

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E ULTRA-  
ESTRUTURAL DE ÓRGÃOS DE HAMSTER  
GOLDEN (*Mesocricetus auratus*) INFECTADOS  
COM ISOLADOS DE *Leishmania* DO COMPLEXO  
*Braziliensis***

**Raquel Peralva Ribeiro Romão  
Médica Veterinária**

**UBERLÂNDIA-MINAS GERAIS-BRASIL**

**2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E ULTRA-  
ESTRUTURAL DE ÓRGÃOS DE HAMSTER  
GOLDEN (*Mesocricetus auratus*) INFECTADOS  
COM ISOLADOS DE *Leishmania* DO COMPLEXO  
*Braziliensis***

**Raquel Peralva Ribeiro Romão**

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida de Souza**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina  
Veterinária-UFU, como parte das exigências para a  
obtenção do título de Mestre em Ciências  
Veterinárias (Saúde Animal)**

**Uberlândia – Minas Gerais – Brasil  
Janeiro - 2008**

*"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis."*

*(Fernando Pessoa)*

*Dedico este trabalho ao meu marido Wagner  
e aos meus filhos Caio e João Pedro,  
amores da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter conduzido meu destino até esta cidade;

Ao professor Marcelo Emílio Beletti, por ter sido além de orientador, professor, amigo e por ter me acolhido.

À minha co-orientadora professora Maria Aparecida de Souza, pela disponibilidade, ensinamento e por ter me apresentado ao fascinante mundo da *Leishmania*;

Aos meus pais e irmãos, por torcerem por mim e se orgulharem de mim;

Ao meu marido Wagner, pelo incentivo e paciência nos momentos mais difíceis;

Aos meus sogros Waltinho e Malu, por estarem sempre na retaguarda;

À professora Dr<sup>a</sup>. Janethe D.O. Pena, por ter cedido seu laboratório para a realização deste trabalho;

Aos amigos do BIOMOL, em especial ao Cristiano, Alexandre, Eneida, Patrícia, Fernanda Agostinho, Renata, Fer, Camila, Eduardo, Thaiane e Cecílio. Todos me ajudaram em algum momento na confecção desse trabalho;

À amiga Milene, sempre presente em todas as horas, minha verdadeira irmã;

À amiga Elenir Macedo que, mesmo longe agora, foi minha grande companheira durante o curso;

À grande amiga Cleide, pelos conselhos valiosos;

Às amigas Idessania e Angelica, o convívio com vocês tornou meus dias melhores, nunca vou esquecê-las.

À minha grande companheira Doni, sem você nada seria possível, obrigado pelo carinho e dedicação aos meus filhos;

Aos amigos da Histologia, em especial a Carlinha, Bellisa, Mariana, Léo Bruno e Priscila pelo convívio diário;

Aos funcionários da Histologia Hélgio, Richard, Rui e Juscélia que além de terem contribuído na confecção deste trabalho, foram grandes amigos;

Aos amigos da Vila Militar dos Oficiais, por terem compartilhado com minha trajetória;

A todos que de uma forma ou de outra ajudaram na realização desse sonho...

## SUMÁRIO

	página
<b>I-INTRODUÇÃO -----</b>	<b>01</b>
<b>II-REVISÃO DE LITERATURA -----</b>	<b>03</b>
2.1-Histórico das Leishmanioses -----	03
2.2-Descrição dos parasitos e epidemiologia da LTA -----	04
2.3-Manifestações Clínicas da LTA -----	06
2.4-Histopatologia das Leishmanioses em Humanos -----	08
2.5-Ultra-estrutura das Leishmanioses -----	12
2.6-Modelos Experimentais das Leishmanioses -----	14
2.7-Histopatologia das Leishmanioses Experimentais -----	15
2.8-Ultra-estrutura das Leishmanioses Experimentais -----	19
2.9-Patogenicidade e Visceralização da <i>Leishmania</i> -----	20
<b>III-MATERIAL E MÉTODO -----</b>	<b>24</b>
3.1-Animais experimentais -----	24
3.2-Parasitos -----	24
3.3-Infecção Experimental -----	24
3.4-Histopatologia -----	25
3.5-Ultra-estrutura -----	25
<b>VI-RESULTADOS -----</b>	<b>27</b>
4.1- Análise Macroscópica das Lesões -----	27

4.1.1-Cepa de Referência M2903 -----	27
4.1.2-Isolado I -----	27
4.1.3-Isolado II -----	28
4.1.4-PBS (Controle) -----	28
4.2- Análise Histopatológica -----	30
4.2.1- Cepa de Referência M2903 -----	30
4.2.2- Isolado I -----	31
4.2.3- Isolado II -----	33
4.2.4- PBS (Controle) -----	35
4.3- Análise Ultra-estrutural-----	44
4.3.1- Cepa de Referência M2903-----	44
4.3.2- Isolado I -----	44
4.3.3- Isolado II -----	47
4.3.4- PBS (Controle) -----	48
4.3.5- Análise Ultra-estrutural das Amastigotas -----	48
V- DISCUSSÃO -----	56
VI- CONCLUSÃO -----	65
VII- REFERÊNCIAS -----	66



## LISTA DE FIGURAS

	página
<b>Figura 1-</b> Fotografia de lesões macroscópicas de hamsters infectados com isolados I e II e cepa de referência M2903 -----	29
<b>Figura 2-</b> Fotomicrografias de cortes histológicos corados com HE de órgãos de hamsters infectados com cepa de referência -----	36
<b>Figura 3-</b> Fotomicrografias de cortes histológicos corados com HE de órgãos de hamsters infectados com cepa de referência -----	37
<b>Figura 4-</b> Fotomicrografias de cortes histológicos corados com HE de órgãos de hamsters infectados com isolado I -----	38
<b>Figura 5-</b> Fotomicrografias de cortes histológicos corados com HE de órgãos de hamsters infectados com isolado I -----	39
<b>Figura 6-</b> Fotomicrografias de cortes histológicos corados com HE de órgãos de hamsters infectados com isolado I -----	40
<b>Figura 7-</b> Fotomicrografias de cortes histológicos corados com HE de órgãos de hamsters infectados com isolados I e II -----	41
<b>Figura 8-</b> Fotomicrografias de cortes histológicos corados com HE de órgãos de hamsters infectados com isolado II -----	42
<b>Figura 9-</b> Fotomicrografias de cortes histológicos corados com HE de órgãos de hamsters infectados com isolado II -----	43
<b>Figura 10-</b> Eletromicrografias de órgãos de hamsters infectados com cepa de referência e isolado I -----	50
<b>Figura 11-</b> Eletromicrografias de órgãos de hamsters infectados com isolado I -----	51

<b>Figura 12-</b> Eletromicrografias de órgãos de hamsters infectados com isolado I -----	<b>52</b>
<b>Figura 13-</b> Eletromicrografias de órgãos de hamsters infectados com isolados I e II -----	<b>53</b>
<b>Figura 14-</b> Eletromicrografias de órgãos de hamsters infectados com isolado II -----	<b>54</b>
<b>Figura 15-</b> Eletromicrografias de amastigotas encontradas em órgãos de hamsters infectados com cepa de referência e isolados I e II-----	<b>55</b>

## **ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E ULTRA-ESTRUTURAL DE ÓRGÃOS DE HAMSTER GOLDEN (*Mesocricetus auratus*) INFECTADOS COM ISOLADOS DE *Leishmania* DO COMPLEXO *Braziliensis***

**RESUMO:** As leishmanioses são zoonoses que produzem diferentes manifestações clínicas dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da resposta imune do hospedeiro. O complexo *Leishmania braziliensis* é responsável pela maioria dos casos da leishmaniose tegumentar humana no Brasil e é endêmica na região do Triângulo Mineiro. Este trabalho teve como objetivo comparar a patogenia de dois diferentes isolados do complexo *Leishmania braziliensis*, provenientes de lesões cutâneas de pacientes da região do Triângulo Mineiro (MG), com a cepa de referência *Leishmania (Viannia) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903, através de análise histopatológica e ultra-estrutural de órgãos de Hamster golden (*Mesocricetus auratus*) infectados experimentalmente. Para isto,  $10^6$  promastigotas na fase estacionária de desenvolvimento de cada isolado e da cepa de referência foram inoculadas em coxim plantar de Hamsters, os quais, após períodos de 15, 30, 60 e 120 dias de infecção, foram sacrificados e destes retirados fragmentos de pele, linfonodo poplíteo, fígado, baço e medula óssea. Os órgãos foram processados para avaliação histopatológica e ultra-estrutural. Os resultados obtidos dessas análises revelaram diferentes patogenias entre os dois isolados e a cepa de referência, caracterizadas por diferenças no período de prepatência das lesões macroscópicas, no aparecimento das lesões histopatológicas, no parasitismo e na capacidade de produzir lesões metastáticas no linfonodo, fígado e baço.

**Palavras-chave:** *Leishmania braziliensis*, Hamster golden (*Mesocricetus auratus*), histopatologia, ultra-estrutura, patogenia, patologia.

**HISTOPATHOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURE ANALYSIS OF  
HAMSTER GOLDEN (*Mesocricetus auratus*) ORGANS INFECTED WITH  
*Leishmania* ISOLATES FROM *Braziliensis* COMPLEX**

**ABSTRACT:** Leishmaniasis are zoonosis with different clinical manifestations according to the *Leishmania* species involved and the host immune response. *Leishmania braziliensis* complex is responsible for the majority of human Tegumentary Leishmaniasis cases in Brazil and it is endemic in the Triângulo Mineiro region. Our aim was to compare the pathogeny of two different isolates of *Leishmania braziliensis* complex, obtained from cutaneous lesions of patients from Triângulo Mineiro region, with *Leishmania (Viannia) braziliensis* reference strain (MHOM/BR/75/M2903). Comparision was done by histopathological and ultrastructural analisys of organs of experimentally infected Hamster golden (*Mesocricetus auratus*). For that,  $10^6$  stationary promastigotes of the two isolates and the reference strain were subcutaneously inoculated in the hind forepaw of Hamster that were killed after 15, 30, 60 e 120 days post infection and then were collected fragments of the skin, popliteal lymph node, liver, spleen and bone marrow. The organs were processed for histopathological and ultrastructural analysis. The results showed differents pathogeny between both isolates and the reference strain, characterized for differences in prepatent period of the macroscopy lesions, in the outcome of the histopathological lesions, in the parasitism and in the capacity to produce metastatic lesions in the lymph node, liver and spleen.

**Key-word:** *Leishmania braziliensis*, Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*), histopatholgy, ultrastructure, pathogeny, pathology.

## Introdução

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania* transmitidos através da picada de fêmeas infectadas de dípteros da sub-família Phlebotominae, gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo ou *Lutzomia* no Novo Mundo (Gontijo e Carvalho, 2003). São zoonoses originalmente associadas a áreas florestais e o homem é considerado um hospedeiro acidental (Grimaldi e Tesh, 1993). Os animais reservatórios apresentam variação geográfica e incluem roedores, cães e outros mamíferos (Handaman, 2001)

Vinte espécies de *Leishmania* são patogênicas para o homem e 30 espécies de flebotomíneos são vetores comprovados. A doença se manifesta por meio de quatro apresentações clínicas diferentes: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea, leishmaniose cutâneo-difusa e leishmaniose visceral (Rey, 2001; Harris et al, 1998; Grimaldi e Tesh, 1993, Desjeaux, 2004).

As leishmanioses ocorrem predominantemente em regiões tropicais e subtropicais, com distribuição geográfica mundial, atingindo 88 países, desses 22 localizados no continente americano. Com uma prevalência anual estimada em 1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500 mil casos de leishmaniose visceral, sua prevalência total é de 12 milhões de pessoas com uma população de risco estimada em 350 milhões de pessoas (Desjeaux, 2004). O Brasil está entre os sete países mais acometidos pela leishmaniose cutânea e entre os cinco países mais acometidos pela leishmaniose visceral, fato este que torna essas doenças importante problema de saúde pública (Desjeaux, 2004; Gramiccia e Gradoni, 2005).

As espécies do complexo *Leishmania braziliensis* são responsáveis pela Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), cuja apresentação clínica varia desde úlceras únicas que tendem à cura até lesões destrutivas da mucosa nasofaríngea, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. Tanto no Brasil como em outros países do Novo Mundo, a LTA é considerada um problema de saúde pública devido a sua alta incidência, ampla distribuição geográfica e à possibilidade de assumir formas destrutivas e desfigurantes, com repercussão no campo psicossocial do indivíduo (Gontijo e Carvalho, 2003).

No Brasil, a LTA encontra-se distribuída em todo o território nacional, sendo endêmica em áreas como o sul do Estado de Minas Gerais e o Triângulo Mineiro, entre outras (Rey, 2001). No Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) em MG, recentemente foram observados vários casos de leishmaniose tegumentar americana em pacientes oriundos da região do Triângulo Mineiro. Em alguns casos o diagnóstico foi confirmado através do isolamento dos parasitos em cultura e por PCR multiplex, que os caracterizou como pertencentes ao complexo *Leishmania braziliensis*. Em estudos preliminares em camundongos, esses isolados apresentaram graus variados de patogenicidade (Dados do Laboratório de Biologia Molecular-ICBIM-UFU).

Este trabalho teve como objetivo comparar a patogenia de dois diferentes isolados do complexo *Leishmania braziliensis* provenientes de pacientes atendidos no HC da UFU com a cepa de referência de *Leishmania (Viannia) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903, através de estudo de alterações histopatológicas e ultraestruturais em órgãos de Hamster Golden (*Mesocricetus auratus*), após diferentes tempos de infecção experimental.

## II. Revisão de Literatura

### 2.1. Histórico das leishmanioses

Estudos moleculares recentes demonstram que o gênero *Leishmania* teve origem há cerca de 120 milhões de anos, quando os continentes ainda estavam unidos (ALTAMIRANO-ENCISO et al, 2003). A leishmaniose cutânea (LC) é conhecida desde a antiguidade, sendo seu relato no Velho Mundo datada do primeiro século depois de Cristo. A primeira descrição de uma lesão lembrando a doença foi feita por Russel em 1756, que a denominou como o mal de Aleppo da Síria (CHOI, LERNER, 2001). Nas Américas, ceramistas incas do Peru já haviam retratado a leishmaniose mucocutânea (LMC) em esculturas no período pré-hispânico e a doença foi referida pelos primeiros colonizadores espanhóis, no século XVII (ALTAMIRANO-ENCISO et al, 2003).

Cerqueira em 1855 no Brasil observou a existência de moléstias cutâneas e as relacionou com o botão de Briska, uma das denominações da leishmaniose tegumentar no Velho Mundo (REY, 2000, BASANO, CAMARGO, 2004). Porém as primeiras observações do parasito foram feitas no final do século XIX por Cunningham, em 1885, ao identificar formas amastigotas do parasito em casos de leishmaniose visceral na Índia. Em 1898, Borovsky identificou *Leishmania* em paciente com a forma cutânea da doença na Ásia Central (RATH et al, 2003). Leishman e Donovan, em 1903, redescreveram o parasito de um caso de calazar indiano o qual foi denominado *Leishmania donovani* por Ross neste mesmo ano. Ainda em 1903, Wright isolou o parasito em lesão cutânea de uma criança armênia, o qual chamou de *Leishmania tropica* (REY, 2000).

No Brasil Lindeberg, Carini e Paranhos em 1909 demonstraram a presença do parasito em lesões de pacientes brasileiros, que, no mesmo ano foi denominado *Leishmania braziliensis* por Gaspar Vianna (REY, 2000, CAMARGO, LANGONI, 2006; BASANO, CAMARGO, 2004). Até a década de 70, todos os casos de LC no Brasil eram atribuídos a *Leishmania (V.) braziliensis*, pela dificuldade na distinção dos parasitos através da microscopia ótica. Com o desenvolvimento de novas

técnicas de cultura e isolamento em animais de laboratório, e com a intensificação de estudos ecoepidemiológicos, novas espécies de *Leishmania* foram descritas e relacionadas à etiologia da leishmaniose tegumentar americana (LTA) (BASANO, CAMARGO, 2004; VALE, FURTADO, 2005).

