 10^6$  amastigotas de *Leishmania donovani chagasi* (○ DBA/2, ● C57BL/10).

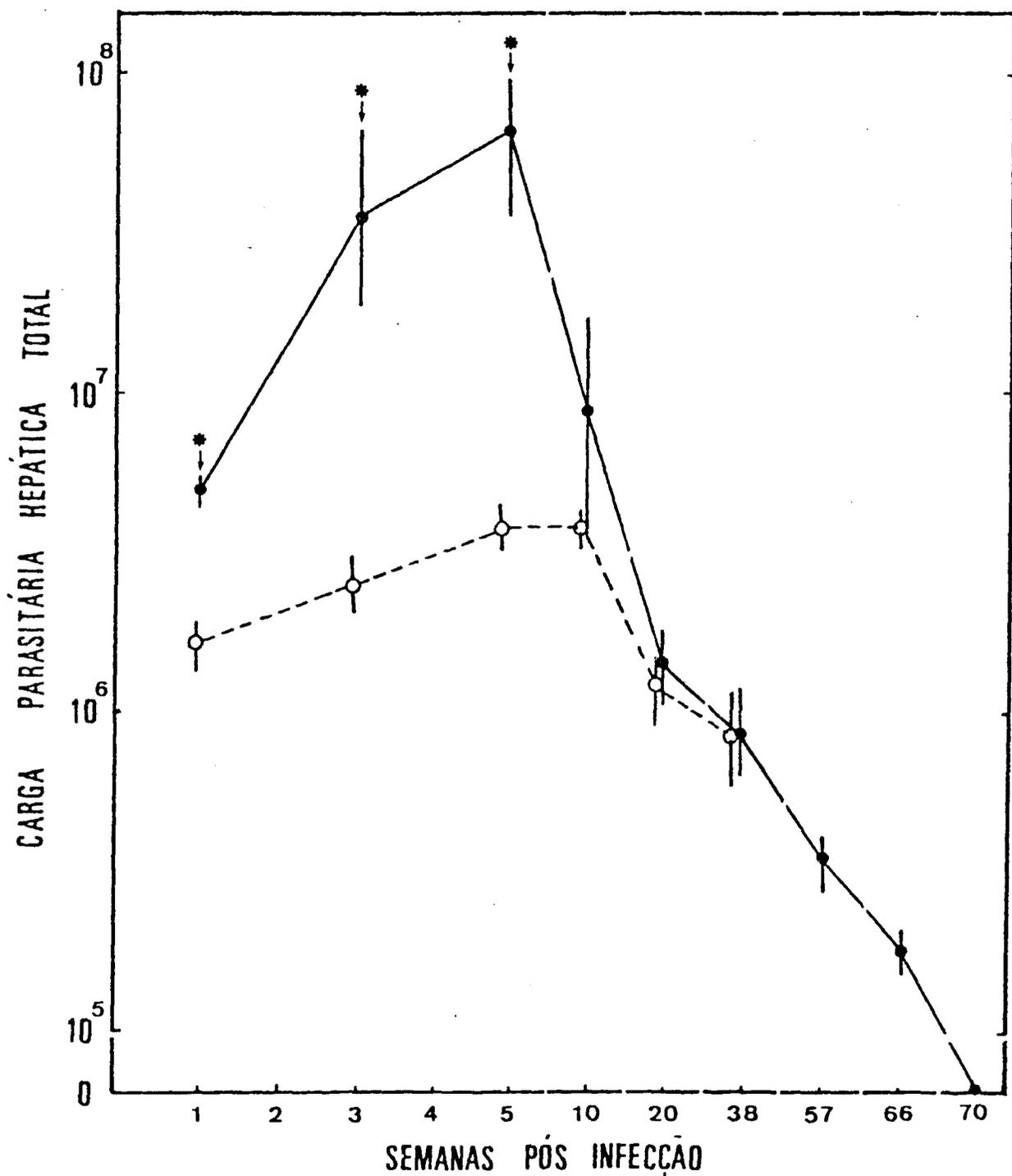


Figura 4. Evolução das médias da carga parasitária hepática total em duas linhagens de camundongos isogênicos infectados endovenosamente com  $2 \times 10^6$  amastigotas de *Leishmania donovani chagasi* (○ DBA/2, ● C57BL/10).

Nota: Diagrama semilogaritmico. A amputação do gráfico permite uma melhor apreciação das flutuações. \*  $P < 0,01$ .

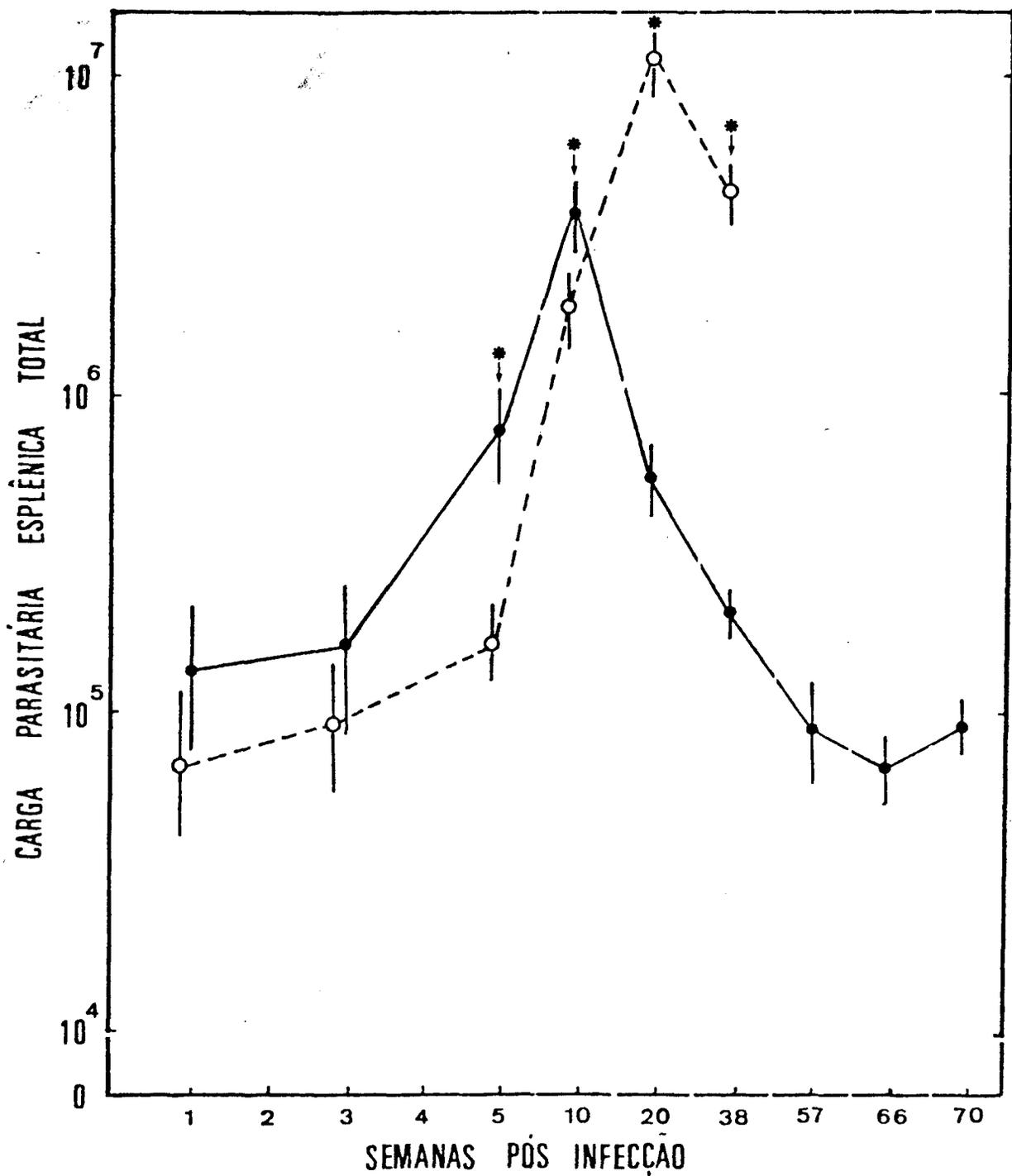


Figura 5. Evolução das médias da carga parasitária esplênica total em duas linhagens de camundongos isogênicos infectados endovenosamente com  $2 \times 10^6$  amastigotas de *Leishmania donovani chagasi* ( O DBA/2, ● C57BL/10).

Nota: Diagrama semilogaritmico. A amputação do gráfico permite uma melhor apreciação das flutuações. \*  $P < 0,01$ .

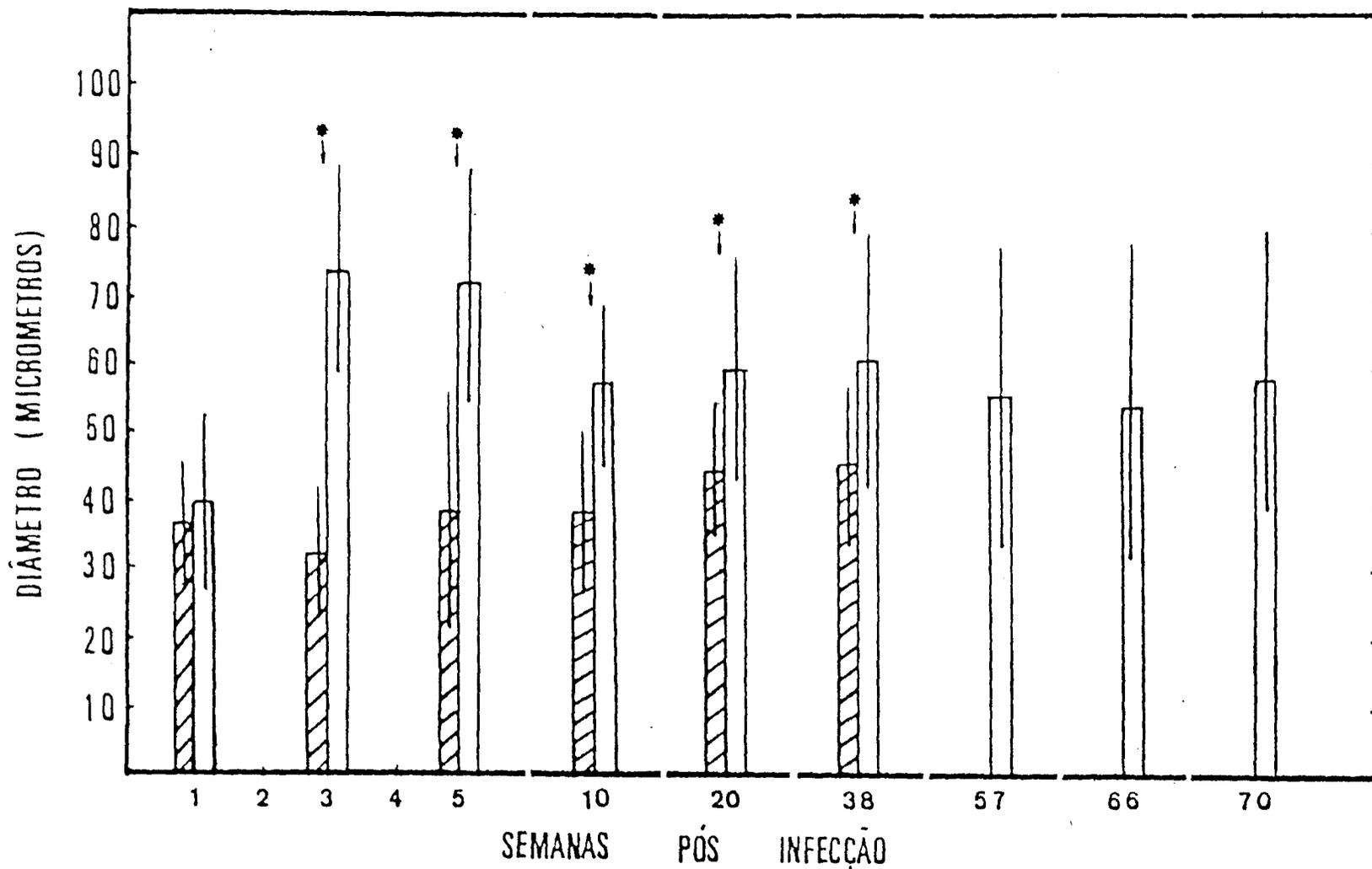


Figura 6. Evolução dos diâmetros médios dos granulomas hepáticos em duas linhagens de camundongos isogênicos infectados endovenosamente com  $2 \times 10^6$  amastigotas de *Leishmania donovani chagasi*.

( ▨ DBA/2, □ C57BL/10).

Nota: \*  $P < 0,01$ .

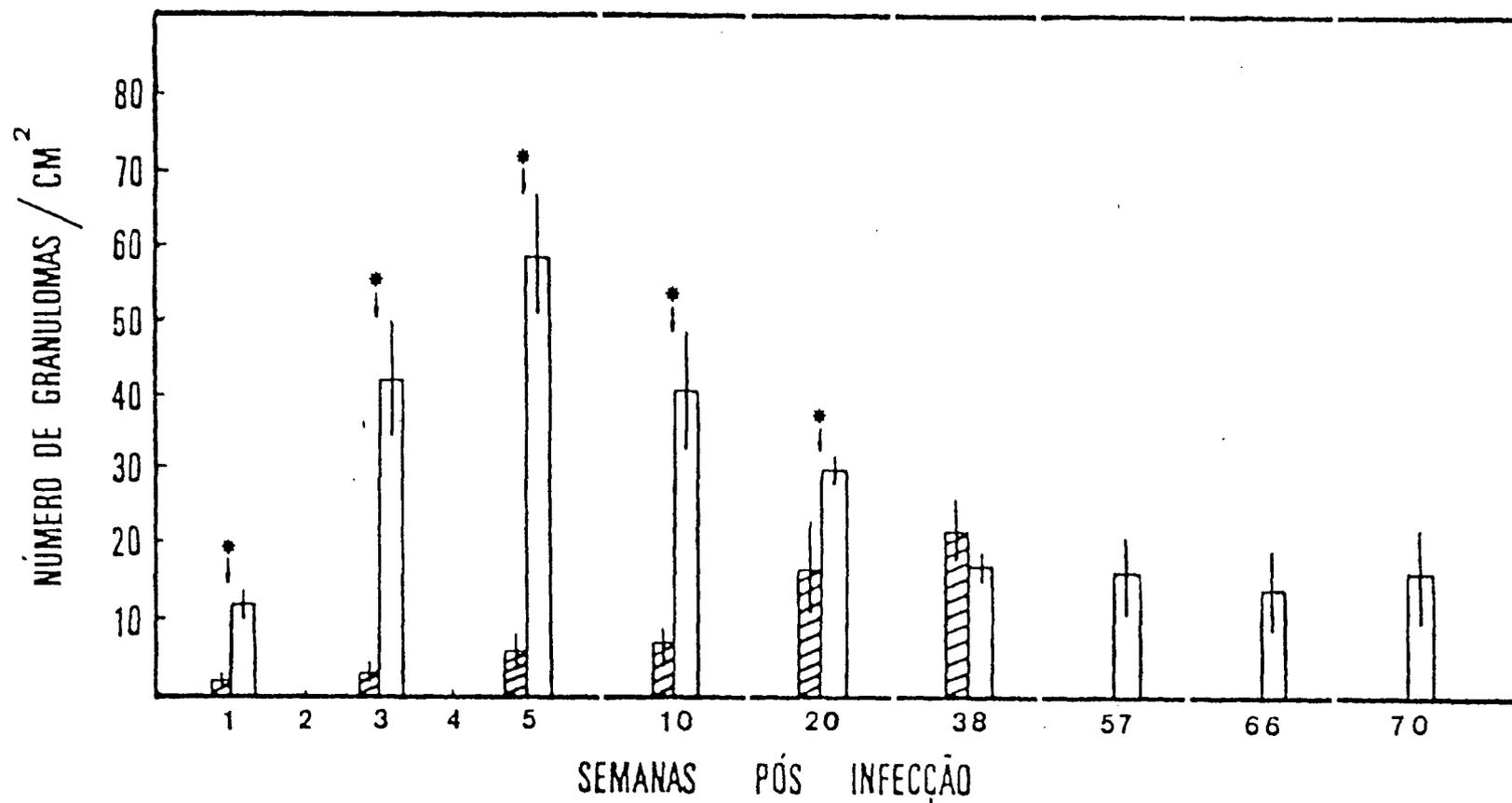


Figura 7. Evolução do número de granulomas hepáticos maduros em duas linhagens de camundongos isogênicos infectados endovenosamente com  $2 \times 10^6$  amastigotas de *Leishmania donovani chagasi* (▨ DBA/2, □ C57BL/10).

Nota: \*  $P < 0,01$ .

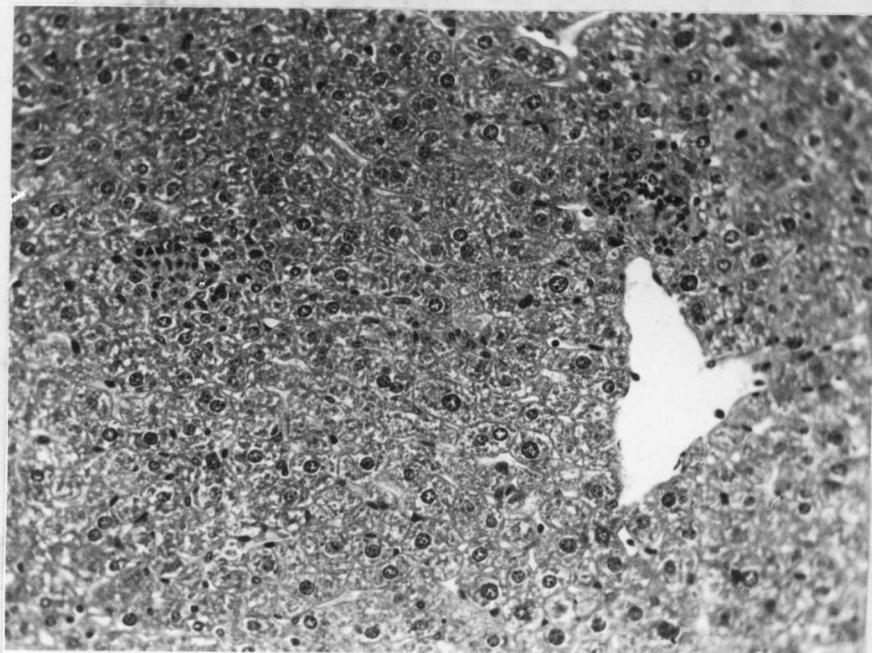


Figura 8. Coleções focais de células mononucleares esparsamente distribuídas no lóbulo. Fígado de camundongo DBA/2 20 semanas pós infecção. HE 100X.

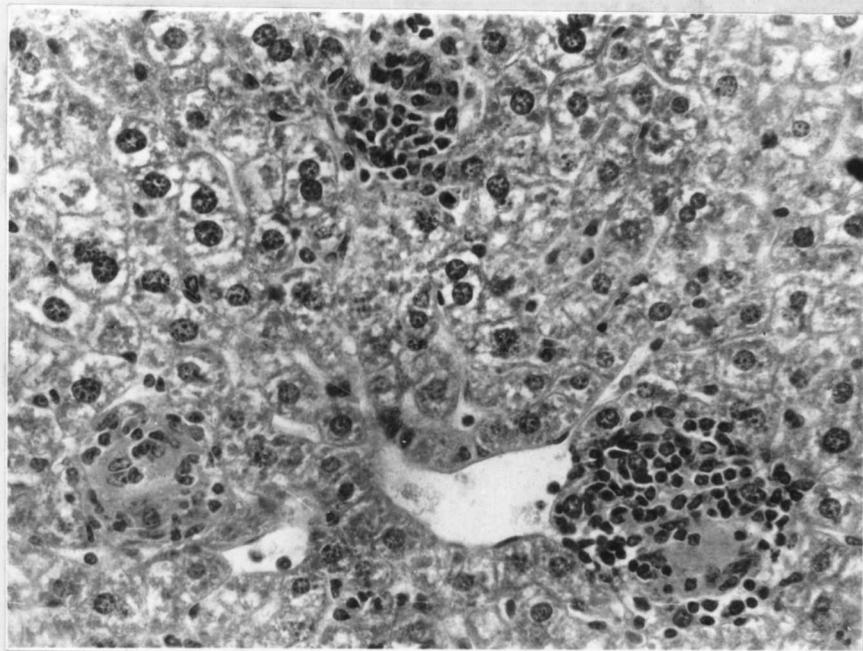


Figura 9. Granulomas circundados por collar de linfócitos. Fígado de camundongo C57BL/10 3 semanas pós infecção. HE 250X.

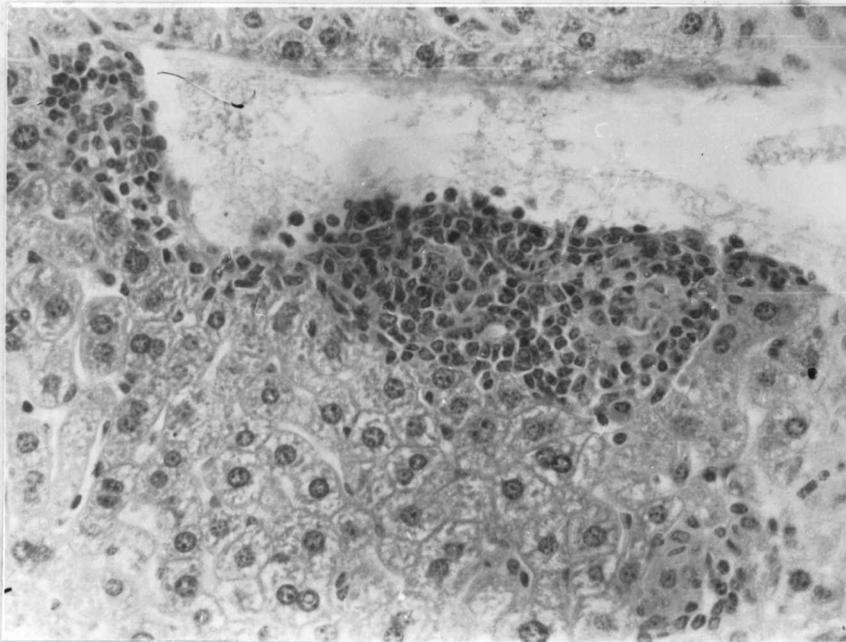


Figura 10. Ramo da veia centrolobular mostrando granulomas sub-endoteliais com tendência a coalescer. Fígado de camundongo C57BL/10 5 semanas pós infecção. HE 160X.