## 2.2. Descrição dos parasitos e epidemiologia da LTA

Protozoários do gênero *Leishmania* são os agentes causais das leishmanioses e estão entre os patógenos humanos de maior diversidade, tanto em termos de distribuição geográfica como em termos de variedade de apresentações clínicas causadas por eles (TRIPATHI, SINGH, NAIK, 2007). Pertencendo à ordem **Kinetoplastida**, família **Tripanossomatidae** gênero *Leishmania*, são parasitos intracelulares obrigatórios do sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro vertebrado, representado por mamíferos de várias ordens e espécies, onde existem sob a forma amastigota. No hospedeiro invertebrado, dípteros flebotomíneos, vivem sob a forma promastigota extracelular, dotada de flagelo (REY, 2001; ALEXANDER, SATOSKAR, RUSSELL, 1999). A principal característica da ordem Kinetoplastida é a presença, além das estruturas celulares habituais, de uma organela singular, o cinetoplasto, formado pelo prolongamento da mitocôndria onde se encontra abundante DNA de tipo especial, o kDNA (REY, 2001).

A LTA é uma doença que acomete as estruturas da pele e cartilagens da nasofaringe, de forma localizada ou difusa, ocorrendo em quase todos os países americanos, desde o sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai, causadas por várias espécies de *Leishmania* dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (BRASIL, 2006), sendo as seguintes espécies envolvidas na LTA humana: *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (Leishmania) venezuelensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) panamensis*, *L. (Viannia) peruviana*, *L. (Viannia) lainsoni*, *L. (Viannia) naiffi*, *L. (Viannia) shawi*, *L. (Leishmania) pifanoi* (BASANO, CAMARGO, 2004).

No Brasil a LTA é encontrada em todos os estados brasileiros, sob diferentes perfis epidemiológicos de acordo com as características biogeográficas da região em



questão (BASANO, CAMARGO, 2004). Sua incidência vem aumentando muito nos últimos anos, podendo esta doença ser encontrada nas regiões florestais com vegetação abundante, propícias à manutenção dos vetores e mamíferos silvestres infectados, também em regiões desmatadas, com adaptação dos vetores e mamíferos reservatórios a ambientes modificados e em áreas rurais e urbanas, com transmissão peridomiciliar. Embora considerada como uma doença de caráter rural, tem-se observado sua expansão para cidades de médio e grande porte, principalmente em consequência do processo de urbanização. Devido a sua crescente distribuição geográfica no Brasil associada às dificuldades terapêuticas e às deformidades e seqüelas que pode acarretar, a LTA é considerada como uma das infecções dermatológicas mais importantes do nosso país (MAYWALD et al, 1996; DIAS et al, 2007).

As espécies causadoras da LTA no Brasil são: *Leishmania (L.) amazonensis* que causa úlcera cutânea localizada ou a forma difusa anérgica estando distribuída no Brasil principalmente na bacia amazônica e também em áreas de matas residuais no Amazonas, Pará, Rondônia, sudoeste do Maranhão, Bahia, Goiás e Minas Gerais; *Leishmania (V.) guyanensis*, que causa predominantemente lesão cutânea ulcerada, estando distribuída ao norte do rio Amazonas, nos estados do Amazonas, Pará, Roraima e Amapá; *Leishmania (V.) braziliensis*, responsável por lesões cutâneas localizadas ou lesões mucosas metastáticas, de distribuição ampla por todo o território brasileiro, tanto em áreas de colonização recente como antiga em todos os cinco estados; e *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) naiffi* e *Leishmania (V.) lanisoni*, descobertas recentemente e limitadas à região Amazônica nos estados do Pará, Amazonas e Rondônia, causando no homem lesões cutâneas (BRASIL, 2006; BASANO, CAMARGO, 2004).

A partir da década de 90 foi notificada uma média de 32 mil novos casos da doença, sendo a região Norte a mais acometida, com 45% dos casos, predominando nos estados do Pará, Amazonas e Rondônia, a região Nordeste com 26% dos casos, principalmente nos estados do Maranhão, Ceará e Bahia, a região Centro-Oeste com 15% dos casos com maior freqüência em Mato Grosso, a região Sudeste com 11% dos casos, predominantemente em Minas Gerais e a Região Sul

apresentando 3% dos casos, com destaque para o estado do Paraná (BRASIL, 2006).

Em Minas Gerais, a LTA ocorre desde a década de 50, com surtos relacionados ao desmatamento e à construção de rodovias bem como ao desenvolvimento da agricultura. A partir da década de 80 as regiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba foram consideradas endêmicas, onde a espécie *Leishmania (V.) braziliensis* foi considerada como o agente causal, apesar do pequeno número de casos notificados no período de 1981 a 1986. Em julho de 1987 foram registrados vários casos autóctones da doença, caracterizando uma microepidemia na região, principalmente nos municípios de Uberlândia e Indianópolis. Desde então a busca ativa de casos em área de risco e a assistência para o diagnóstico e tratamento precoce têm mostrado um crescente número de doentes (MAYWALD et al, 1996; REY, 2001).

Dentre as espécies causadoras da LTA a *Leishmania (V.) braziliensis* é responsável por lesões cutâneas e mucosas metastáticas e considerada a espécie de maior distribuição geográfica, sendo encontrada nas Américas Central e do Sul, de Belize até a Argentina. No Brasil está amplamente distribuída em todas as regiões (BASANO, CAMARGO, 2004; GRAMICIA, GRADONI, 2005). Na floresta amazônica seu vetor é *Psychodopygus wellcomei*, sendo seus hospedeiros reservatórios ainda desconhecidos. Nas áreas rurais modificadas da caatinga, cerrado e Mata Atlântica, de Minas Gerais até a Região Norte, sua transmissão está associada a *Lutzomia whitmani*. Nas áreas litorâneas e nos vales de rios dos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, a transmissão é peridomiciliar, associada ao *Lutzomia intermédia*, de hábitos peridomésticos, é provavelmente ao *Lutzomia migonei* e *Lutzomia fischeri* (BRASIL, 2006).

### **2.3- Manifestações clínicas da LTA**

As lesões da LTA surgem no ponto de inoculação das formas promastigotas pela picada da fêmea infectada do flebotômio e geralmente são únicas, ou também

múltiplas, decorrentes de várias picadas do inseto vetor, geralmente nas partes expostas do corpo. O período de incubação varia de uma semana a três meses, evoluindo como uma pápula eritematosa que progride lentamente para a formação de um nódulo e então ulcera. As lesões típicas são ulceradas, com bordos elevados, fundo raso de aspecto granular, geralmente coberto por uma crosta (GONTIJO, CARVALHO, 2003).

Em 12 a 30% dos casos, as lesões são acompanhadas de adenopatia regional, com ou sem linfangite. O quadro geralmente é assintomático e indolor, e infecções secundárias são freqüentes, levando à dor. A úlcera leishmaniótica apresenta tendência a cronicidade, podendo evoluir para a expansão ou, mesmo sem tratamento, para a cicatrização, ocorrendo dentro de meses ou anos, formando uma cicatriz atrófica (REY, 2001; HEPBURN, 2003; GONTIJO, CARVALHO, 2003).

O acometimento mucoso é a condição mais grave em casos de infecções por *Leishmania (V.) braziliensis*, levando a lesões desfigurantes que atingem a mucosa nasofaringeana, conhecida como leishmaniose mucocutânea, sendo causada excepcionalmente por *Leishmania (L.) amazonensis* e pela *Leishmania (V.) guyanensis*. No Brasil, 3 a 5 % dos casos de LC evoluem para a LMC, embora em áreas endêmicas já foi relatada incidências altas de 34% (CHOI, LERNER, 2001). Cerca de 1% desses pacientes vão a óbito (BRASIL, 2006), estando a lesão cutânea ainda em atividade ou anos após sua cicatrização (GONTIJO, CARVALHO, 2003). Na região amazônica, 59% dos casos eram resultantes de pacientes que apresentavam lesões cutâneas muito antigas e não tratadas (SILVEIRA, LAINSONI, 2004).

A LMC é caracterizada pela capacidade metastática do parasito da lesão primária inicial até o tecido mucoso através da via linfática (REITHINGER et al, 2007), visto que este pode ser isolada do linfonodo que drena o local da lesão, ou sangüínea, confirmado por trabalho realizado com PCR, onde foi possível a detecção do parasito em sangue de 26,2% dos pacientes que viviam em região endêmica, portadores de lesões cutâneas ou mucosas ativas ou cujas lesões já haviam cicatrizado (CAMERA et al, 2006). Os fatores que contribuem para essa evolução podem estar associados com a demora na cicatrização da lesão primária,

com o tratamento inicial inadequado ou com o não tratamento (GONTIJO, CARVALHO, 2003).

O quadro da LMC começa tipicamente com inflamação e obstrução nasal (forma moderada), evoluindo para a ulceração da mucosa nasal e perfuração do septo. Em alguns casos os lábios, bochechas, palato mole, laringe e faringe também estão envolvidos (forma grave). A necrose na LMC é progressiva, não cura espontaneamente e é de difícil tratamento, geralmente levando a infecções secundárias, podendo ser potencialmente fatal (CAMERA et al, 2006; REITHINGER et al, 2007).

## **2.4- Histopatologia das leishmanioses em humanos**

As manifestações clínicas e histopatológicas observadas na LC dependem da espécie de *Leishmania* envolvida, do tamanho do inóculo e do status imunológico do indivíduo em regiões endêmicas e não endêmicas. As diferentes linhagens de *Leishmania* apresentam variação em seus determinantes genéticos de virulência (MEHERGAN, MEHREGAN, MEHREGAN, 1999).

Em todas as formas de leishmanioses a presença das formas amastigotas dentro de células do sistema mononuclear fagocitário é a característica marcante da doença (HEPBURN, 2000). Os macrófagos infectados medem de 20 a 30 micrômetros de diâmetro, onde as formas amastigotas de *Leishmania* são encontradas como corpúsculos redondos ou ovais, chamados corpúsculos de Leishman-Donovan, medindo entre 2 e 5 micrômetros de diâmetro, o que representa cerca da oitava parte do tamanho do núcleo de um macrófago. O citoplasma dos parasitos é corado em azul claro pelos métodos Giemsa, Wright e Romanovski e em azul acinzentado claro quando corado pela Hematoxilina e Eosina. O núcleo e o cinetoplasto baciliforme, reto ou curvo aparecem com menos de 1 micrômetro de diâmetro e se coram em rosa avermelhado pelo Giemsa ou levemente basofílico pela Hematoxilina e Eosina (REY, 2001; MEHREGAN, MEHREGAN, MEHREGAN, 1999; HEPBURN, 2000; BRASIL, 2007).

O estudo histopatológico da LC mostra alterações na epiderme e/ou na derme, dependendo do tipo e do estágio da doença (CHOI, LERNER, 2001). O estágio inicial da lesão cutânea é caracterizado por um infiltrado celular misto, constituído principalmente por macrófagos e por quantidades variáveis de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos. Formas amastigotas de *Leishmania* são encontrados inicialmente dentro dos macrófagos, mas quando em grande número, podem ser vistas também no meio extracelular (MEHREGAN, MEHREGAN, MEHREGAN, 1999; REY, 2000; BAILEY, LOCKWOOD, 2007). Nesta fase os parasitos são numerosos na LC, muito abundantes na leishmaniose cutâneo-difusa e raros na LMC (CHOI, LERNER, 2001).

A presença de linfócitos, neutrófilos e macrófagos ativados geralmente está associada com poucos parasitos presentes. Com a evolução da lesão surge uma reação granulomatosa, raramente vista no início da doença (MEHREGAN, MEHREGAN, MEHREGAN, 1999), constituída principalmente por células epitelióides, que são agregados de macrófagos formando áreas claras conhecidas como clareiras de Montenegro (REY, 2001), aparecendo na parte superior da derme, podendo atingir a derme inteira, sendo rodeado por infiltrado histiolinfocitário leve a moderado. Células gigantes de Langhans podem ser observadas (MEHREGAN, MEHREGAN, MEHREGAN, 1999).

Na fase mais tardia da lesão, plasmócitos e linfócitos podem ser observados e a derme torna-se edemaciada. Nesta fase, é observada necrose das células parasitadas, provavelmente resultante da morte de macrófagos mediada por anticorpos, onde as amastigotas dentro de macrófagos estão presentes em cerca da metade dos casos (MEHREGAN, MEHREGAN, MEHREGAN, 1999). As alterações da epiderme são variáveis, podendo haver hiperqueratose com ou sem paraqueratose, atrofia ou acantose da epiderme. Microabscessos intraepidérmicos ou amastigotas são raramente vistos na epiderme. A epiderme hiperqueratótica se rompe formando a úlcera, coberta por um coágulo de debris hiperqueratóticos, exsudato ressecado, células mortas e parasitos vivos ou mortos (GHERSETICH et al, 1999; HEPBURN, 2000).

Visto que o quadro histopatológico da LC e LMC pode variar de um infiltrado inflamatório de células mononucleares e neutrófilos até uma reação granulomatosa com ou sem necrose, foram propostas várias classificações de acordo com esses diferentes padrões histopatológicos, com vários significados clínicos e prognósticos. A primeira classificação foi proposta por Azulay, em 1960, que acreditava que a inflamação exsudativa aguda representava a fase inicial da lesão de LC e o granuloma tuberculóide a etapa final do processo inflamatório (BITTENCOURT, BARRAL, 1991).

Em 1980 Ridley classificou 60 biópsias de LC e LMC em cinco grupos: o grupo I era quase normal, com exceção de locais contendo degeneração de colágeno, no grupo II a característica predominante era um processo necrótico mais severo que o encontrado no grupo I; o grupo III correspondia a um intenso infiltrado inflamatório sem necrose e granuloma e os grupos IV e V estavam associados com células epitelióides e células gigantes, estando as lesões cutâneas que responderam bem ao tratamento ou tiveram cura espontânea associados aos grupos II e IV, os dos grupos I e V tiveram envolvimento mucoso e responderam pouco ao tratamento, e os paciente do grupo III tiveram lesões cutâneas de longa evolução que apresentaram diferentes respostas à terapêutica. De acordo com essa classificação, Ridley considerou que a necrose com resposta reativa observada no grupo II era a de melhor prognóstico (BITTENCOURT, BARRAL, 1991).

Em estudos histopatológicos de lesões cutâneas e mucosas em pacientes de região endêmica da LTA causada pela espécie *Leishmania (V.) braziliensis* no Brasil, foram observadas diferentes alterações dérmicas ou no córion das membranas mucosas, sendo estas classificadas então dentro de cinco diferentes padrões histopatológicos (MAGALHÃES et al, 1986).

O padrão I, o mais encontrado tanto na LC como na LMC, consistia na Reação Exsudativa Celular, descrito como processo inflamatório crônico inespecífico, formado por um infiltrado histiolinfoplasmocitário, com proporções celulares tendendo à equivalência; no padrão II, a Reação Exsudativa e Necrótica, correspondia a uma reação crônica inespecífica com necrose, vista no seio do infiltrado, quase sempre próxima à úlcera, mas também tendo sido observada longe

desta. O padrão III foi a Reação Exsudativa e Necrótico-Granulomatosa, representado por uma inflamação crônica granulomatosa acompanhada de necrose, era constituído por infiltrado celular e necrose além da reação granulomatosa desorganizada, com macrófagos na maioria ativados e células gigantes imaturas ou bem desenvolvidas, próximas à área necrosada. O padrão IV era a Reação Exsudativa e Granulomatosa, correspondendo a uma inflamação crônica granulomatosa desorganizada, sem necrose tecidual. Finalmente no padrão V, estava a Reação Exsudativa e Tuberculóide, representado por uma inflamação crônica granulomatosa tuberculóide e constituído por granulomas organizados onde macrófagos, células epitelióides e células gigantes do tipo Langhans se dispunham em arranjos tuberculóides bem delimitados(MAGALHÃES et al, 1986).