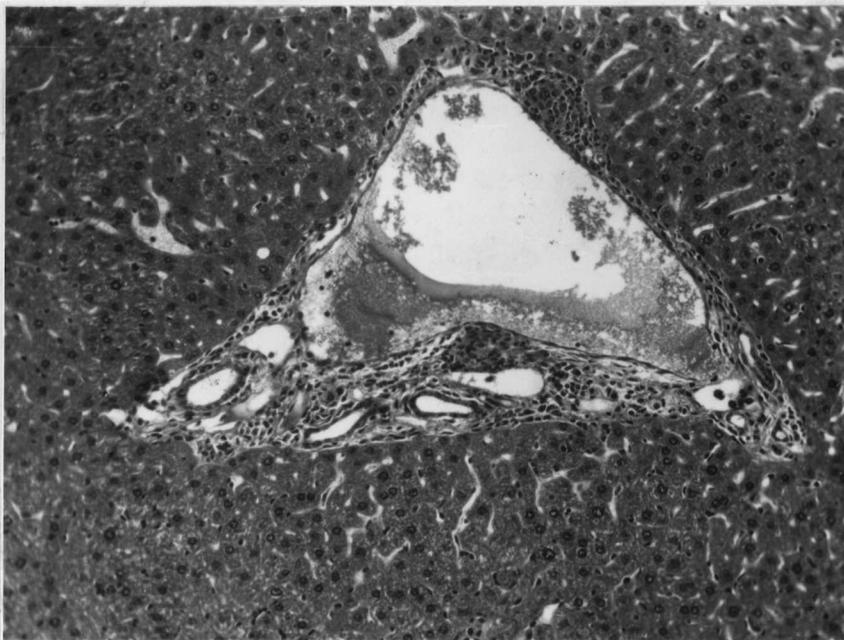


Figura 11. Granulomas em posição subendotelial na veia porta. Fígado de camundongo C57BL/10 20 semanas pós infecção. HE 63X. *... nas no interior dos ductos. Fígado de camundongo C57BL/10 57 semanas pós infecção. HE 25X.*

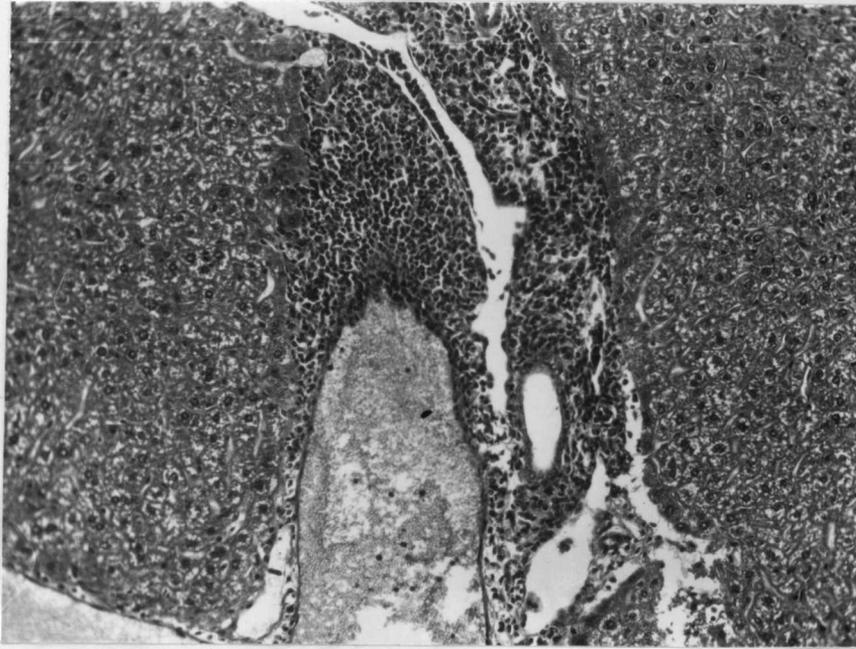


Figura 12. Acentuada infiltração inflamatória mononuclear de espaço porta. Fígado de camundongo C57BL/10 38 semanas pós infecção. HE 63X.

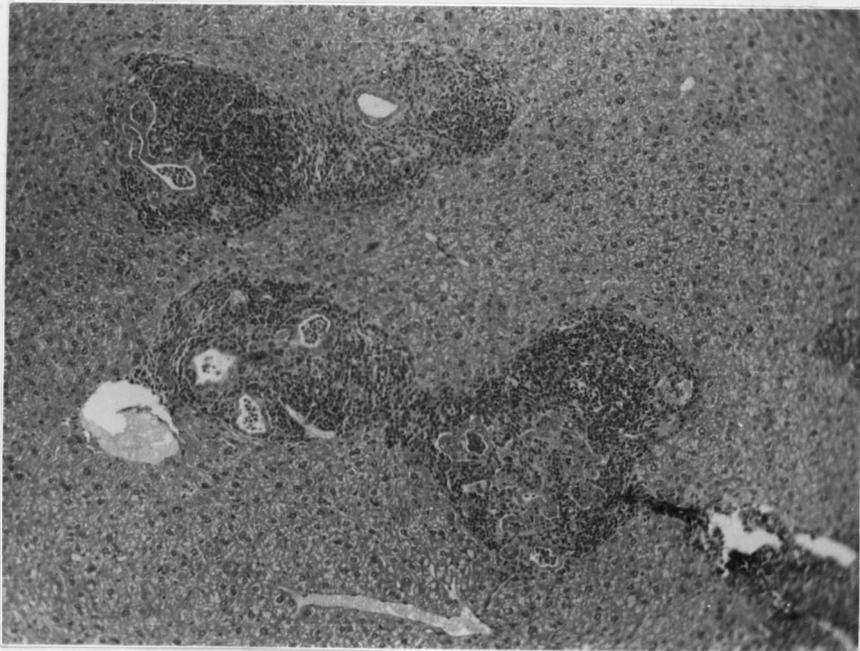


Figura 13. Denso infiltrado inflamatório linfocitário de espaços porta e proliferação ductal, observando-se células inflamatórias no interior dos ductos. Fígado de camundongo C57BL/10 57 semanas pós infecção. HE 25X.

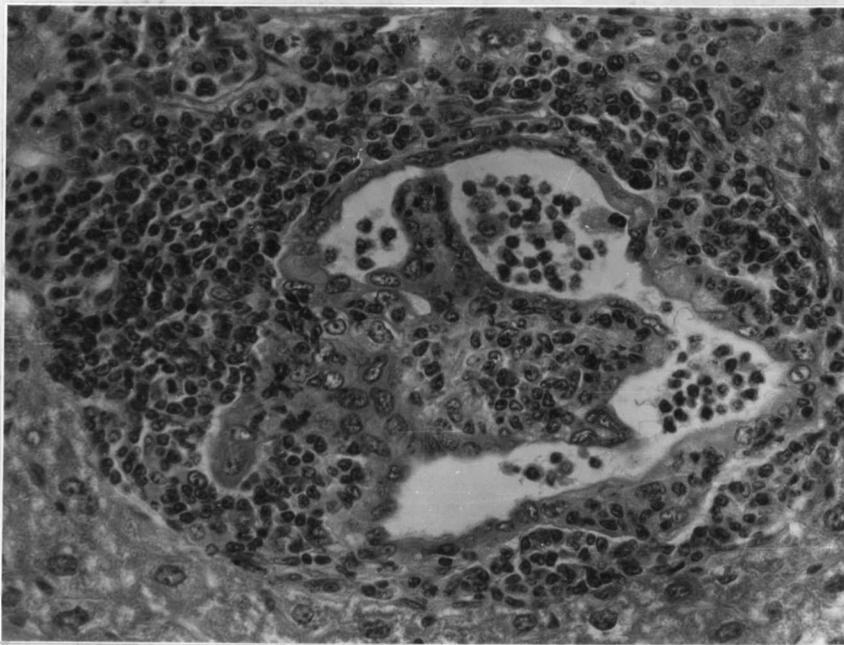


Figura 14. Colangite. Infiltrado periductal, proliferação do epitélio ductal e presença de células inflamatórias na luz. Fígado de camundongo C57BL/10 57 semanas pós infecção. HE 250X.

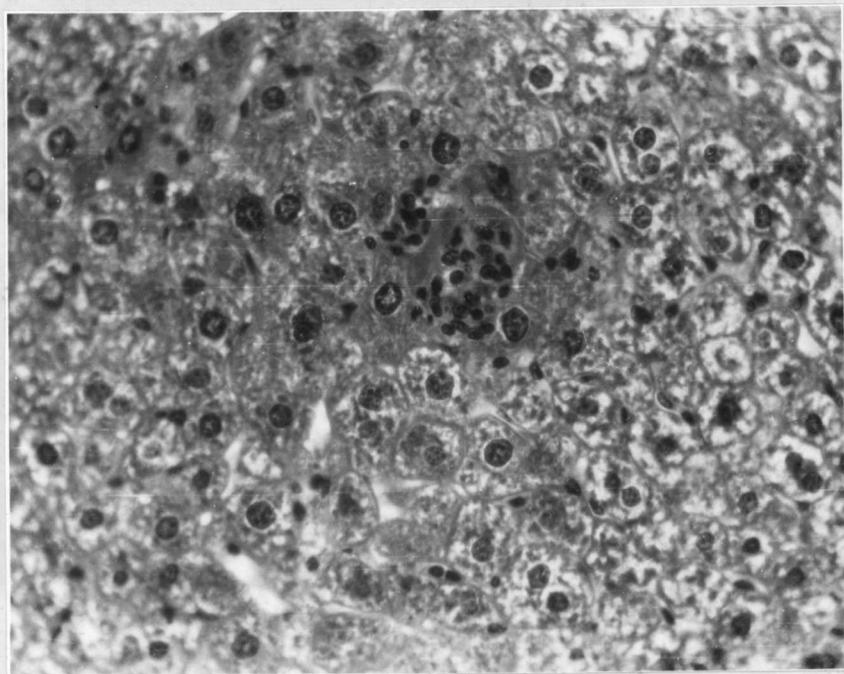


Figura 15. Granuloma circundado por halo eosinofílico. Fígado de camundongo C57BL/10 66 semanas pós infecção. HE 250X.

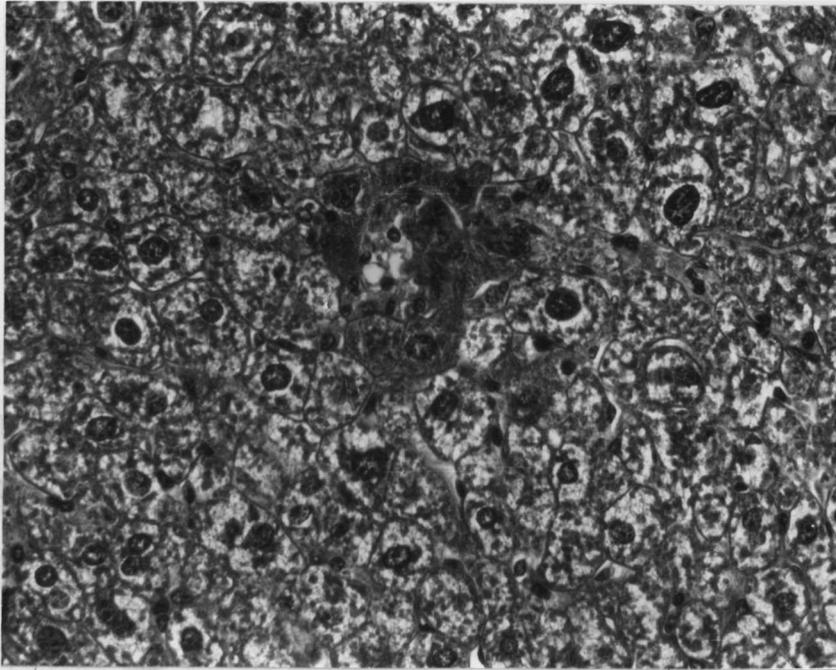


Figura 16. Granuloma com área de amolecimento central. Fígado de camundongo C57BL/10 66 semanas pós infecção. HE 250X.

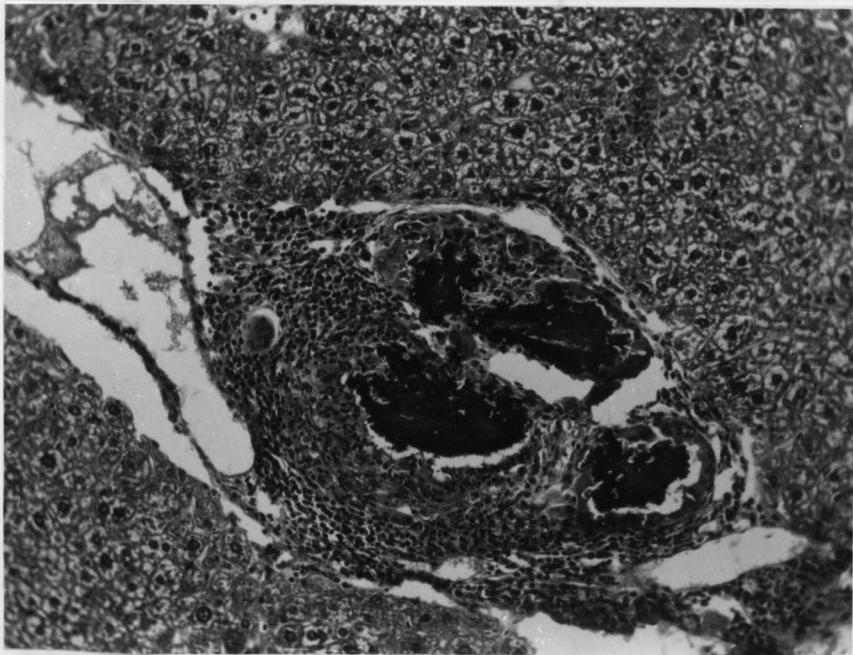


Figura 17. Granuloma e focos de calcificação. Fígado de camundongo C57BL/10 66 semanas pós infecção. HE 100X.

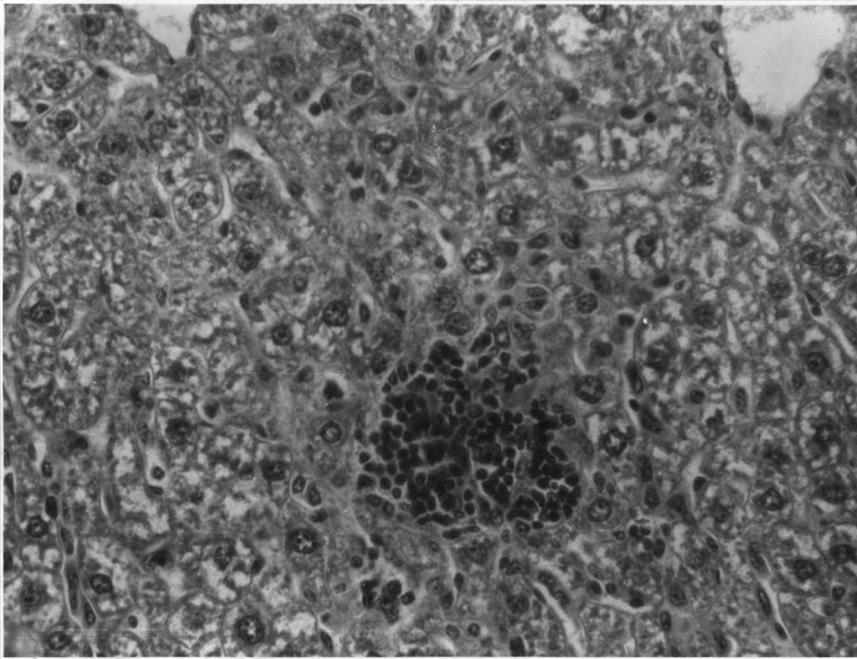


Figura 20. Infiltrado focal composto predominantemente de linfócitos. Fígado de camundongo C57BL/10 70 semanas pós infecção. HE 160X.

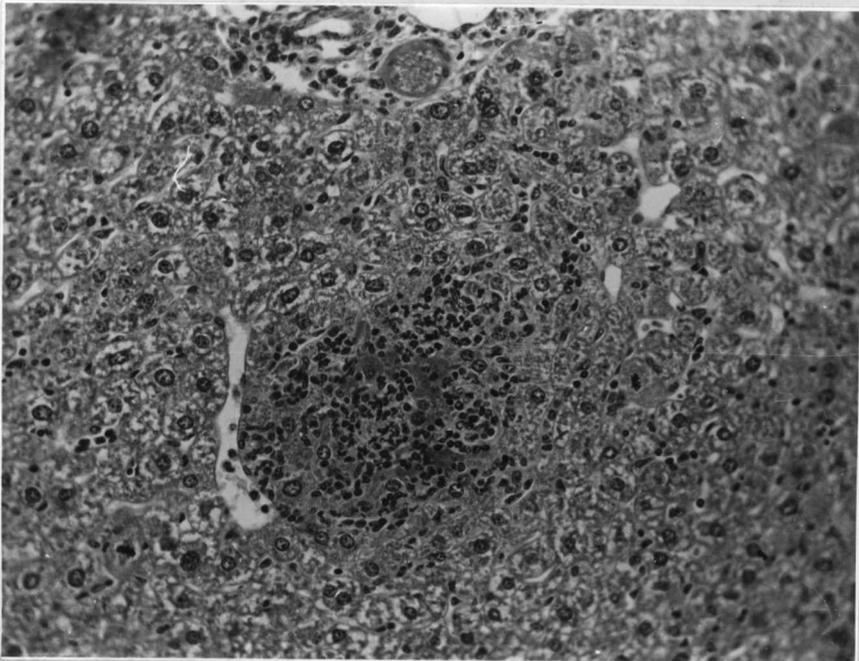


Figura 21. Granuloma infiltrado por células inflamatórias polimorfonucleares. Fígado de camundongo C57BL/10 70 semanas pós infecção. HE 100X.

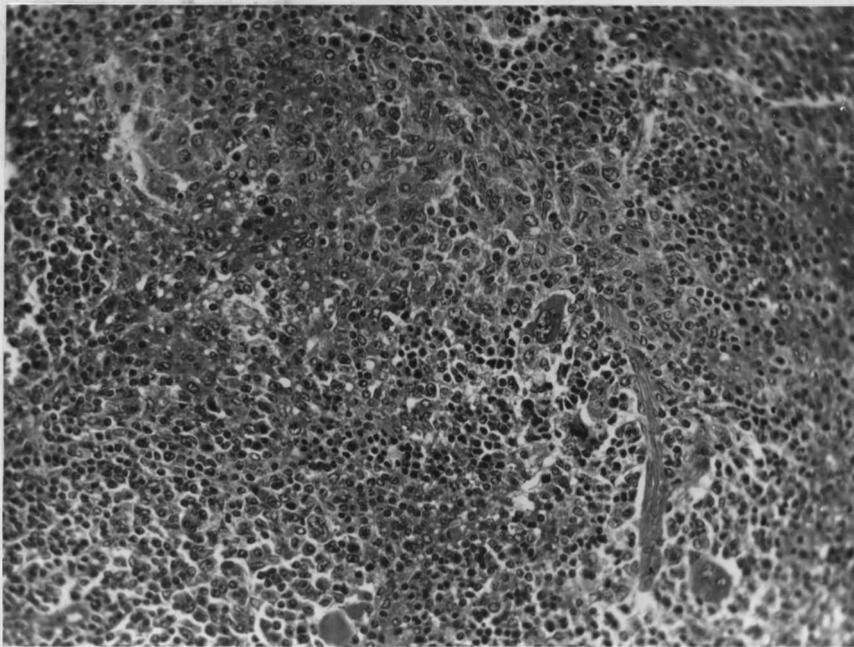


Figura 22. Polpa vermelha com foco de hiperplasia histiocitária. Baço de camundongo DBA/2 10 semanas pós infecção. HE 100X.

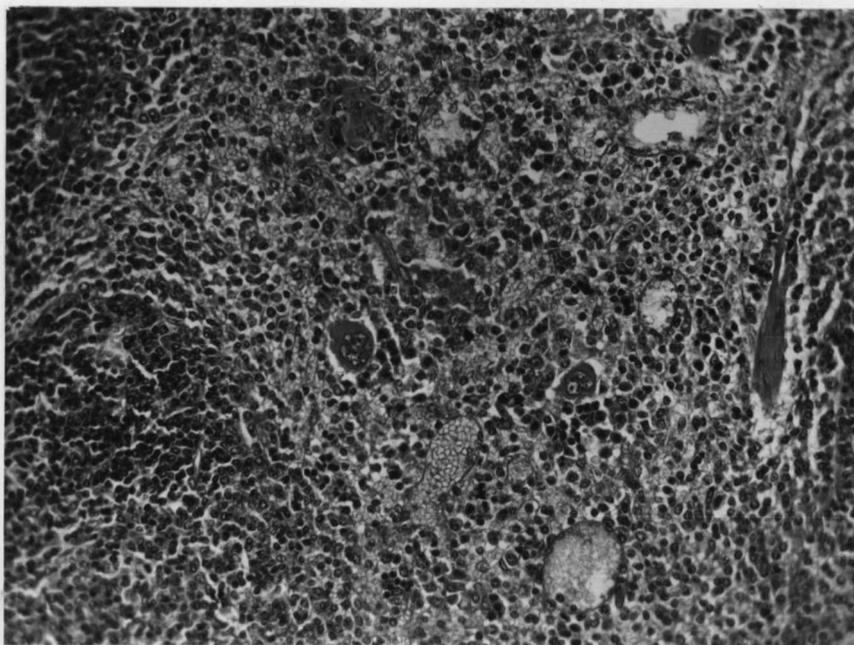


Figura 23. Polpa vermelha com área de depleção linfocitária. Baço de camundongo DBA/2 10 semanas pós infecção. HE 160X.

post infecção. HE 350X.