Uma nova proposta de classificação histopatológica mais simplificada, constituiu-se de apenas três padrões histopatológicos: o Padrão A, formado por um infiltrado inflamatório de plasmócitos, linfócitos e macrófagos, sem células epitelióides e células gigantes; no padrão B havia a ocorrência de células epitelióides e/ou células gigantes em um padrão aleatório associado com um infiltrado inflamatório; e no padrão C havia a presença de granulomas bem circunscritos com células epitelióides ou células gigantes, associadas ou não com outros dois padrões. Nesse mesmo estudo, analisando casos de LC e LMC através da análise histopatológica de duas biópsias simultâneas coletadas de um mesmo paciente, os autores afirmaram a impossibilidade da classificação das lesões de LC e LMC baseados nos aspectos histopatológicos visto que mais de um padrão foi observado em áreas distintas de uma mesma lesão, concluindo que os padrões histopatológicos não representam estágios da leishmaniose tegumentar e por isso não podem ser correlacionados com o prognóstico nem com a resposta terapêutica, como sugerido por outros autores (BITTENCOURT, BARRAL, 1991).

Estudos histopatológicos e imunohistoquímicos de lesões de LTA de 21 pacientes, classificaram-nas segundo critério proposto por Magalhães em 1986, onde os padrões predominantes foram o I e o II. O infiltrado histiolinfoplasmocitário esteve presente em todas os grupos histopatológicos, assim como os linfócitos apareceram em todas as lesões. A poeira nuclear, representando fragmentos

nucleares de neutrófilos e eosinófilos, foi observada na maioria dos casos, e nesta fase não foram observados plasmócitos. Os macrófagos foram as células observadas em maiores quantidades quando comparados com outros tipos celulares, estando presentes tanto na epiderme quanto na derme, no meio do infiltrado inflamatório, em concentrações focais ou difusas (DUARTE, ROCHAEL, 2006).

## 2.5- Ultra-estrutura das Leishmanioses

À microscopia eletrônica o parasito mostra seu limite externo formado por membrana celular unitária, sob a qual se encontram microtúbulos dispostos de formas paralelas e eqüidistantes uns dos outros. O número de microtúbulos varia de acordo com a espécie, sendo de 100 a 120 na espécie *Leishmania donovani* e de 150 a 200 na *Leishmania (L.) mexicana* (REY, 2001) e de acordo com a forma de desenvolvimento do parasito (VANNIER-SANTOS, MARTINY, SOUZA, 2002).

Tanto na forma promastigota quanto na amastigota o flagelo surge da bolsa flagelar, formada pela invaginação da membrana plasmática, sendo que na forma amastigota ele é quase completamente restrito à esta. Em cortes transversais, o flagelo é composto de nove pares de microtúbulos periféricos e um par de microtúbulos centrais (VANNIER-SANTOS, MARTINY, SOUZA, 2002). O parasito contém um sistema de golgi bem desenvolvido e lipossomas (MEHREGAN, MEHREGAN, MEHREGAN, 1999).

O núcleo em todos os estágios de *Leishmania* apresenta-se envolvido por retículo endoplasmático interrompido por poros como em outras células eucariotas. O nucléolo geralmente é centralizado e a cromatina organizada na periferia (VANNIER-SANTOS, MARTINY, SOUZA, 2002).

Como em todos os tripanossomatídeos, a *Leishmania* apresenta vacúolos eletrôn-densos, constituindo organelas ácidas chamadas calcissomos, às vezes confundido com lisossomos, representando compartimentos de armazenamento de íons Cálcio, ricos em pirofosfato, Magnésio, Sódio, e em alguns casos Zinco (VANNIER-SANTOS, MARTINY, SOUZA, 2002).



Outra organela única presente na *Leishmania* e em outros tripanossomatídeos é o glicossomo, uma organela altamente especializada envolvida na geração de ATP glicolítico. Os glicossomos são organelas globulares com o diâmetro variando entre 0.2 a 0.3  $\mu\text{m}$  de diâmetro, envoltas por uma membrana unitária, podendo existir de 10 a 100 glicossomas em cada célula (VANNIER-SANTOS, MARTINY, SOUZA, 2002).

A única mitocôndria existente nos tripanossomatídeos apresenta-se ramificada, podendo se estender por toda a célula, e contém DNA numa região localizada próxima ao corpúsculo basal do flagelo, chamado cinetoplasto, correspondendo a 15% do DNA celular total, organizado em minicírculos e maxicírculos (VANNIER-SANTOS, MARTINY, SOUZA, 2002). O cinetoplasto é visto à microscopia eletrônica como uma estrutura em forma de barra junto ao flagelo e tangente a ele (MEHREGAN, MEHREGAN, MEHREGAN, 1999).

Em infecções cutâneas causadas pela *Leishmania* examinadas ao microscópio eletrônico, observam-se massas confluentes de macrófagos vacuolizados intensamente parasitados, com extensões citoplasmáticas entremeadas, separadas na periferia por linfócitos e plasmócitos. As formas amastigotas podem ser vistas em grande número aderidas à margem de grandes fagolisossomos livres, isoladas em fagolisossomos estreitos ou então livres, sem estar internalizados por uma membrana plasmática (RIDLEY, WELLS, 1986).

A evolução da lesão é marcada pela invasão periférica de massas de macrófagos, pelo desaparecimento de células intensamente vacuolizadas e pela substituição por macrófagos pouco parasitados delimitados por um fagolisossomo. A textura dos vacúolos se modifica à medida que se verifica a morte dos parasitos, apresentando-se com um aspecto de gel eletrólucido nos macrófagos ativados, evoluindo para uma massa floculenta e finalmente um espaço límpido. Com o desenvolvimento da lesão, ocorre o predomínio de macrófagos ativados, poucos contendo resíduos de parasitos e outros, sem vacúolos (RIDLEY, WELLS, 1986).

Em lesões marcadas pela lise de macrófagos parasitados, organizados em pequenos aglomerados ou mesmo isolados, estes apresentam-se de tamanhos médios e não diferenciados, com citoplasma denso contendo números moderados

de amastigotas intactas principalmente, livres no citoplasma ou em vacúolos estreitos ou em fagossomas grandes. Não é observada a fusão com lisossomas presentes. Essa reação resulta em debris onde as amastigotas, intactas ou degradadas, são abundantes (RIDLEY, WELLS, 1986).

Quando esta necrose ocorre em grandes massas de macrófagos, a lesão é marcada por dois tipos de macrófagos: um contendo raros parasitos delimitados por fagolisossomos, e outros não fagocíticos. Todos os macrófagos são grandes e organizados em grupos compactos, contendo citoplasma denso, muitos lisossomas e corpúsculos residuais. Debris também são observados, porém são mais amorfos e fibrinóides. Após a necrose, poucos macrófagos ativados reaparecem, porém sem parasitos (RIDLEY, WELLS, 1986).

## **2.6-Modelos experimentais das leishmanioses**

O modelo murino reproduz muito dos aspectos da LC do Velho e do Novo Mundo, incluindo graus de susceptibilidade de acordo com a linhagem de camundongo, onde a infecção subcutânea destes por *Leishmania (L.) major* representa o modelo mais bem estudado (OLIVEIRA et al, 2004; HANDMAN, 2001). O camundongo BALB/c é usado como protótipo para o estudo dos mecanismos envolvidos na susceptibilidade a *Leishmania (L.) major*, enquanto que sua resistência é estudada nos camundongos C57BL/6, CBA e C3H/He (SOUZA et al, 2000). Em infecções experimentais por *Leishmania (V.) braziliensis*, a maioria das linhagens de camundongos não mostra sinais evidentes de infecção, enquanto outras mostram a formação de edema e nódulo, que evoluem rapidamente para a cura. O Camundongo BALB/c é a linhagem mais susceptível em infecções por esta espécie, apesar de não produzir lesão severa e duradoura. Em termos gerais, não existe um modelo murino ideal de infecção por *Leishmania (V.) braziliensis* (SOUZA et al, 2000; TEVA et al, 2003; OLIVEIRA et al, 2004).

Um dos métodos diagnósticos para isolamento da *Leishmania* é através da inoculação do material suspeito em hamsters, que desde os anos setenta tem sido usado em casos de infecção pela *Leishmania donovani* na China, e a partir de

então, constitui modelo susceptível para isolamento e conservação *in vivo* desses parasitos (ROJAS, SCORSA, 1995). O hamster é susceptível a várias espécies de *Leishmania*, sendo particularmente útil no estudo da leishmaniose visceral, por apresentar a maioria das alterações imunopatológicas características da leishmaniose visceral humana (VIANNA et al, 2002; RIÇA-CAPELA et al, 2003). A cultura de biópsias de hamster gold inoculados com material suspeito, juntamente com a cultura de aspirado de lesões de pacientes mostra-se o método mais sensível de recuperação do parasito (WEIGLE et al, 1987).

O hamster também tem utilidade comprovada no estudo da LC causada por espécies do subgênero *Viannia*, por apresentar susceptibilidade a essas espécies, mostrando uma previsível evolução da doença, levando a um rápido desenvolvimento das lesões, com uma evolução crônica, que permite o monitoramento imunológico e terapêutico por longo período (OLIVEIRA et al, 2004). Não existe até o presente uma espécie que reproduza a enfermidade mucosa provocada por *Leishmania (V.) braziliensis* (CUBA-CUBA, 2000).

A utilização de primatas não humanos como modelo experimental da leishmaniose tem sido baseada nas semelhanças fisiológicas com o ser humano e na susceptibilidade de várias espécies de macacos do Velho Mundo e de símios Neotropicais a diferentes espécies do gênero *Leishmania*, levando a alterações clinicopatológicas que se assemelham àquelas que ocorrem na doença humana, fornecendo dados importantes para o desenvolvimento de vacinas e quimioterápicos (AMARAL et al, 1996; POROZZI et al, 2006).

Cães são também utilizados como modelos experimentais na leishmaniose visceral (TAFURI et al, 1996), sendo a maioria dos estudos realizados com infecção experimental de isolados humanos de *Leishmania (L.) donovani* (BINHAZIM et al, 1993).

## **2.7- Histopatologia das leishmanioses experimentais**

Camundongos BALB/c e C3H infectados experimentalmente com cepa de *Leishmania (V.) braziliensis* exibiram diferentes aspectos histopatológicos quando

inoculados com e sem adição do lisado de glândula salivar de flebotomíneos. Em inoculação sem lisado da glândula, as lesões não se apresentaram severas ou duradouras, em comparação com o grupo adicionado do lisado, que apresentou uma infecção significativamente aumentada, medida pelo tamanho da pata, carga parasitária e tempo de infecção. Na histopatologia o grupo que não recebeu o lisado mostrou inicialmente infiltrados dérmicos nodulares e difusos de neutrófilos, eosinófilos e histiócitos. Com o tempo, as lesões progrediram para pequenos granulomas organizados de macrófagos epitelióides que continham poucos parasitos, com conseqüente resolução da inflamação e fibrose dérmica moderada (DONNELLY, LIMA, TITUS, 1998).

Em estudo experimental em hamster com inoculação de isolados de *Leishmania (V.) braziliensis* de pacientes que apresentaram LC e LMC, as análise histopatológicas da pele mostraram três padrões histopatológicos gerais que tenderam a acontecer de forma progressiva em intervalos de tempo seguindo o início das lesões: o padrão inflamatório misto, o granulomatoso polimórfico e o epitelióide granulomatoso. Nos linfonodos foram vistos à histopatologia raros granulomas, um deles com um corpúsculo de Schaumann no centro. O baço mostrou alterações não específicas como congestão, aumento da mielopoiese e relativa diminuição da polpa branca. Em cinco animais foram observados granulomas epitelióides. A maioria dos fígados apresentou aspecto histológico normal, com exceção de dois animais que mostraram raros granulomas epitelióides no parênquima hepático com alguns eosinófilos e corpúsculos de Schaumann. Apesar das formas amastigotas não terem sido visualizadas à microscopia ótica nos linfonodos, fígados e baços analisados, DNA de *Leishmania* foi detectado nesses órgãos através de provas de hibridização (KAHL et al, 1991).

Numa tentativa de se comprovar a capacidade de disseminação de *Leishmania (V.) braziliensis*, hamsters foram infectados experimentalmente em coxim plantar e no baço com cepa de referência desta espécie. As lesões metastáticas na pele oriundas da inoculação no baço apresentaram como alterações histopatológicas numerosos neutrófilos polimorfonucleares, muitos com

fragmentação, e numerosos macrófagos dispersos altamente parasitados rodeados por plasmócitos e raros eosinófilos (ALMEIDA et al, 1996).

Neste mesmo experimento, a cepa referida quando inoculada na pele levou a lesões metastáticas no linfonodo regional, fígado e baço, mostrando as seguintes alterações ao microscópio ótico: no baço e linfonodo foram observados agregados histiocitários cercados por plasmócitos, um número moderado de linfócitos reativos e poucos eosinófilos. Nos linfonodos, os agregados histiocitários foram encontrados na córtex e na medula, sem o acompanhamento de hiperplasia folicular. Os agregados histiocitários foram menos coesos no linfonodo e no baço do que no fígado, sendo encontrados principalmente na polpa vermelha. As lesões hepáticas foram mais brandas e distribuídas aleatoriamente, com pequenos e compactos agregados de histiócitos cercados por plasmócitos e raros eosinófilos (ALMEIDA et al, 1996).

Em estudo com diferentes isolados de *Leishmania (V.) braziliensis* de pacientes da Argentina, as alterações observadas na pele no estágio inicial da doença foram a presença de infiltrados inflamatórios mistos, com microabcessos e áreas de necrose e num estágio mais avançado da doença granulomas bem definidos, e formação de colágeno foram os achados mais freqüentes. As amastigotas foram facilmente visualizadas e corpúsculos de Schaumann foram detectados (SINAGRA et al, 1997).

Hamsters inoculados com *Leishmania (L.) infantum* mostraram alterações histopatológicas no fígado e baço, cuja evolução foi acompanhada por mais de 32 semanas. Foram observados hipoplasia da polpa branca do baço e presença de infiltrado periportal constituído de células inflamatórias e pequenos granulomas no fígado, que se tornaram mais severos com o desenvolvimento da infecção. Ambos os órgãos desenvolveram deposição amilóide ao final do experimento, principalmente no baço ((RIÇA-CAPELA et al, 2003).

Em estudo realizado com inoculação de cepa de referência de *Leishmania (L.) chagasi* em coxim plantar de Hamster, observou-se a evolução da reação granulomatosa na pele, onde a seqüência de eventos histopatológicos observados foi a seguinte: aos 7 dias após a inoculação, houve uma reação inflamatória branda na região profunda da derme, com presença de macrófagos, plasmócitos e linfócitos,

e parasitos intra e extracelulares. Aos 15 dias após a inoculação, a infecção se disseminou para a camada muscular da derme, contendo muitos parasitos. Com 30 dias de infecção, havia um infiltrado inflamatório mononuclear difuso e a formação inicial de um granuloma, com redução do número de parasitos. Aos 45 dias, a lesão era caracterizada por um granuloma epitelióide bem definido, poucos neutrófilos entre os macrófagos e muito poucos parasitos. Neste momento, as células gigantes multinucleadas continham em seu centro estruturas redondas, lamelares, concêntricas e basofílicas conhecidas como corpúsculos de Schaumann, e estruturas semelhantes também eram vistas como pequenos agregados dentro de macrófagos. Este padrão visto aos 45 dias também foi observado aos 60, 75 e 90 dias após a infecção (LAURENTI et al, 1990).