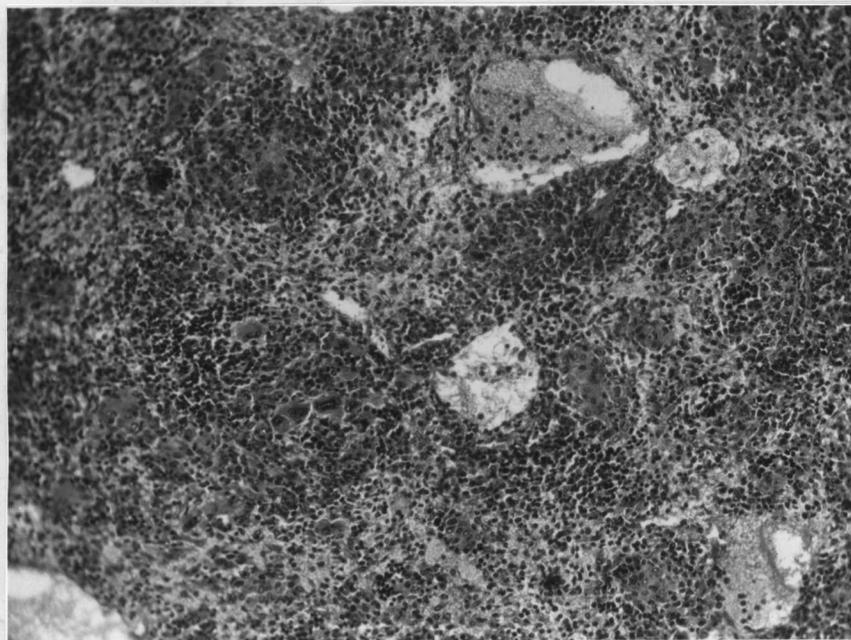


Figura 24. Polpa vermelha com alguns pequenos granulomas (setas). Baço de camundongo DBA/2 20 semanas pós infecção. HE 63X.

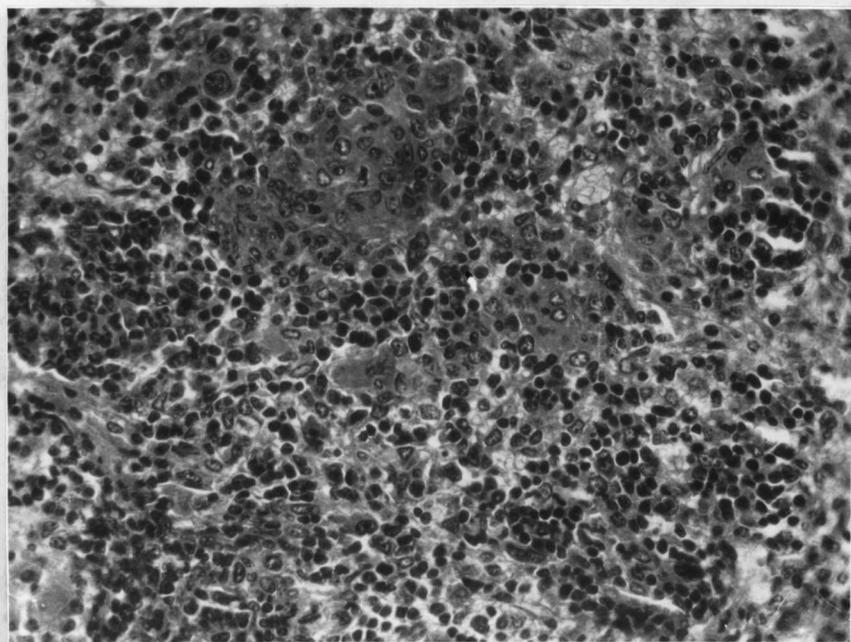


Figura 25. Polpa vermelha com granulomas mostrando tendência dos mesmos a coaléscer. Baço de camundongo DBA/2 38 semanas pós infecção. HE 250X.

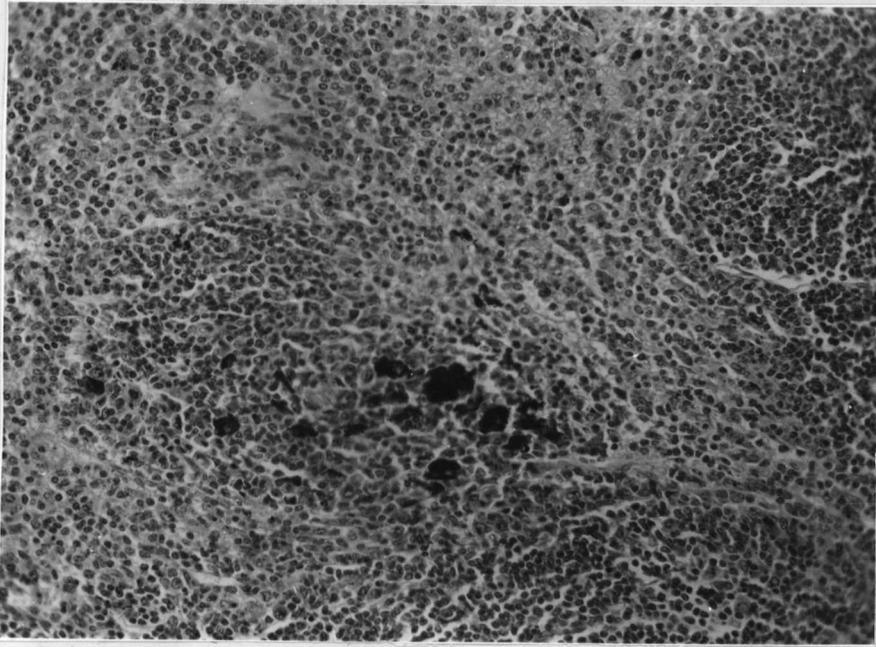


Figura 26. Acúmulos focais de pigmento acastanhado. Baço de camundongo C57BL/10 5 semanas pós infecção. HE 100X.

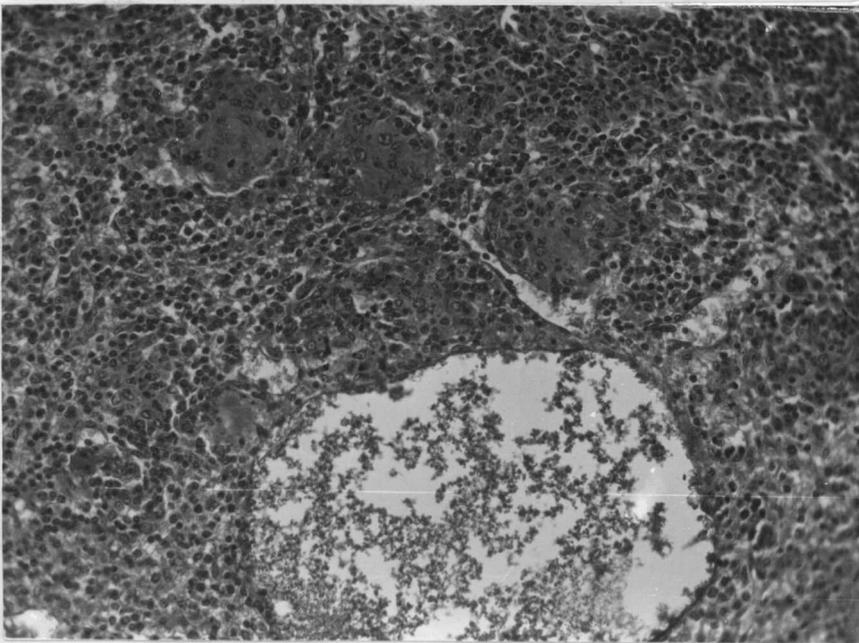


Figura 27. Granulomas compostos fundamentalmente por células tipo epitelióides. Baço de camundongo C57BL/10 10 semanas pós infecção. HE 160X.

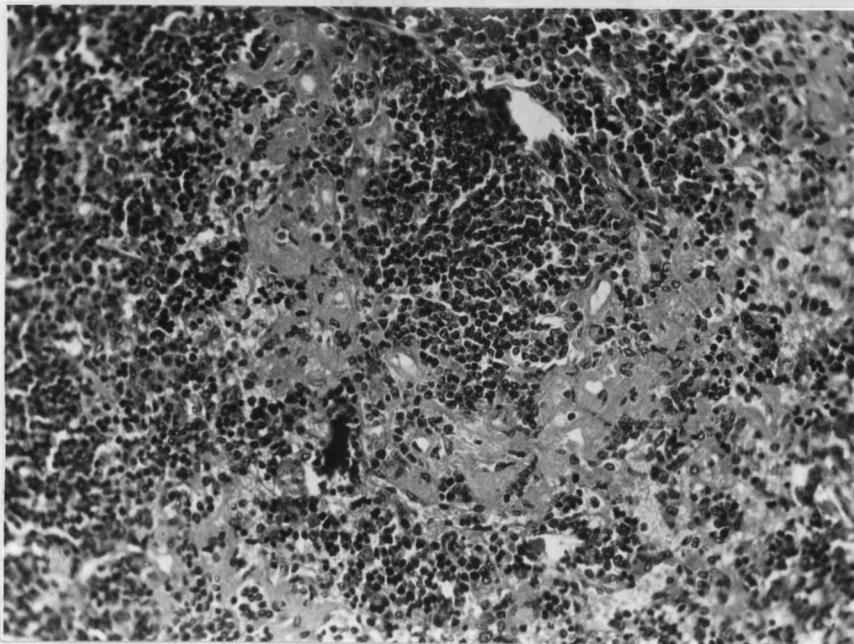


Figura 28. Deposição de substância amilóide. Baço de camundongo C57BL/10 66 semanas pós infecção. HE 160X.

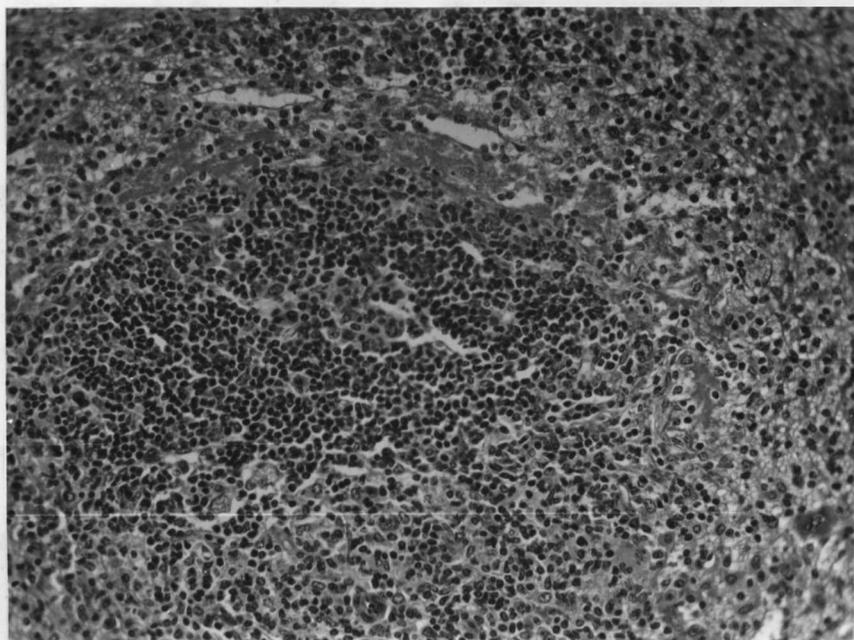


Figura 29. Deposição perifolicular de substância amilóide. Baço de camundongo C57BL/10 70 semanas pós infecção. HE 160X.

5 semanas pós infecção. HE 250X.

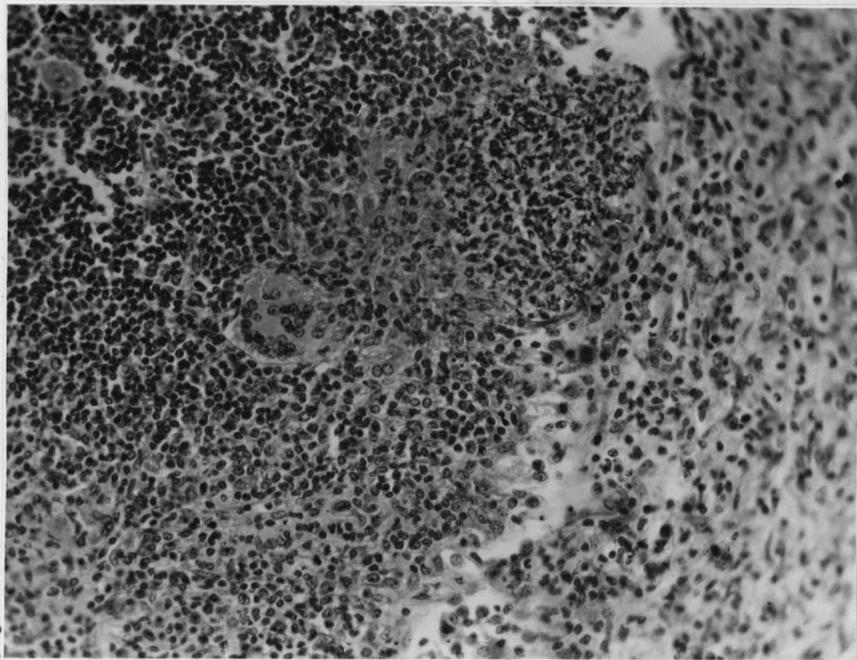


Figura 30. Seio medular com reação epitelióide. Linfonodo mesentérico de camundongo C57BL/10 1 semana pós infecção. HE 160X.

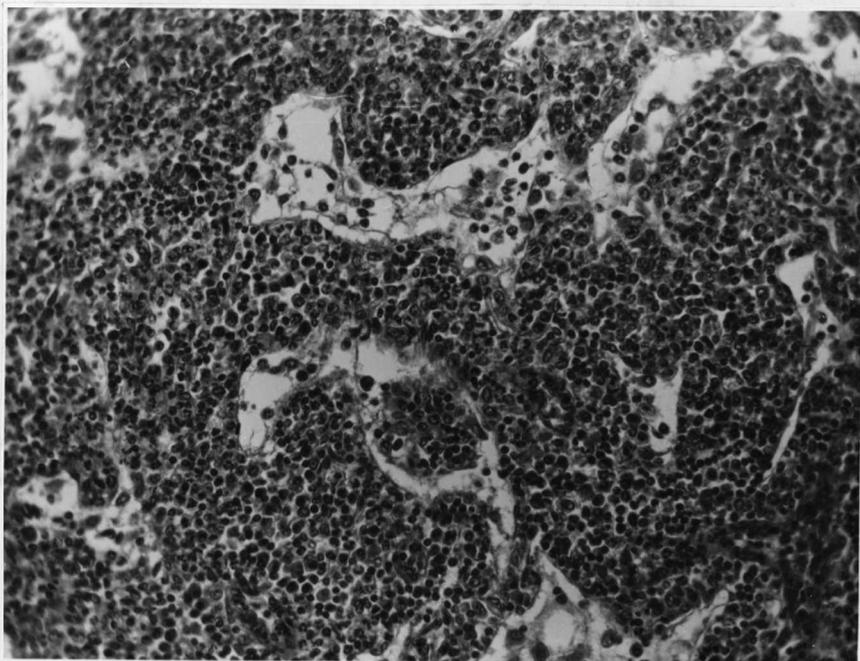


Figura 31. Plasmocitose em cordões medulares e dilatação dos seios linfáticos. Linfonodo mesentérico de camundongo C57BL/10 5 semanas pós infecção. HE 400X.

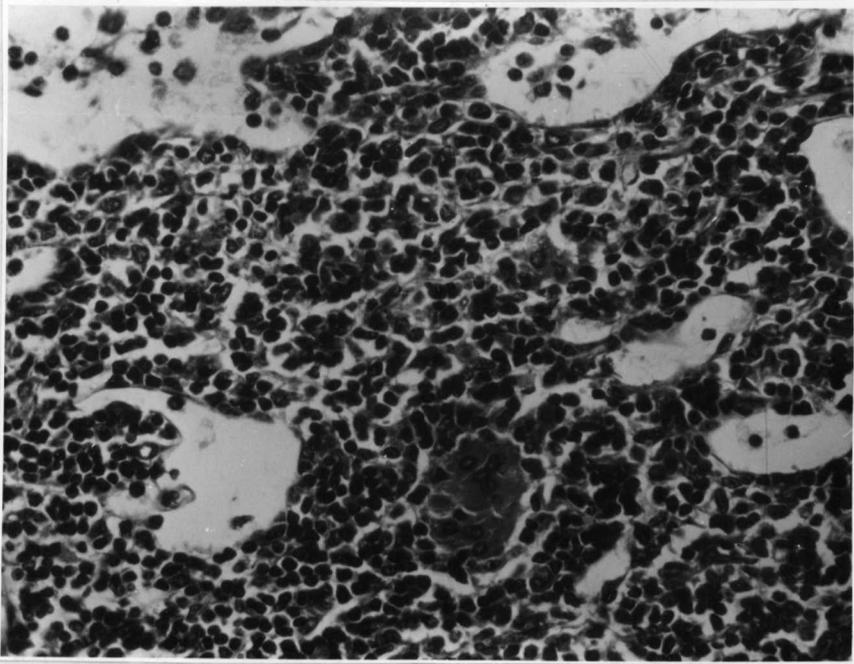


Figura 32. Células macrofágicas aparentemente em fusionamento (seta). Linfonodo de camundongo C57BL/10 66 semanas pós infecção. HE 400X.

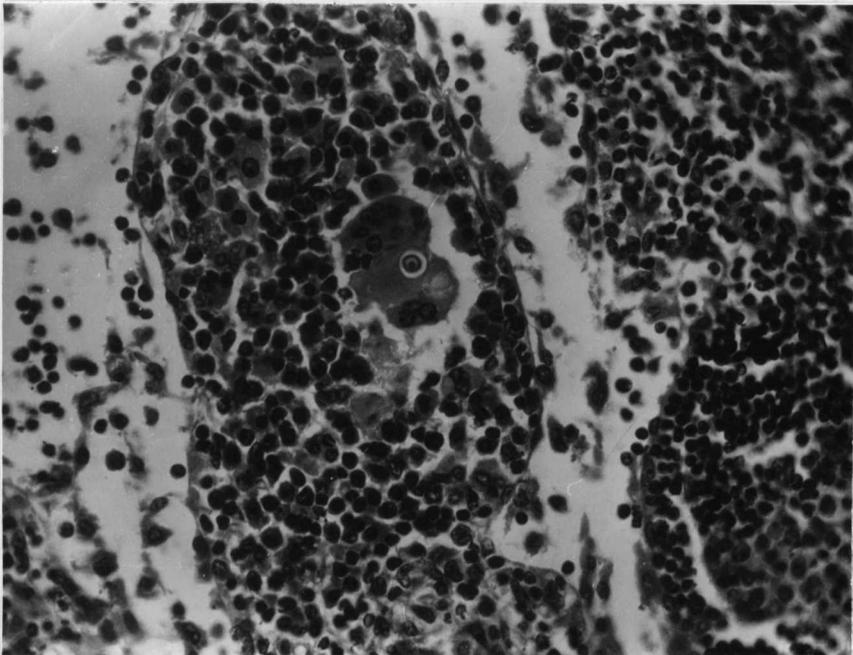


Figura 33. Célula gigante multinucleada com inclusão citoplasmática de tipo corpo de Schulman. Linfonodo mesentérico de camundongo C57BL/10 66 semanas pós infecção. HE 400X.

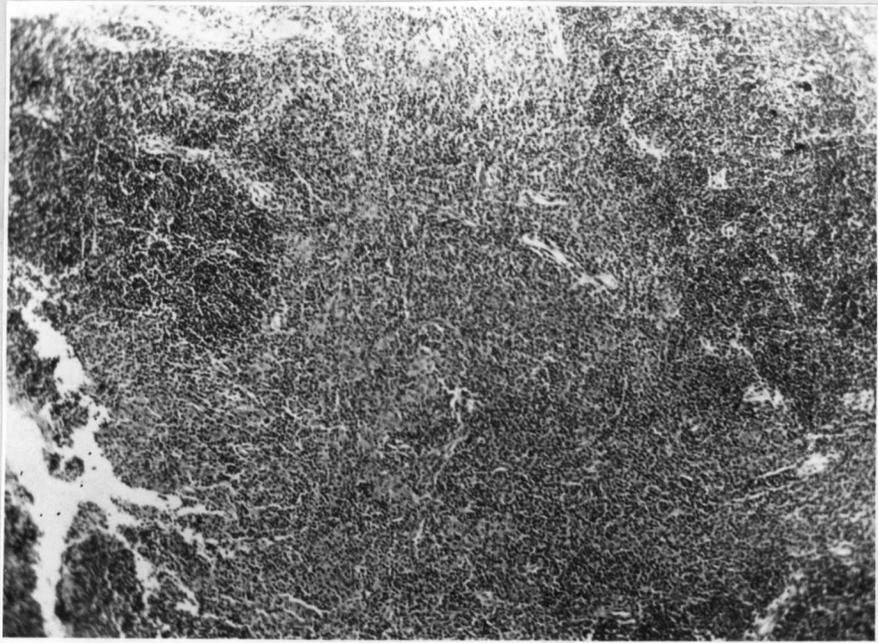


Figura 34. Aumento da celularidade e ampliação da zona medular. Timo de camundongo C57BL/10 70 semanas pós infecção. HE 63X.