Neste mesmo estudo, a visceralização foi observada após 45 dias de inoculação, onde as formas amastigotas dos parasitos foram observadas dentro de células do sistema fagocítico mononuclear do fígado e baço (LAURENTI et al, 1990).

Hamsters quando inoculados experimentalmente com isolado canino de *Leishmania (L.) infantum* exibiram alterações histopatológicas limitadas ao fígado e baço. No fígado os achados mais consistentes ao longo da infecção foram caracterizados por reação granulomatosa com acúmulos de números variados de macrófagos parasitados e células gigantes. Com a evolução da infecção, os granulomas se fundiram e continham muitas células gigantes, macrófagos, células linfoplasmocitárias e corpúsculos de Schaumann. No baço a infecção foi marcada pela presença de infiltrados de macrófagos parasitados, que com a evolução da infecção formaram pequenos agregados em torno da polpa vermelha (BINHAZIM et al, 1993).

Em linfonodos de cães infectados naturalmente por cepa viscerotrópica *Leishmania (L.) chagasi*, a histopatologia mostra depleção de estruturas foliculares e de linfócitos na zona cortical, substituídos principalmente por macrófagos. Cães assintomáticos/oligossintomáticos e cães sintomáticos mostram aspectos histopatológicos distintos, onde os primeiros exibem hipertrofia e hiperplasia da região cortical e os outros atrofia da região cortical (GIUNCHETTI et al, 2007).

Medulas ósseas de cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) infantum* mostraram à histopatologia discreto aumento no número de macrófagos, contendo amastigotas (NATAMI et al, 2000).

As análises histopatológicas de pele produzidas experimentalmente pela inoculação de espécies de *Leishmania* dermatrópicas, incluindo *Leishmania (V.) braziliensis* em *Cebus apella* mostraram que as lesões evoluíram de maneira seqüencial, passando pelas seguintes etapas a nível tecidual: 1- infiltrado inespecífico crônico; 2- nódulo macrofágico, contendo numerosos parasitos; 3- necrose das células parasitadas; 4- granuloma epitelióide; 5- absorção da área necrosada, às vezes formando granuloma de corpo estranho; 6- infiltrado inespecífico crônico residual; 7- cicatrização com resolução da lesão. Este estudo mostrou também a importância da utilização do primata *Cebus apella* como modelo experimental para o estudo da LTA devido à semelhança com a evolução da doença no ser humano (SILVEIRA et al, 1990).

As alterações histopatológicas observadas em órgãos de macacos reshus (*Macaca mulatta*) infectados experimentalmente por cepa de *Leishmania (L.) infantum* mostram macrófagos contendo amastigotas no fígado, baço, linfonodo e medula óssea. No fígado, ocorreu inicialmente a formação de infiltrados inflamatórios que evoluíram para a formação de granulomas bem diferenciados com presença de células gigantes multinucleadas. No baço houve aumento dos folículos linfóides em número e tamanho, congestão da polpa vermelha com proliferação de células reticulares e macrófagos (PORROZZI et al, 2006).

## **2.8- Ultraestrutura das leishmanioses experimentais**

Em análise ultraestrutural de pele de hamster infectada experimentalmente por *Leishmania (V.) lainsoni*, uma espécie do subgênero *Viannia*, foram observadas as seguintes alterações ultraestruturais após 45 dias de inoculação: derme com lesão extensa, com grandes áreas de edema e deposição de colágeno; infiltrado inflamatório constituído por macrófagos, monócitos, eosinófilos e mastócitos; alguns fibroblastos foram encontrados associados com a área da lesão; eosinófilos foram

encontrados associados com amastigotas livres no tecido. O local da lesão mostrou desorganização tecidual, edema, necrose tecidual e celular e deposição de colágeno, características que podem ser decorrentes de um processo de cicatrização em andamento (CORRÊA, BRASIL, SOARES, 2007).

As formas amastigotas teciduais mostraram contorno circular, com núcleo central, cinetoplasto em forma de barra e grandes inclusões lipídicas. Amastigotas livres foram observados freqüentemente em áreas teciduais com extensiva necrose sem deposição de colágeno, associado com macrófagos e também foram observadas dentro de macrófagos no local da lesão, mostrando aspecto morfológico anormal, sugerindo atividade microbida dessas células. Cerca de 40 % das *Leishmania* foram encontradas livres na lesão, dentro de vacúolos fagocíticos. As formas encontradas tanto em vacúolos livres quanto em vacúolos dentro de macrófagos estavam sempre aderidas à membrana destes (CORRÊA, BRASIL, SOARES, 2007).

Infecções *in vivo* em camundongos BALB/c e *in vitro* em macrófagos murinos de medula óssea com cepa de *Leishmania (L.) major* e *Leishmania (L.) amazonensis* foram realizadas para avaliação do vacúolo parasitóforo produzidos por essas duas espécies. Neste trabalho, observou-se a existência de pelo menos dois tipos de vacúolos, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção. Espécies do Velho Mundo ocupam vacúolos pequenos, onde encontram-se geralmente individualizadas, com extensiva associação entre a membrana do parasito e a membrana do vacúolo. Já as espécies do Novo Mundo ocupam vacúolos grandes e espaçosos contendo uma ou mais amastigotas aderidas à membrana vacuolar limitada por um único ponto (CASTRO et al, 2006).

## **2.9- Patogenicidade e visceralização da *Leishmania***

A variação na patogenicidade da *Leishmania* está relacionada com sua diversidade genética, sendo um fator importante que influencia nos achados clínicos da leishmaniose. A espécie *Leishmania (v.) braziliensis* constitui uma população de parasitos de grande variabilidade genética, porém essa diversidade é menos



pronunciada entre populações de parasitos obtidos de áreas geográficas próximas. Em trabalho realizado com dois isolados de *Leishmania (v.) braziliensis* de duas localidades geográficas distintas, a análise dos perfis genômicos desses isolados mostrou polimorfismo genético entre eles, além de exibir diferenças nos achados clínicos e em certos parâmetros imunológicos quando inoculados em camundongos BALB/c (OLIVEIRA et al, 2004).

A variabilidade da virulência da *Leishmania* é baseada geneticamente. A doença resulta de uma resposta imune adversa a diferentes categorias de moléculas do parasita. É possível prever a existência de diferentes epítomos na *Leishmania* cuja interação com a resposta imune do hospedeiro leve à doença visceral fatal ou a lesões mucocutâneas desfigurantes. A ausência de tais determinantes patogênicos ou epítomos produz somente uma simples lesão cutânea que tende a cura. O tropismo tecidual da *Leishmania* é um notável achado associado com a virulência (CHANG et al, 1999).

A disseminação das espécies dermatrópicas quando ocorrem, tendem a ser de curso lento, para locais próximos à lesão inicial, formando lesões satélites ou para linfonodos regionais. A espécie *Leishmania (V.) braziliensis* é capaz de migrar até a mucosa orofaríngea e permanecer latente por muitos anos antes de reativar e causar a forma mucocutânea (HEPBURN, 2003), porém esta espécie não se apresenta sempre com a mesma capacidade invasiva ou a mesma virulência. Fatores de ordem ecológica podem influir nesse sentido. Estirpes isoladas de diferentes casos mostram patogenicidade variável para os animais de laboratório (REY, 2001)

Espécies viscerotrópicas como *Leishmania (L.) donovani*, migram através do sistema mononuclear fagocitário levando à leishmaniose visceral, enquanto que as espécies dermatrópicas geralmente permanecem próximas ao local de inoculação, causando a forma cutânea da doença (HEPBURN, 2003). Cepas que são normalmente dermatrópicas podem migrar para os linfonodos e até visceralizar (HANDMAN, 2001). Existem relatos de *Leishmania (L.) tropica* causando a forma visceral e na LC pós calazar, o parasito viscerotrópico torna-se dermatrópico em consequência do tratamento (Hepburn, 2003).

Algumas cepas dermatrópicas podem visceralizar provavelmente devido a fatores associados ao hospedeiro (HANDMAN, 2001). *Leishmania (L.) tropica*, considerada causadora de lesões cutâneas exclusivamente, já foi implicada como agente causal de vários casos de leishmaniose visceral em soldados na Arábia Saudita, sendo que as apresentações clínicas foram diferentes dos casos produzidos por *Leishmania (L.) donovani*, como febre alta, indisposição, diarreia intermitente e dor abdominal (CHOI, LERNER, 2001).

A manifestação clínica da leishmaniose depende não só do potencial genotípico de diferentes espécies de *Leishmania*, mas também do status imunológico do paciente (DEDET et al, 1999). Fatores associados com a imunossupressão também podem influenciar no tropismo tecidual das diferentes espécies do parasito. Espécies dermatrópicas, como *Leishmania (V.) braziliensis* foram implicadas no acometimento da leishmaniose visceral tanto em pacientes portadores do vírus HIV (SILVA et al, 2002) como em pacientes submetidos à transplante de órgãos, ambos apresentando imunossupressão, seja pelo vírus ou pela administração de drogas imunossupressoras, respectivamente (GONTIJO et al, 2002).

Em estudo realizado com dois isolados de *Leishmania (V.) braziliensis* de pacientes de duas localidades geográficas distintas, estes apresentaram graus variados de patogenicidade. Para demonstração dessa diferença de patogenicidade, camundongos BALB/c foram infectados experimentalmente com formas promastigotas desses isolados. Na análise histopatológica, observaram infiltrado inflamatório constituído principalmente por macrófagos e neutrófilos já nos três primeiros dias de infecção e persistindo até os quinze dias de infecção, sendo que um isolado apresentou uma resposta três vezes maior que o outro. Essa diferença na resposta inflamatória estava relacionada principalmente com um exsudato de leucócitos mais intenso em um isolado que no outro, o primeiro atraindo mais neutrófilo e macrófago que o segundo, mostrando diferentes respostas inflamatórias entre dois isolados de uma mesma espécie (TEIXEIRA et al, 2005).

Em estudo com isolados de *Leishmania (V.) braziliensis* de pacientes da Argentina, observou-se diferentes achados entre dois isolados quando inoculados

em hamsters, onde um apresentou-se com alta infectividade, caracterizado por um período de prepatência menor, e lesões maiores, mais severas e persistentes no local de inoculação. O outro isolado mostrou-se menos infectivo, porém apresentou metástase cutânea e disseminação sistêmica, sugerindo dissociação entre infectividade e patogenicidade (SINAGRA et al, 1997).

Camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados experimentalmente em coxim plantar com isolado de *Leishmania (L.) amazonensis*, espécie de *Leishmania* dermatrópica e uma das responsáveis pela LTA, apresentou lesões metastáticas em órgãos como fígado, baço, medula óssea e rim, lesões estas semelhantes às produzidas pela cepa viscerotrópica *Leishmania (L.) infantum* (ABREU-SILVA et al, 2004).

Infecções experimentais em hamster golden com inoculação de isolados de *Leishmania (V.) braziliensis* de pacientes que apresentaram LC e LMC, observou-se a visceralização do parasito em linfonodos, fígado e baço, confirmado por detecção de DNA da *Leishmania* em provas de hibridização (KAHL et al, 1991).

Em outro experimento utilizando cepa de referência de *Leishmania (V.) braziliensis* inoculadas em coxim plantar, formas amastigotas do parasito foram observadas através de análise histopatológica em linfonodo regional, fígado e baço, confirmando visceralização da referida espécie (ALMEIDA et al, 1996).

### **III- Material e Método**

#### **3.1- Animais experimentais**

Para este estudo foram utilizados 48 Hamsters Golden (*Mesocricetus auratus*) com idade entre 8 e 12 semanas, de ambos os sexos mantidos em gaiolas com três animais cada com ração e água *ad libidum*, no Laboratório de Experimentação Animal (LEA) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

#### **3.2- Parasitos**

No presente estudo foi utilizada a cepa de referência de *Leishmania* (V.) *braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), gentilmente cedida pelo Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo e dois isolados do complexo *braziliensis* (Isolado I e Isolado II), obtidos a partir de biópsias de lesões cutâneas de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU). A cepa de referência e os isolados I e II foram mantidos por passagens sucessivas em Hamsters e então, cultivados em meio BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid LTDA, Basingstoke, Hampshire, UK), suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (Cultilab, Campinas, BR), 100µg/ml de gentamicina, 1mM de L-glutamina (DIFCO BRL-Life Technologies, New York, USA), a 26°C, até atingirem a fase estacionária. Os isolados I e II foram caracterizados em nível de Complexo *Leishmania braziliensis* pela técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction) Multiplex no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia (Biomol UFU) (dados não mostrados).

#### **3.3 - Infecção experimental**

Formas promastigotas de cada isolado e da cepa de referência de *Leishmania* (V.) *braziliensis* foram coletadas da cultura, após atingirem a fase

estacionária de desenvolvimento, centrifugadas por 10 minutos a 2000 rpm e ressuspensas em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) estéril. Após duas lavagens consecutivas por centrifugação, a concentração dos parasitos foi ajustada para conter  $10^6$  formas promastigotas em 50  $\mu$ L de PBS estéril. Os hamsters foram divididos em quatro grupos constituídos de doze animais cada e infectados no coxim plantar direito com 50  $\mu$ L da suspensão de *Leishmania*. O grupo 1 foi infectado com a cepa M2903, o grupo 2 infectado com o isolado I, o grupo 3 infectado com o isolado II e os animais do grupo 4 receberam apenas PBS para controle. O desenvolvimento da lesão foi monitorado semanalmente por observações visuais e nos dias 15°, 30°, 60° e 120° após a infecção os animais foram eutanasiados com sobredose de Pentobarbital Sódico, na dose de 100mg/kg, conforme os princípios éticos em pesquisa animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Nos respectivos períodos anteriormente mencionados foram coletados fragmentos de fígado, baço, linfonodo poplíteo regional, coxim plantar da pata infectada e medula óssea, para análises histopatológicas e ultra-estruturais.

### **3.4 - Histopatologia**

Para as análises histopatológicas fragmentos do coxim plantar, linfonodo regional, fígado, baço e medula óssea (fêmur do membro inoculado) dos animais foram removidos e fixados em solução de formalina tamponada a 10%. Após fixação por 24 horas, os fragmentos dos órgãos foram desidratados em álcoois em concentrações crescentes de 70, 85, 95 e 100%. Após a desidratação, os tecidos foram diafanizados em três banhos de xilol, incluídos em parafina e seccionados em micrótomo manual. Três cortes de 5  $\mu$ m de espessura de cada órgão (com intervalos de 150  $\mu$ m entre eles) foram dispostos em lâminas de vidro, corados em hematoxilina e eosina e analisados por microscopia de luz. (TOLOSA et al, 2003).

### **3.5 – Ultra-estrutura**

Para a avaliação ultra-estrutural, fragmentos de 1 a 2 mm<sup>3</sup> dos órgãos dos animais infectados foram coletados e em seguida fixado em glutaraldeído a 3% em

tampão fosfato pH 7,2, 0,1M. Após fixação por 24 a 48 horas, os fragmentos foram lavados em tampão fosfato (0,1M, pH 7,2) e então pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% (30 minutos) e em tetróxido de ósmio a 1% mais ferrocianeto de potássio a 1,25% (mais 30 minutos). Em seguida, os fragmentos de órgãos foram desidratados em concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%) e incluídos em resina Epon 812 (Fluka, Suíça) para posterior corte em ultramicrotomo com obtenção de cortes ultrafinos de 60 nm que foram depositados em tela de Cobre de 250 “mesh”. Estes foram contrastados com Acetato de Uranila (Merk, Darmstadt, Alemanha) e Citrato de Chumbo (Merk, Darmstadt, Alemanha) (BOZZOLA, RUSSELL, 1998) e analisados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 (Zeiss, Alemanha).