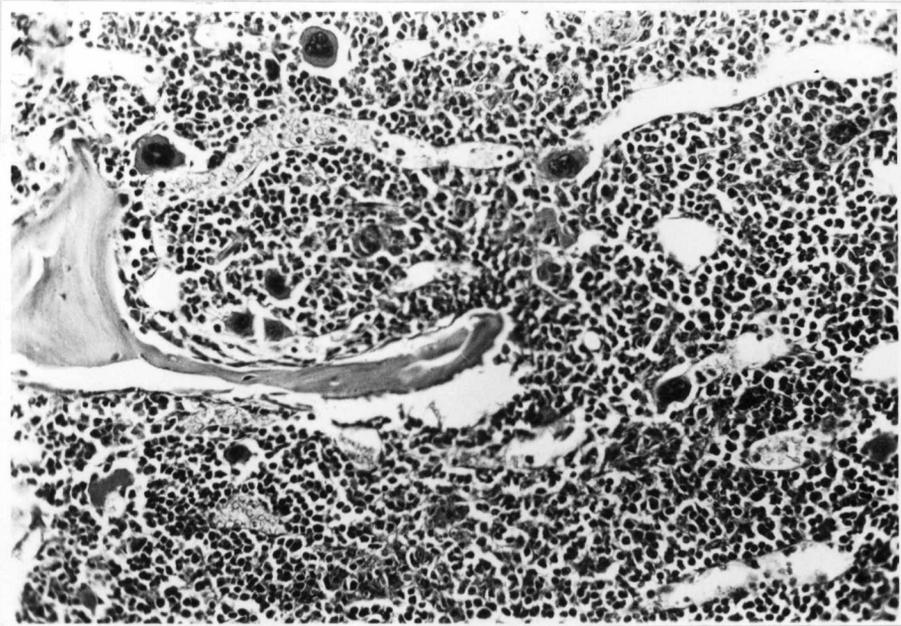


Figura 35. Medula óssea dentro dos limites da normalidade, exceto pela presença de pequenos acúmulos macrofágicos. Camundongo C57BL/10 10 semanas pós infecção. HE 100X.

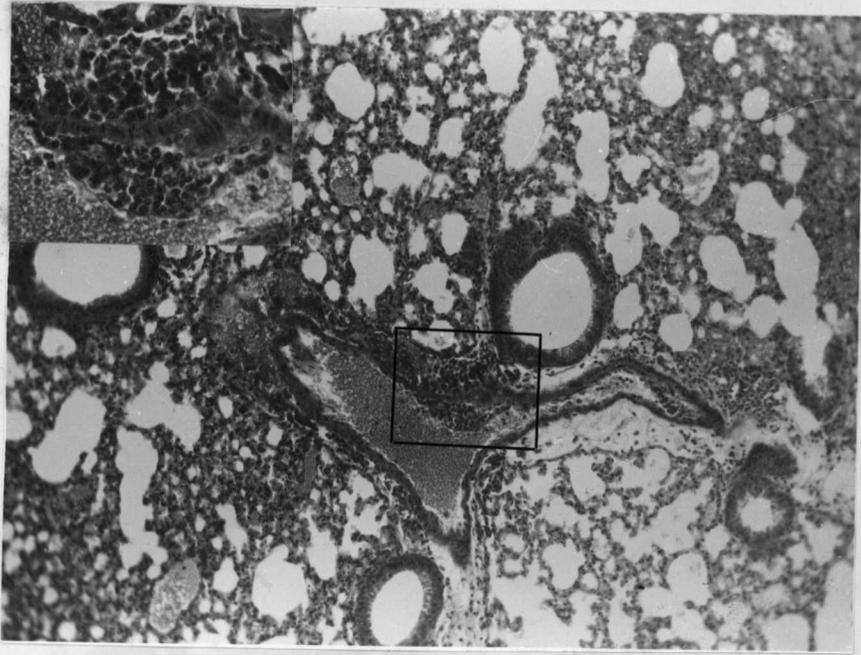


Figura 36. Lesão granulomatosa subendotelial. Pulmão de camundongo C57BL/10 3 semanas pós infecção. HE 100X. Quadro ampliado 250X.

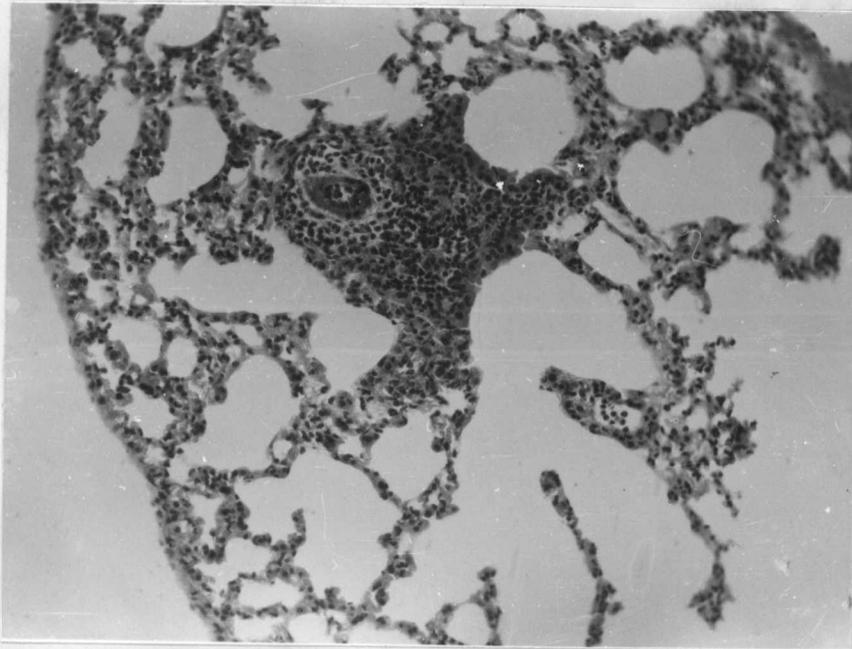


Figura 37. Infiltração inflamatória linfocitária perivascular. Pulmão de camundongo C57BL/10 5 semanas pós infecção. HE 160X.

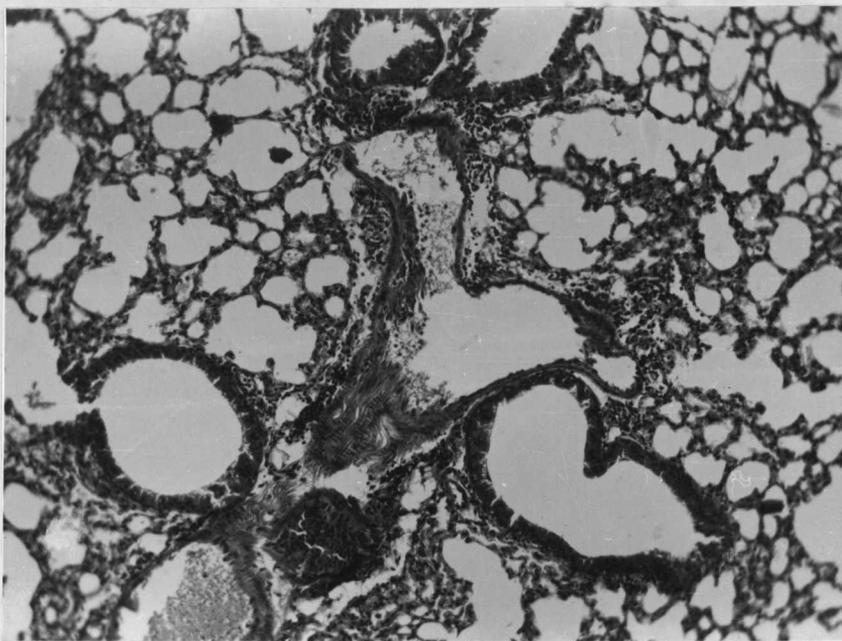


Figura 38. Infiltração inflamatória mononuclear peribrônquica e perivascular. Pulmão de camundongo C57BL/10 38 semanas pós infecção. HE 63X.

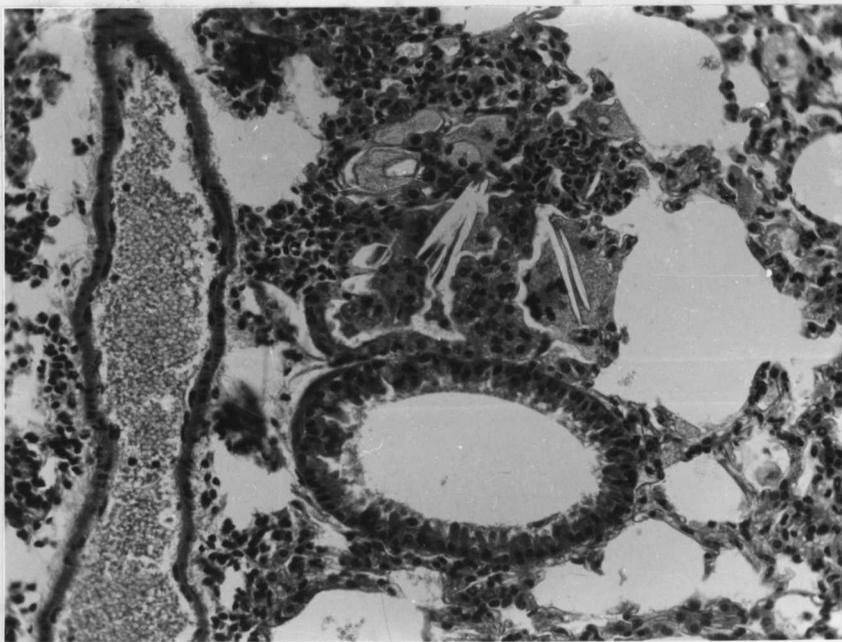


Figura 39. Reação gigantocelular em torno a imagens negativas de cristais, provavelmente de colesterol. Pulmão de camundongo C57BL/10 70 semanas pós infecção. HE 250X.

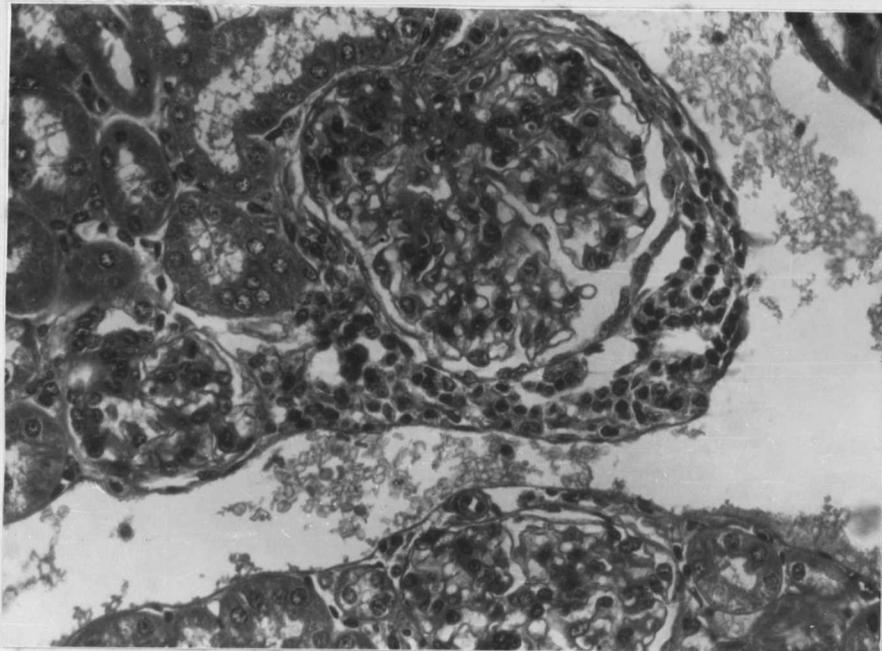


Figura 40. Infiltração inflamatória mononuclear periglomerular. Rim de camundongo DBA/2 38 semanas pós infecção. HE 250X.