## **IV - Resultados**

### **4.1 - Análise macroscópica das lesões**

As lesões de pele observadas evoluíram de maneiras distintas entre cada cepa quanto ao tempo de evolução, evidenciada pelo aumento da região de inoculação e pela formação de úlcera.

#### **4.1.1 – Cepa de referência M2903**

As lesões de pele causadas pela infecção com a cepa de referência M2903, bem como o aumento dos linfonodos só foram evidentes macroscopicamente aos 60 dias após a inoculação, representado por discreto aumento da pata e por uma lesão de aspecto pápulo eritematoso. O linfonodo apresentou-se aumentado neste período. Aos 120 dias de evolução, as lesões se apresentaram de maneiras distintas entre os três animais: um animal apresentou pouco aumento em relação ao tempo anterior (Fig 1A), o segundo apresentou tendência à regressão do tamanho da lesão em relação ao tempo anterior, com o aparecimento de lesão ulcerada na posição contralateral à inoculação (Fig 1B) e o terceiro apresentou aumento bem acentuado da pata, com lesão de aspecto nodular (Fig 1C). O tamanho dos linfonodos também variou entre os três animais, acompanhando o tamanho da pata. O fígado e o baço não apresentaram alterações macroscópicas evidentes em nenhum dos períodos pós-inoculação.

#### **4.1.2 – Isolado I**

Nos animais infectados com o isolado I, no 15º dia após a infecção as patas mostraram-se aumentadas, com lesões pápulo-eritematosas; aos 30 dias após a inoculação, as lesões evoluíram para nódulos eritematosos, com aumento das patas (Fig 1D); aos 60 dias após a inoculação, foram observadas início da formação de ulcerações (Fig 1E); aos 120 dias após a inoculação, dois dos três animais apresentaram extensa área de ulceração (Fig 1F) e um dos três animais apresentou, aos 108 dias após a inoculação, necrose extensa da pata com

exposição da estrutura óssea, fato este que levou à eutanásia deste antes do tempo previsto. As alterações macroscópicas observadas nos linfonodos acompanharam a evolução do tamanho das lesões das patas, já se encontrando aumentados aos 15 dias após a inoculação com aumentos progressivos de acordo com os tempos de 30, 60 e 120 dias. No fígado não foram observadas alterações macroscópicas evidentes em nenhum dos tempos de análise; no baço somente aos 120 dias após a inoculação observou-se discreto aumento do órgão em um dos animais.

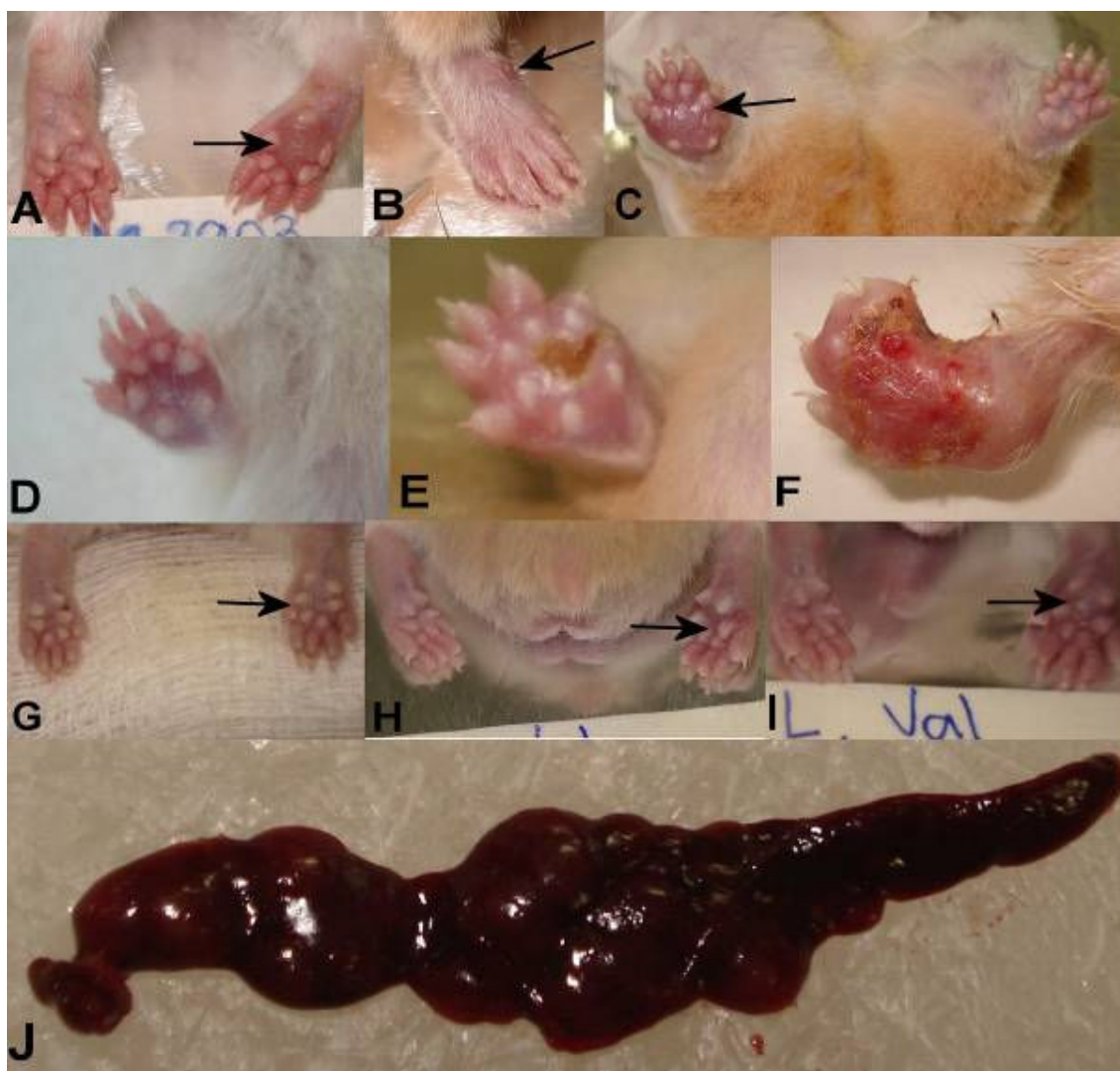
#### **4.1.3 – Isolado II**

Os animais infectados com o isolado II não mostraram alterações evidentes na pele aos 15 dias após a inoculação e o linfonodo adjacente mostrou-se de tamanho anatômico normal. Aos 30 dias após a inoculação, as patas apresentavam-se ligeiramente aumentadas de tamanho e eritematosas (Fig 1G). Os linfonodos também se apresentaram discretamente aumentados de volume. Aos 60 dias de evolução, as lesões de pele apresentavam-se maiores que as observadas aos 30 dias com aspecto pápulo eritematoso (Fig 1H) bem como os linfonodos apresentavam-se maiores que no tempo anterior. Aos 120 dias após a inoculação, as lesões de pele apresentavam-se com aspecto nodular com aumento progressivo em relação ao último tempo de análise (Fig 1I), assim como os linfonodos. Em dois dos três animais, os baços apresentavam-se com vários nódulos que ao corte exibiam aspecto caseoso (Fig Fig 1J).

#### **4.1.4 – PBS (Controle)**

Não foram encontradas alterações macroscópicas no coxim plantar dos animais inoculados com PBS.





**Figura 1: Fotografia de lesões macroscópicas de hamsters infectados com isolados I e II e cepa de referência M2903. (A, B, C) → coxim plantar em infecção pela cepa de referência M2903 aos 120 dias após inoculação (três animais diferentes). (D) coxim plantar isolado I com 30 dias de infecção. (E) coxim plantar isolado I 60 dias de infecção. (F) coxim plantar isolado I 120 dias de infecção. (G) → coxim plantar isolado II 30 dias após infecção. (H) coxim plantar isolado II 60 dias de infecção. (I) isolado II 120 dias de infecção. (J) nódulos macroscópicos (baço isolado II 120 dias de infecção).**

## 4.2 – Análise histopatológica

### 4.2.1 – Cepa de referência M2903

No 15º dia após a infecção, foi observado leve aumento na quantidade de macrófagos na região do coxim plantar dos animais. Alguns destes macrófagos na região reticular da derme continham parasitos (Fig 2A). No linfonodo adjacente, alguns poucos macrófagos contendo *Leishmania* foram observados na região cortical. Não foram observadas alterações histopatológicas no fígado, baço e medula óssea neste período pós-inoculação.

No 30º dia após infecção, observou-se na derme do coxim plantar presença de infiltrado inflamatório focal, constituído principalmente por numerosos macrófagos, contendo poucas quantidades de parasitos em seu interior, além de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos em quantidades moderadas e localizados principalmente mais periféricamente à lesão (Fig 2B). No linfonodo foi observado aumento no número de macrófagos parasitados em comparação ao 15º dia após infecção, vistos na região cortical (Fig 2C). No fígado, foram observados raros infiltrados mononucleares, principalmente nos espaços porta. O baço mostrou macrófagos vacuolizados na região subcapsular. Já a medula óssea não apresentou alteração histopatológica.

No 60º dia após infecção com a cepa de referência, a pele do coxim plantar apresentou reação granulomatosa atingindo grande extensão da derme, contendo neutrófilos, linfócitos e eosinófilos em pequenas quantidades, e maior número de macrófagos parasitados (com poucas *Leishmania* por macrófago), que atingiram inclusive a derme papilar (Fig 2D e 2E). Os linfonodos apresentaram alterações semelhantes àsquelas observadas ao 30º dia. No fígado foi observado um discreto aumento no infiltrado inflamatório, constituído predominantemente por células mononucleares, em relação ao tempo anterior. O baço mostrou presença de macrófagos em maior quantidade que o grupo B principalmente na região periférica do órgão, com inclusões citoplasmáticas sugestivas de *Leishmania*. A medula óssea não mostrou alteração histopatológica digna de nota.

Após 120 dias de infecção com a cepa de referência, em um dos animais do grupo, a derme do coxim plantar apresentou-se em toda sua extensão com muitos

macrófagos contendo grandes vacúolos e grandes quantidades de parasitos (Fig 2F), raros plasmócitos, grandes quantidades de linfócitos entremeados por eosinófilos e poucos neutrófilos. Células gigantes multinucleadas foram observadas em grandes quantidades bem como corpúsculos de Schaumann, localizados dentro de células gigantes ou no interstício (Fig 3A); áreas de necrose também foram observadas, e tendência à fibroplasia, representada pela grande quantidade de fibroblastos e fibras colágenas delgadas e desorganizadas. Em outro animal do mesmo grupo observaram-se maiores quantidades de macrófagos que os animais anteriores, áreas de necroses com calcificações (Fig 3B), focos de fibrose intensa, muitos piócitos próximos à epiderme, e também entre os macrófagos. Em todos os animais ficou caracterizada a reação granulomatosa. Nos linfonodos, as alterações vistas foram grandes quantidades de macrófagos com citoplasma acidófilo abundante e justapostos (clareiras de Montenegro) (Fig 3C). Muitos macrófagos contendo *Leishmania*, isolados ou formando grupamentos, foram vistos espalhados por todo o órgão (Fig 3D). Também foram observadas pequenas e raras áreas de necrose. No fígado foi observada a presença de infiltrados inflamatórios focais contendo macrófagos, eosinófilos e linfócitos, sendo que alguns macrófagos exibiram inclusões citoplasmáticas sugestivas de *Leishmania* (Fig 3E). O baço mostrou macrófagos principalmente na região periférica do órgão, formando pequenos arranjos epitelióides ao redor dos nódulos linfáticos. Foram observadas inclusões sugestivas de *Leishmania* em macrófagos vacuolizados localizados na região subcapsular (Fig 3F). Na medula óssea, não foram observadas alterações histopatológicas dignas de nota.

#### 4.2.2 – Isolado I

A avaliação da infecção com o isolado I no 15º dia, no coxim plantar apresentou intenso infiltrado inflamatório localizado na derme reticular constituído principalmente por macrófagos, com poucos neutrófilos, eosinófilos e linfócitos (Fig 4A). Formas amastigotas de *Leishmania* foram observadas no interior de grandes vacúolos de macrófagos, que mostraram-se intensamente parasitados, bem como no meio extracelular (Fig 4B). No linfonodo adjacente foi observada presença

moderada de macrófagos contendo *Leishmania*, principalmente na região cortical (Fig 4C). No fígado foram encontrados raros infiltrados celulares focais, geralmente nos espaços porta, constituídos principalmente por mononucleares, porém também por polimorfonucleares (PMN). No baço a única alteração observada foi a presença de macrófagos com grandes vacúolos principalmente na região subcapsular do órgão. A medula óssea apresentou-se aspecto histológico normal.

No 30º dia de infecção, a pele do coxim plantar apresentou uma reação granulomatosa dispersa acometendo a região papilar e regiões mais profundas da derme, atingindo inclusive músculo cutâneo. Observou-se maior número de macrófagos do que observado no 15º dia, sendo que estes apresentavam maior quantidade de grandes vacúolos contendo *Leishmania* (Fig 4D). Houve aumento do número de neutrófilos e diminuição do número de eosinófilos em relação aos animais no 15º dia de infecção. No linfonodo, notou-se aumento do número de macrófagos com grandes vacúolos contendo várias amastigotas em seu interior (Fig 4E), agora atingindo todo o órgão e formando clareiras de Montenegro (Fig 4F). O fígado mostrou a presença de poucos infiltrados mononucleares focais, onde eventualmente alguns macrófagos apresentavam vacúolos evidentes. No baço foi encontrada maior quantidade de macrófagos vacuolizados, quando comparados com a infecção no 15º dia. Do mesmo modo que no tempo de análise anterior, a medula óssea mostrou aspecto histológico normal.

Com 60 dias após infecção pelo o isolado I, a pele do coxim plantar apresentou ainda grandes quantidades de macrófagos contendo grandes vacúolos com *Leishmania* (Fig 5A). Foram observadas ainda áreas de necrose com pontos de calcificação (Fig 5B). Observou-se também a presença de amastigotas no espaço intersticial (Fig 5C). O linfonodo mostrou menores quantidades de macrófagos parasitados que observado nos animais no 30º dia da infecção, estando estes presentes em todo o órgão, concentrados principalmente no seio subcapsular e região periférica da cortical (Fig 5D). Observou-se grandes quantidades de estruturas hialinas circulares (corpúsculo de Schaumann) dentro de clareiras de Montenegro ou de células gigantes multinucleadas (Fig 5E). O fígado apresentou maior quantidade de infiltrados que observado nos animais do 30º dia da infecção,

constituído principalmente por células mononucleares, com macrófagos contendo grandes vacúolos, onde foram observadas poucas *Leishmania* em seu interior. Polimorfonucleares foram vistos eventualmente, prevalecendo os eosinófilos, vistos inclusive dentro de alguns vacúolos de macrófagos (Fig 5F). Observou-se a presença de célula gigante multinucleada, e o início da formação dos corpúsculos de Schaumann (Fig 6A). O Baço apresentou presença de clareiras de Montenegro onde os macrófagos continham *Leishmania* em maior número que o isolado II e a cepa de referência (Fig 6B). Não foram observadas alterações histopatológicas na medula óssea.

Aos 120 dias após a infecção, a pele do coxim plantar mostrou diminuição dos macrófagos contendo *Leishmania*, tendendo à hiperplasia fibrocítica. Polimorfonucleares foram vistos em grandes quantidades (Fig 6C), assim como os corpúsculos de Schaumann. Além disso, observaram-se regiões de necrose bem como a presença de células gigantes multinucleadas (no entorno da necrose) e corpúsculos de Schaumann (Fig 6D). Nos linfonodos houve a diminuição da quantidade de macrófagos, bem como a quantidade de *Leishmania* em seu interior, permanecendo as clareiras de Montenegro. Observou-se também presença de muitas células gigantes multinucleadas, contendo corpúsculos de Schaumann em seu interior (Fig 6ED). O fígado apresentou grandes quantidades de infiltrados constituídos predominantemente por macrófagos com grandes vacúolos contendo *Leishmania* (Fig 6F). Em um dos animais após 120 dias de infecção foi observada a presença de um corpúsculo de Schaumann (Fig 7A) e em outro animal observou-se a presença de áreas de necrose. O baço mostrou rarefação da polpa branca, e presença das clareiras de Montenegro (Fig 7B), bem como alguns poucos macrófagos contendo *Leishmania*. A medula óssea não apresentou alteração histopatológica digna de nota, entretanto em um dos animais observou-se a presença de uma célula gigante multinucleada contendo corpúsculo de Schaumann (Fig 7C).

#### **4.2.3 – Isolado II**

Com 15 dias de infecção a pele do coxim plantar dos animais infectados com o isolado II apresentou leve aumento no número de macrófagos, sendo que alguns

possuíam vacúolos contendo formas amastigotas de *Leishmania* (Fig 7D). O linfonodo não apresentou alteração estrutural, mostrando a presença de poucos macrófagos contendo *Leishmania* na região cortical do órgão. No fígado foram observados raros infiltrados focais constituídos basicamente por células mononucleares. O baço apresentou macrófagos com grandes vacúolos principalmente na região cortical do órgão. A medula óssea não apresentou alteração histopatológica digna de nota.

No 30º dia após a infecção, a pele do coxim plantar apresentou na região profunda da derme infiltrado inflamatório focal constituído principalmente por macrófagos sem grandes vacúolos e contendo pouca quantidade de *Leishmania* em seu interior (Fig 7E). Também foram observados PMN. O linfonodo manteve a mesma conformação da observada no 15º dia, porém mostrando maior quantidade de macrófagos parasitados (Fig 7F). No fígado observou-se a presença de infiltrados focais, com predomínio de células mononucleares, espalhados por todo o órgão. O baço mostrou presença de macrófagos contendo grandes vacúolos principalmente na região periférica do órgão. A medula óssea não apresentou alteração histopatológica.

Aos 60 dias após infecção a pele do coxim plantar apresentou reação granulomatosa dispersa, maior que observada na infecção com a cepa M2903 no mesmo período de observação, atingindo inclusive derme papilar, constituída basicamente por macrófagos contendo poucas *Leishmania* dentro de pequenos vacúolos (Fig 8A). Também foi observada presença de célula gigante multinucleada, do corpúsculo de Schaumann (Fig 8B) e sinais de necrose, principalmente nas regiões onde eram observados os corpúsculos. Nos linfonodos as principais alterações observadas foram a presença de grande quantidade de Clareiras de Montenegro, com um maior número de macrófagos parasitados que a cepa M2903, distribuídos por todo o órgão (Fig 8C). Também, foi observada pequena quantidade de células gigantes multinucleadas, nas quais em seu interior freqüentemente eram notados corpúsculos de Schaumann. O fígado apresentou infiltrados celulares focais com predomínio de células mononucleares com macrófagos com grandes vacúolos (Fig 8D) e também polimorfonucleares,

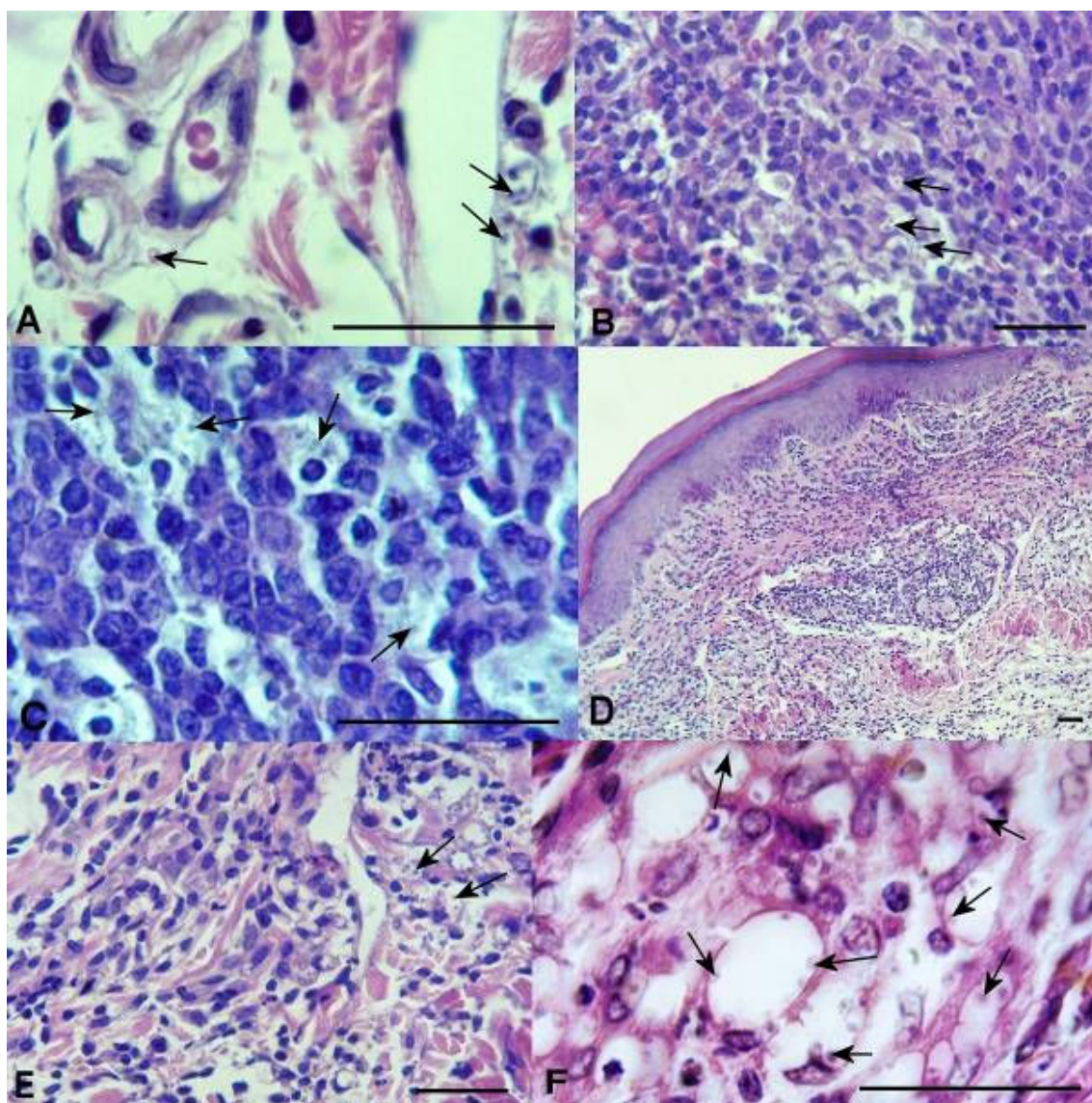
principalmente eosinófilos, distribuídos por todo o órgão. A quantidade de infiltrado foi maior que a observada na cepa M2903, assim como a presença de célula gigante multinucleada. O baço mostrou a presença de macrófagos com grandes vacúolos (em menor quantidade que a cepa M2903) e raros macrófagos contendo *Leishmania* (Fig 8E). Na medula óssea não foi observada qualquer alteração histopatológica digna de nota.

Aos 120 dias após infecção com o isolado II, a pele do coxim plantar mostrou extensa região de granuloma (Fig 8F), principalmente na derme profunda, atingindo nervos e músculo, constituído por poucos polimorfonucleares e predomínio de macrófagos formando clareiras de Montenegro, sendo que estes apresentaram vacúolos de tamanhos variados, com poucas ou nenhuma *Leishmania* (Fig 9A). Presença de poucas células gigantes multinucleadas e de poucos corpúsculos de Schaumann. Nos linfonodos, as alterações observadas foram a presença de grande quantidade de corpúsculos de Schaumann (encontrados principalmente nas clareiras de Montenegro) e células gigantes multinucleadas e diminuição na quantidade de macrófagos com *Leishmania* (Fig 9B). O fígado apresentou quantidade razoável de infiltrados mononucleares, onde predominavam macrófagos com vacúolos contendo *Leishmania* (Fig 9C). Um dos animais apresentou raras células gigantes e outro animal apresentou áreas de necrose. No baço observou-se rarefação da polpa branca (Fig 9D) e presença de clareiras de Montenegro (Fig 9E), com quantidades relativamente grandes de macrófagos contendo *Leishmania* (Fig 9F). A medula óssea apresentou estrutura histológica normal.

#### **4.2.4 – PBS (Controle)**

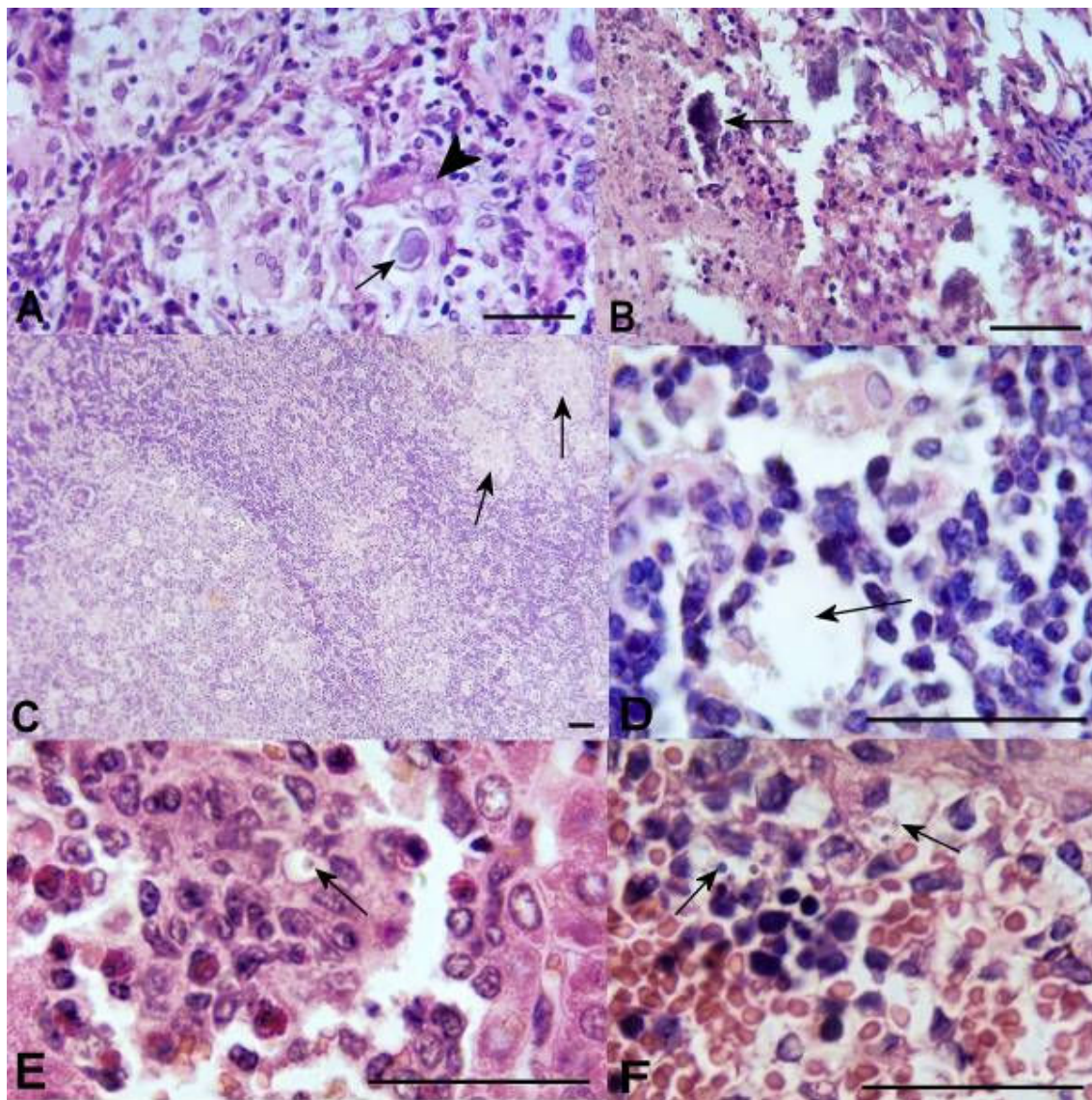
Os animais do grupo controle inoculados com PBS estéril e sacrificados no 15º, 30º, 60º e 120º dia não apresentaram alterações histopatológicas nos órgãos em nenhum dos tempos analisados.





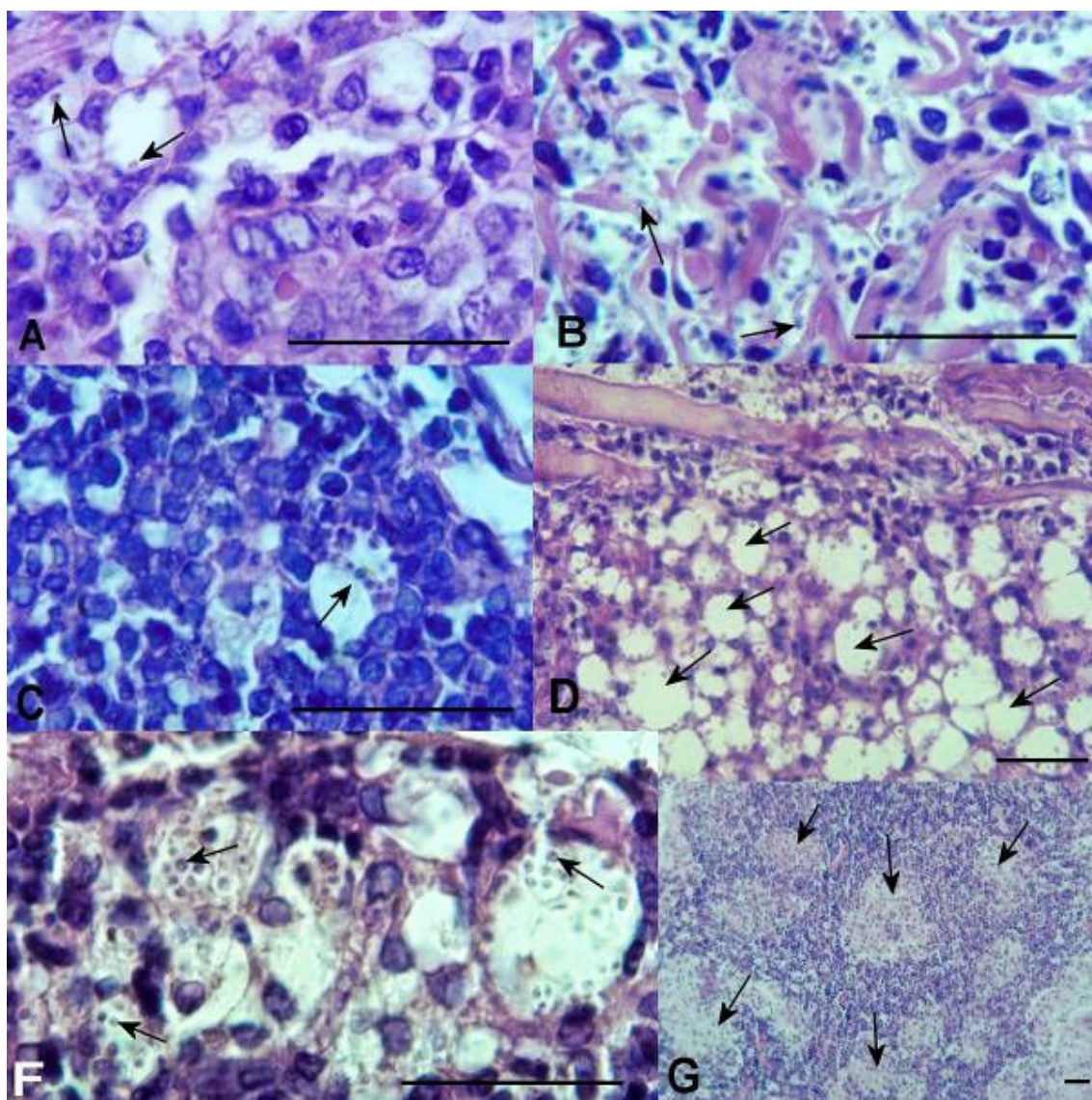
**Figura 2: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com HE de órgãos de hamsters infectados com a Cepa de Referência. (A)** seta: amastigotas em vacúolo de macrófago na derme (cepa M2903 aos 15 dias de infecção). **(B)** seta: macrófagos contendo poucas amastigotas (derme, cepa M2903 aos 30 dias de infecção). **(C)** seta: macrófagos com *Leishmania* (linfonodo, cepa M2903 aos 30 dias de infecção). **(D)** infiltrado celular inflamatório atingindo toda a derme (cepa M2903. pele 60 dias após inoculação). **(E)** seta: amastigotas em vacúolos de macrófagos (pele, cepa M2903 aos 60 dias de infecção). **(F)** seta: amastigota dentro de grandes vacúolos de macrófagos (pele, cepa M2903 aos 120 dias de infecção)(Barra = 100 μm).