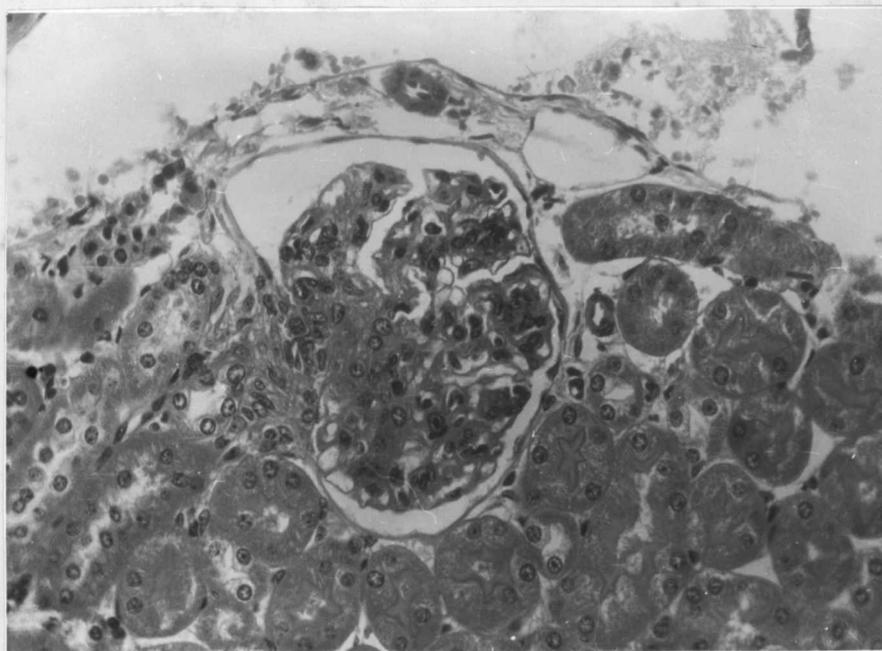


Figura 41. Glomérulo com espessamento mesangial. Rim de camundongo C57BL/10 38 semanas pós infecção. HE 250X.

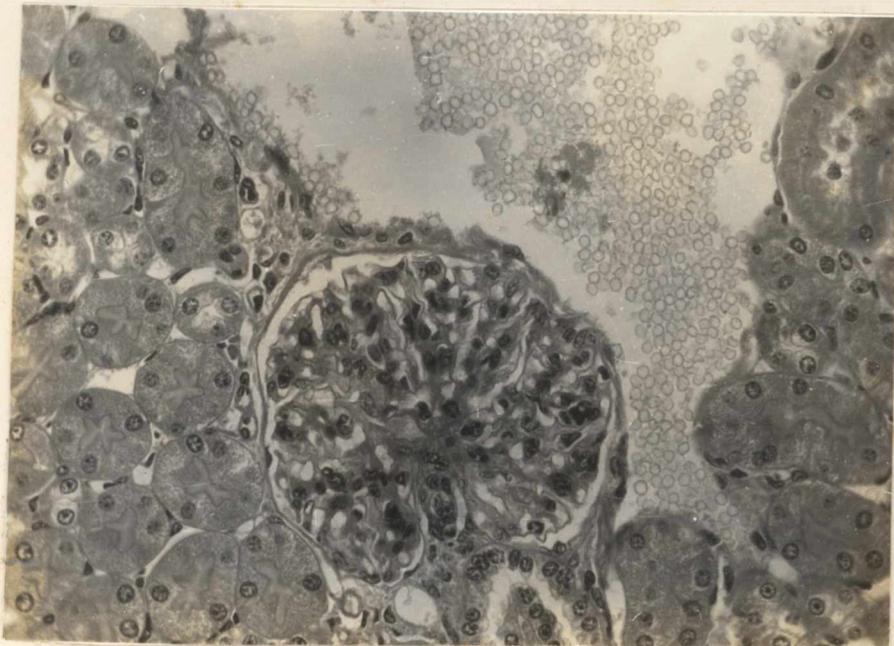


Figura 42. Glomérulo expandido, ocupando todo o espaço de Bowmam e com aparente aumento de celularidade. Rim de camundongo C57BL/10 70 semanas pós infecção. HE 250X.

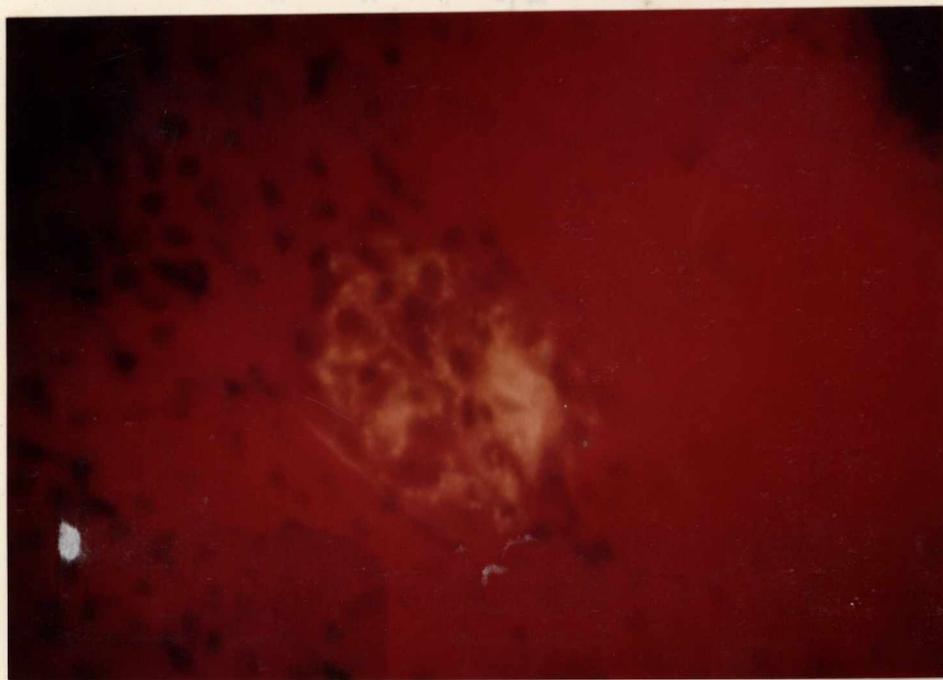


Figura 43. Depósitos focais e granulares de IgG em relação com a membrana basal glomerular e área mesangial. Imunofluorescência direta antiglobulina de camundongo. 160X.

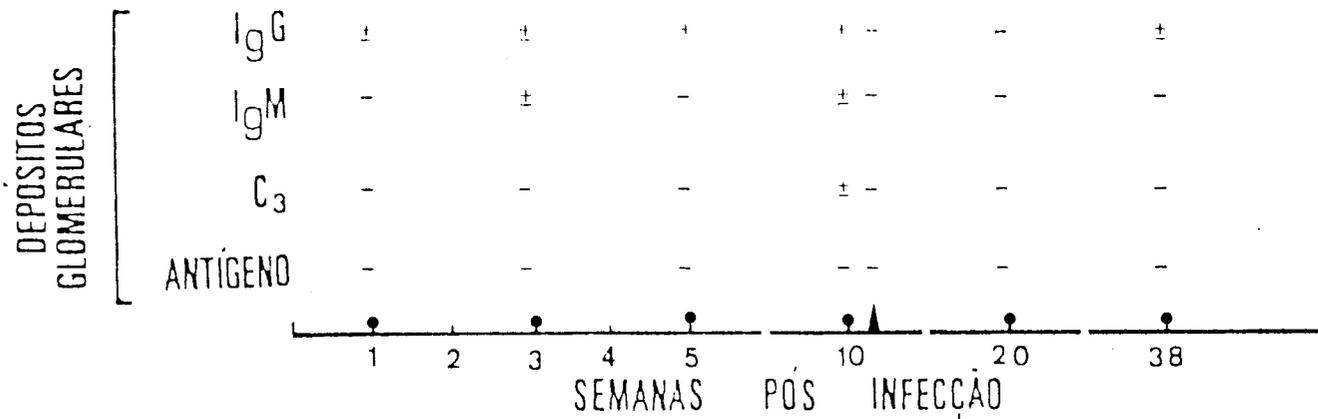


Figura 44. Depósitos glomerulares em camundongos DBA/2 infectados endovenosamente com  $2 \times 10^6$  a mastigotas de *Leishmania donovani chagasi*. ( • DBA/2 infectados, ▲ DBA/2 normais).

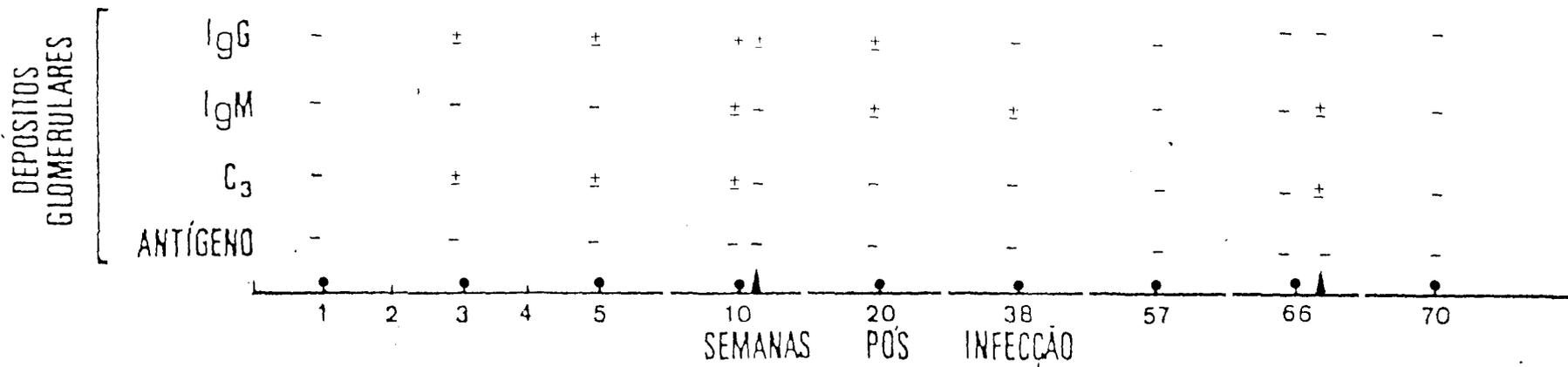


Figura 45. Depósitos glomerulares em camundongos C57BL/10 infectados endovenosamente com  $2 \times 10^6$  amastigotas de *Leishmania donovani chagasi*. (• infectados, ▲ normais).