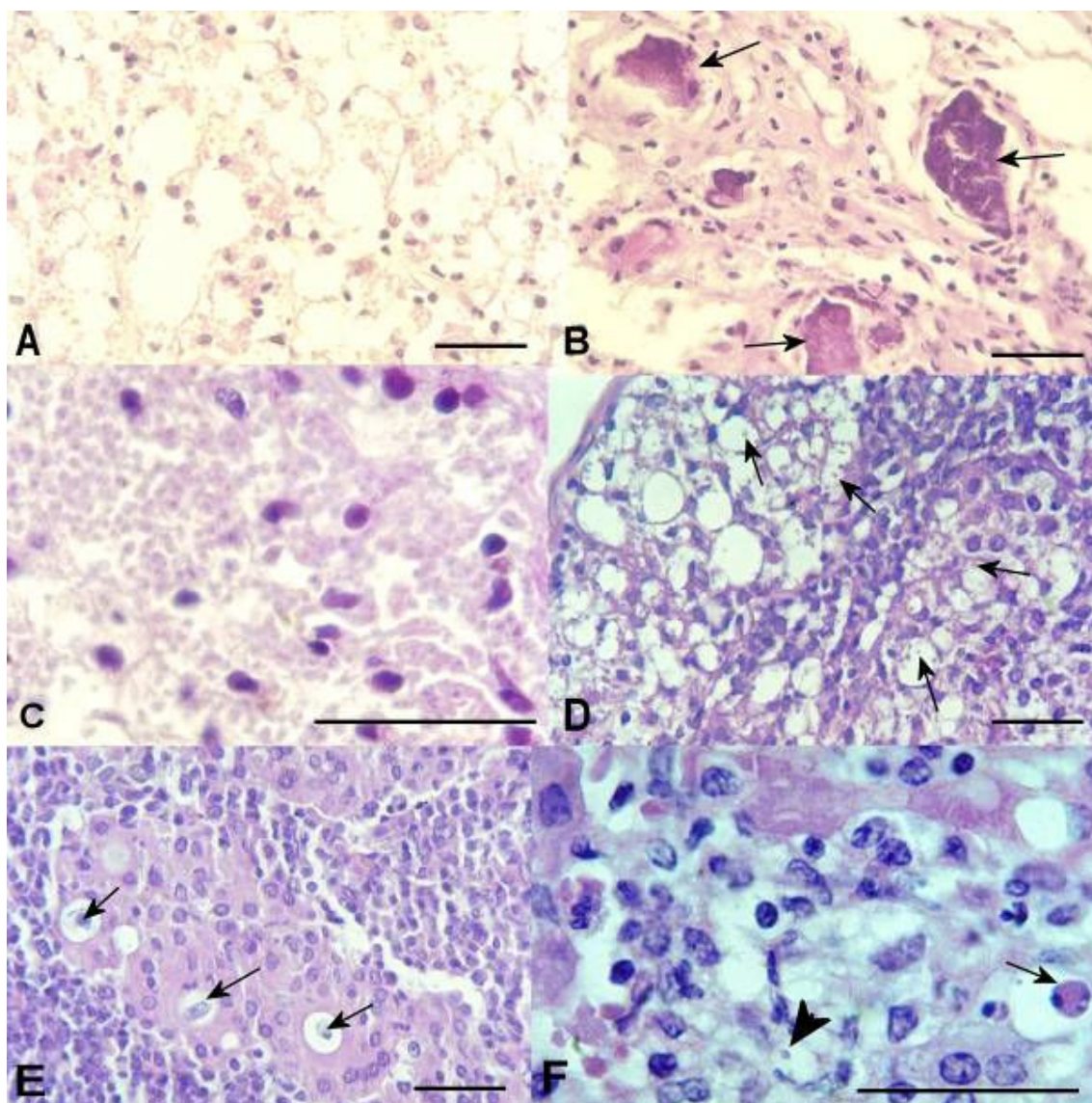


**Figura 3: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com HE de órgãos de hamsters infectados com a Cepa de Referência. (A)** seta: corpúsculo de Schaumann; cabeça de seta: célula gigante multinucleada (pele, cepa M2903 aos 120 dias de infecção). **(B)** seta: área de necrose com calcificação (pele, cepa M2903 aos 120 dias de infecção). **(C)** seta: clareira de Montenegro (linfonodo, cepa M2903 aos 120 dias de infecção). **(D)** seta: vacúolos de macrófagos contendo *Leishmania* (linfonodo, cepa M 2903 aos 120 dias de infecção). **(E)** seta: inclusão sugestiva de *Leishmania* em macrófago (fígado, cepa M2903 aos 120 dias de infecção). **(F)** seta: macrófagos subcapsulares contendo inclusão sugestiva de *Leishmania* (baço, cepa M2903 aos 120 dias após inoculação) (Barra = 100  $\mu$ m).



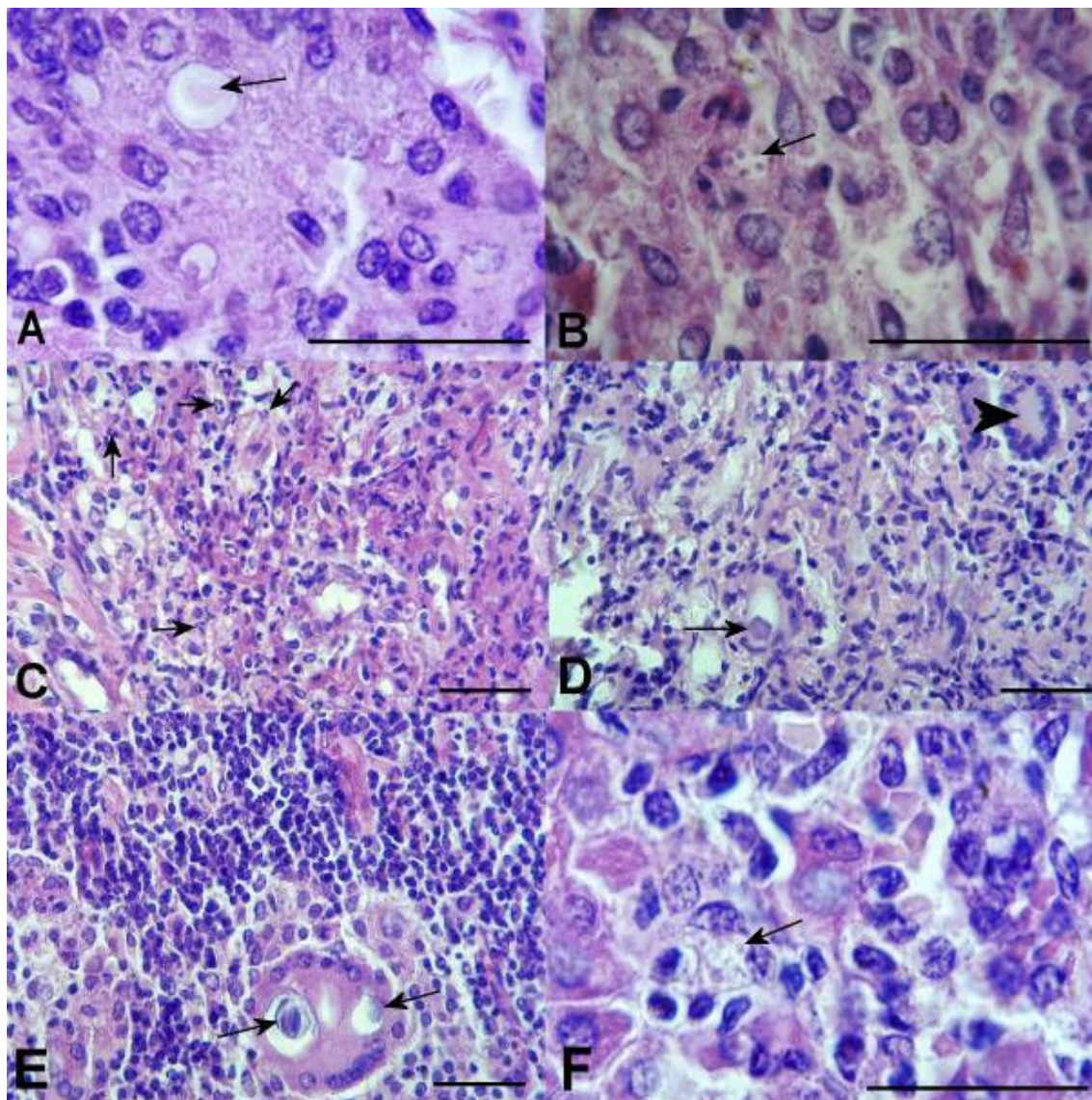


**Figura 4: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com HE de órgãos de hamsters infectados com o isolado I. (A)** acúmulo de macrófagos com grandes vacúolos, seta: amastigota em vacúolo (pele, isolado I aos 15 dias de infecção). **(B)** seta: amastigotas no espaço intersticial (pele, isolado I aos 15 dias de infecção). **(C)** seta: vacúolo de macrófago contendo amastigotas (linfonodo, isolado I aos 15 dias de infecção). **(D)** grande quantidade de macrófagos com grandes vacúolos (seta)(pele, isolado I aos 30 dias de infecção). **(E)** grande quantidade de *Leishmania* (seta) em grandes vacúolos de macrófagos (linfonodo, isolado I aos 30 dias de infecção). **(F)** seta: clareira de Montenegro (linfonodo, isolado I aos 30 dias de infecção) (Barra = 100 μm).



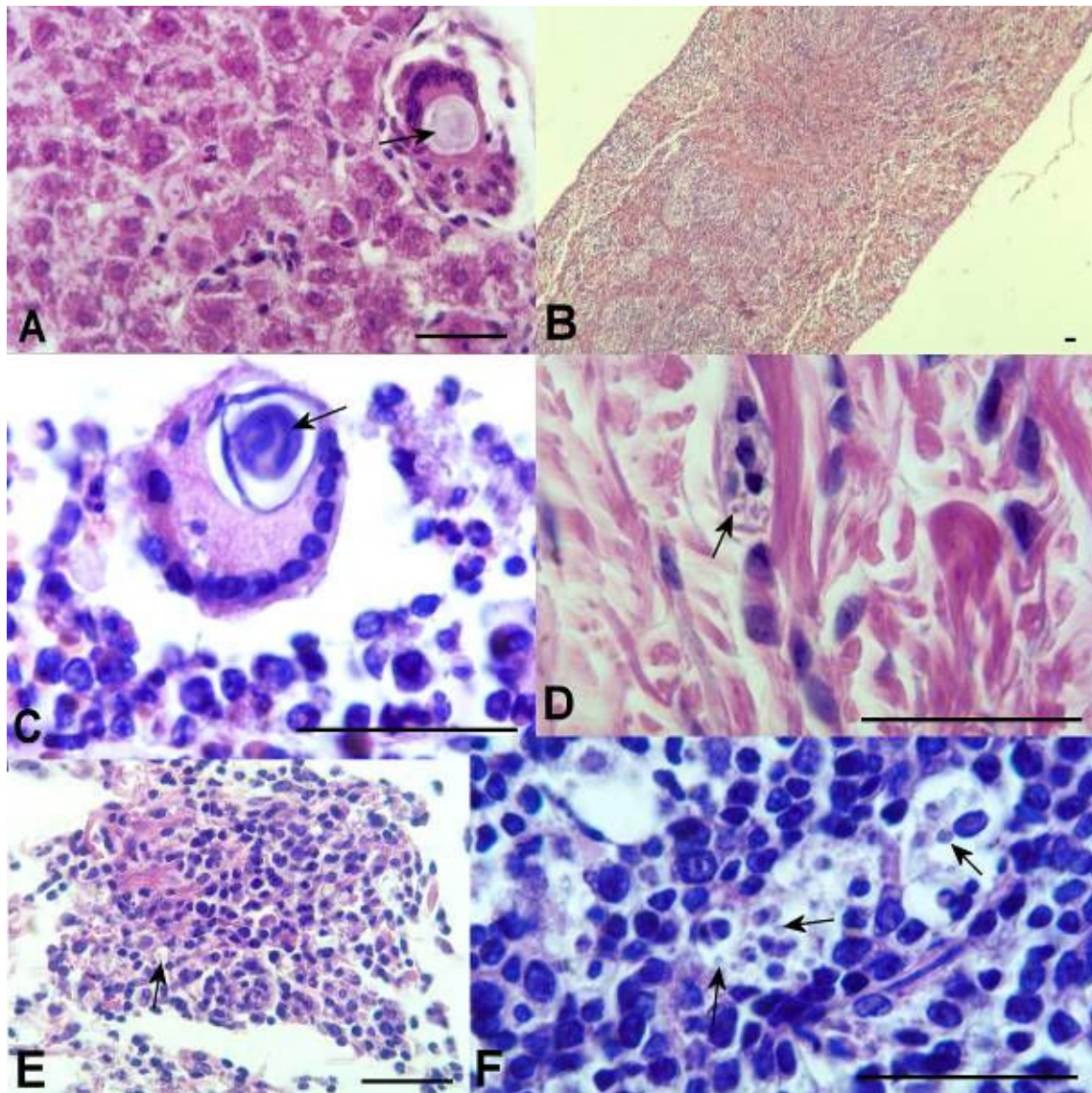
**Figura 5: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com HE de órgãos de hamsters infectados com o isolado I. (A)** grandes vacúolos de macrófagos contendo várias amastigotas (pele, isolado I aos 60 dias de infecção). **(B)** seta: área de necrose com calcificação (pele, isolado I aos 60 dias de infecção). **(C)** grande quantidade de *Leishmania* no meio extracelular (pele, isolado I aos 60 dias de infecção). **(D)** seta: grandes vacúolos contendo *Leishmania* na região periférica do órgão (linfonodo, isolado I aos 60 dias de infecção). **(E)** seta: corpúsculo de Schaumann no interior de macrófagos epitelióides (linfonodo, isolado I aos 60 dias de infecção). **(F)** seta: eosinófilo no interior de vacúolo de macrófago; ponta de seta: amastigota dentro de vacúolo de macrófago (fígado, isolado I aos 60 dias de infecção) (Barra = 100 μm).





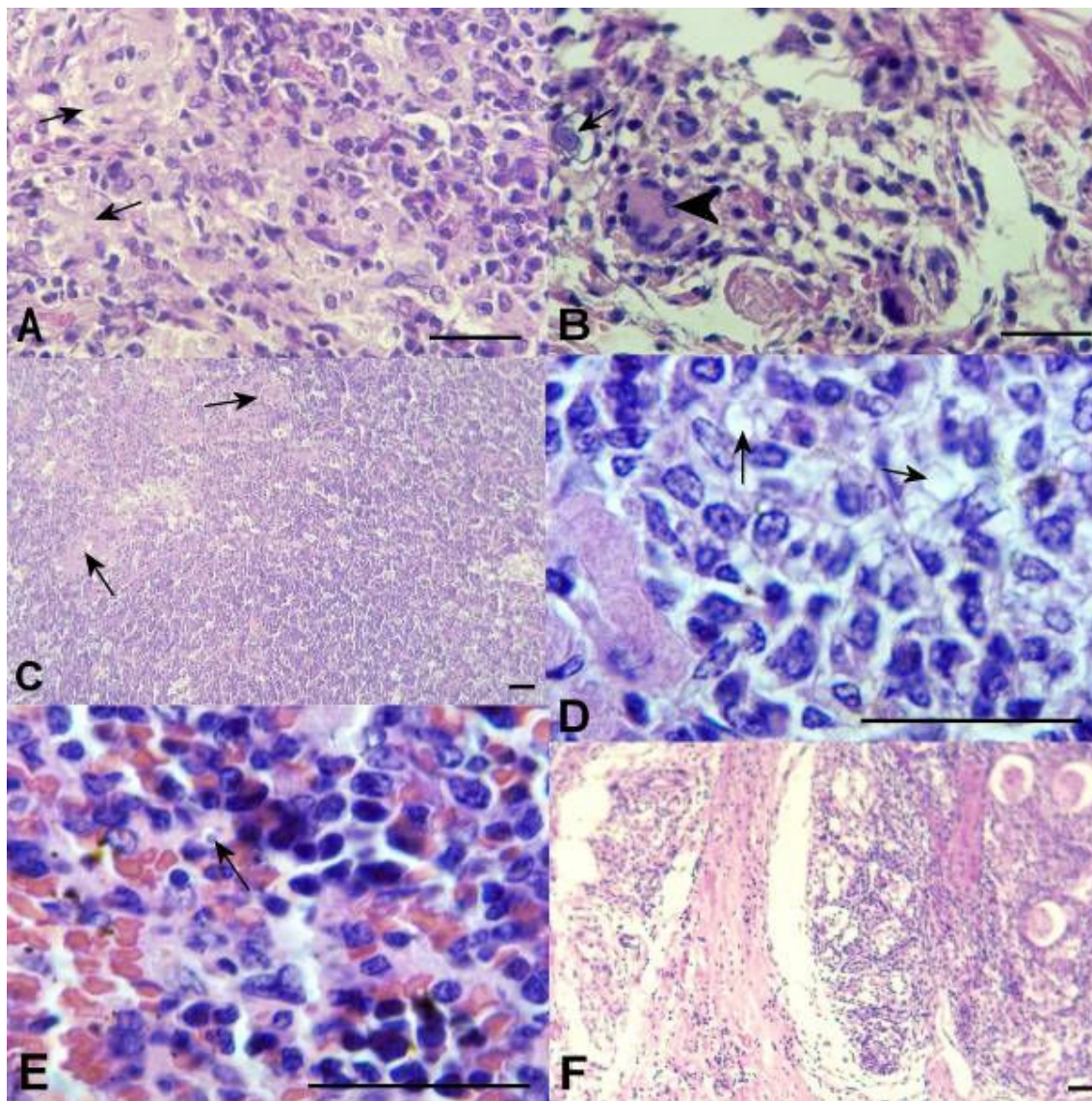
**Figura 6: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com HE de órgãos de hamsters infectados com o isolado I. (A)** seta: corpúsculo de Schaumann no centro de macrófagos epitelióides (fígado, isolado I aos 60 dias de infecção). **(B)** seta: amastigotas dentro de vacúolo de macrófagos (fígado, isolado I aos 60 dias de infecção) **(C)** periferia de reação granulomatosa, contendo neutrófilos (seta) (pele, isolado I aos 120 dias de infecção). **(D)** seta: corpúsculo de Schaumann, cabeça de seta: célula gigante multinucleada (pele, isolado I aos 120 dias de infecção). **(E)** seta: corpúsculo de Schaumann no interior de célula gigante multinucleada (linfonodo, isolado I aos 120 dias de infecção). **(F)** seta: *Leishmania* no interior de macrófago (fígado, isolado I aos 120 dias de infecção) (Barra = 100 µm).





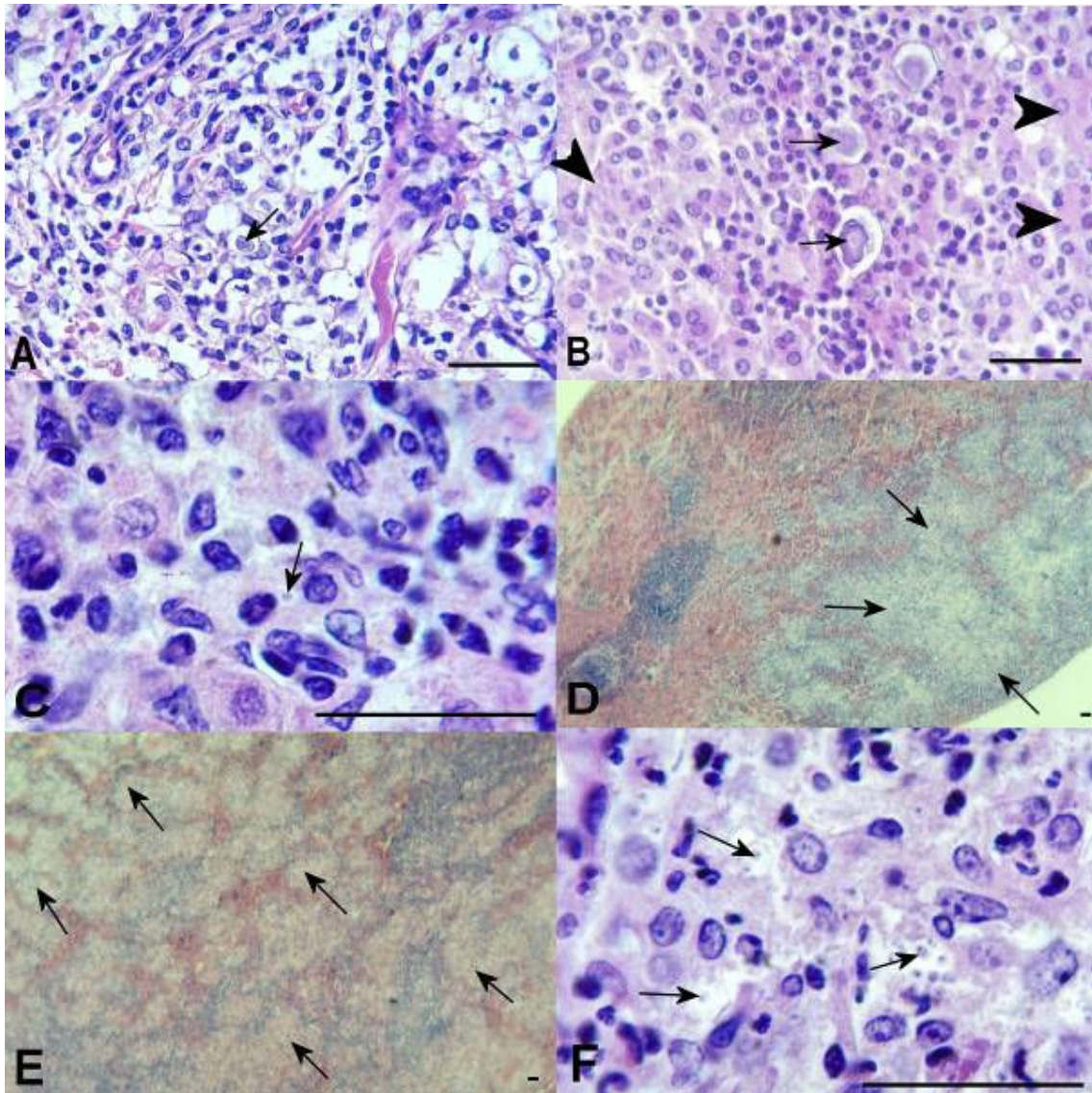
**Figura 7: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com HE de órgãos de hamsters infectados com isolados I e II. (A)** seta: corpúsculo de Schaumann no interior de célula gigante multinucleada (fígado, isolado I aos 120 dias de infecção). **(B)** baço com rarefação de polpa branca (isolado I aos 120 dias de infecção). **(C)** célula gigante multinucleada contendo corpúsculo de Schaumann (seta), cabeça de seta: inclusão sugestiva de *Leishmania* (medula óssea, isolado I aos 120 dias de infecção). **(D)** seta: *Leishmania* em macrófago (pele, isolado II aos 15 dias de infecção). **(E)** infiltrado de mononuclear com amastigotas (seta) no interior de vacúolos de macrófagos (pele, isolado II aos 60 dias de infecção). **(F)** seta: *Leishmania* no interior de grandes vacúolos de macrófagos (linfonodo, isolado II aos 30 dias de infecção) (Barra = 100 µm).





**Figura 8- Fotomicrografias de cortes histológicos corados com HE de órgãos de hamsters infectados com isolado II. (A)** seta: clareira de Montenegro (pele, isolado II aos 60 dias de infecção). **(B)** seta: corpúsculo de Schaumann, ponta de seta: célula gigante multinucleada (pele, isolado II aos 60 dias após infecção). **(C)** seta: clareira de Montenegro (linfonodo, isolado II aos 60 dias de infecção). **(D)** seta: vacúolo em macrófago (fígado, isolado II aos 60 dias após infecção). **(E)** seta: *Leishmania* em macrófago (baço, isolado II aos 60 dias de infecção). **(F)** reação granulomatosa (pele, isolado II aos 120 dias de infecção) (Barra = 100  $\mu$ m).





**Figura 9- Fotomicrografias de cortes histológicos corados com HE de órgãos de hamsters infectados com isolado II. (A)** Macrófagos com vacúolos de tamanhos variados; seta: corpúsculos de Schaumann (pele, isolado II aos 120 dias de infecção). **(B)** seta: corpúsculos de Schaumann, cabeça de seta: macrófagos epitelióides (linfonodo, isolado II aos 120 dias de infecção). **(C)** seta: *Leishmania* no interior de macrófagos (fígado, isolado II aos 120 dias de infecção). **(D)** seta: clareiras de Montenegro em região observada como nódulo macroscopicamente (baço, isolado II aos 120 dias de infecção). **(E)** rarefação da polpa branca com grande número de clareiras de Montenegro (seta) (baço, isolado II aos 120 dias de infecção). **(F)** seta: *Leishmania* no interior de macrófagos (baço, isolado II aos 120 dias de infecção) (Barra = 100 µm).

### 4.3 – Análise ultra-estrutural

#### 4.3.1 – Cepa de referência M2903

De maneira geral as avaliações realizadas nos fragmentos de órgãos dos animais inoculados pela cepa M2903 aos 15 e 30 dias após a inoculação não apresentaram alterações.

Aos 60 dias após a inoculação apenas o baço apresentou um grande número de eosinófilos e macrófagos com poucos lisossomos (Fig 10A). Não foram observadas amastigotas de *Leishmania* em nenhum dos órgãos.

Após 120 dias de inoculação, observou-se na pele intenso infiltrado inflamatório constituído principalmente por macrófagos e em menor quantidade por neutrófilos, linfócitos e plasmócitos, sendo raros os eosinófilos. Grandes quantidades de amastigotas foram vistas em vacúolos pequenos (Fig 10B) e grandes (Fig 10C), tanto em macrófagos quanto em neutrófilos. Puderam ser observados até dez amastigotas em vacúolos de macrófagos. Foi observada também a presença de amastigotas no meio extracelular (Fig 10D). Os linfonodos analisados neste período pós-inoculação mostraram presença de macrófagos com grandes vacúolos contendo número variado de *Leishmania*, geralmente mais de uma amastigota por vacúolo. O conteúdo dos vacúolos exibia aspecto eletrondenso (Fig 10E) ou eletrólúcido floculado (Fig 10F). Observou-se também a presença de neutrófilos, eosinófilos e plasmócitos. O fígado, o baço e a medula óssea não apresentaram alteração digna de nota neste período.

#### 4.3.2 – Isolado I

Aos 15 dias após a inoculação a derme apresentou-se com pequeno infiltrado inflamatório, constituído principalmente por macrófagos e raros linfócitos, apresentando ainda regiões íntegras, ricas em fibras colágenas. Presença de amastigotas, principalmente fora de células, geralmente adjacentes a macrófagos rompidos (Fig 10G). Os linfonodos neste período apresentaram macrófagos com grandes vacúolos, cujos conteúdos apresentaram aspecto floculento. Não foram



visualizadas formas amastigotas. Fígado, baço e medula óssea não apresentaram alterações ultra-estruturais.

Com 30 dias de inoculação, a epiderme apresentou-se íntegra, a derme mostrou a presença tanto de macrófagos contendo uma única *Leishmania* e membrana vacuolar justaposta ao parasito (Fig 10H), como macrófagos com grandes vacúolos contendo mais de uma amastigota em seu interior, estando estas localizadas na periferia dos vacúolos aderidas à membrana (Fig 10I). Formas amastigotas também foram vistas fora das células, geralmente próximas a macrófagos rompidos. Observaram-se linfócitos e neutrófilos, os últimos eventualmente contendo uma amastigota em seu interior. Os linfonodos neste período pós-inoculação mostraram macrófagos com grandes vacúolos com conteúdo floculento. Formas amastigotas de *Leishmania* foram observadas isoladas ou em grupos dentro de vacúolos parasitóforos de conteúdo floculento (Fig 11A) ou eletrondenso (Fig 11B). Amastigotas degeneradas foram observadas no interstício junto a debris celulares. Frequentemente foram observados eosinófilos isolados ou em grupos (Fig 11C) e mais raramente, neutrófilos. Fígado, baço e medula óssea neste período não apresentaram alterações ultra-estruturais.

Após 60 dias de inoculação, observou-se na derme intenso infiltrado inflamatório, constituído principalmente por acúmulos de macrófagos e linfócitos. Formas amastigotas de *Leishmania* foram vistas isoladas ou em grupos dentro de grandes vacúolos com conteúdo de aspecto eletrondenso (Fig 11D) ou floculento (Fig 11E), bem como isoladas em vacúolos com membrana justaposta ao parasito). Também foram observadas amastigotas dispersas na matriz extracelular (Fig 11F), *Leishmanias* degeneradas e áreas de necrose. Os linfonodos neste período mostraram numerosos macrófagos com vacúolos de diversos tamanhos, contendo *Leishmania* em números variados, envoltas por conteúdo eletrondenso ou com membrana justaposta ao parasito (Fig 11G). Foram observadas frequentemente *Leishmania* degeneradas, contidas geralmente em vacúolos de aspecto floculento (Fig 11H). Macrófagos degenerados foram vistos, contendo também parasitos degenerados (Fig 11I), tendendo a formar “corpos mielínicos”. No baço aos 60 dias de infecção observou-se a presença de macrófagos contendo *Leishmania* em

número variado, dentro de vacúolos de conteúdo eletrondenso (Fig 12A). Alguns macrófagos apresentaram uma única *Leishmania* dentro de vacúolos justapostos ao parasito (Fig 12B). Foram observados também muitos eosinófilos e alguns neutrófilos. Fígado e medula óssea não apresentaram alterações ultra-estruturais.

Com 120 dias de infecção, o infiltrado inflamatório na pele ainda era intenso, constituído principalmente por macrófagos e linfócitos e raros plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos. Os macrófagos, muitos deles com sinais de degeneração, continham numerosos e grandes vacúolos (Fig 12C), sendo raras as *Leishmania*. Presença de material elétron-denso envolto por macrófagos justapostos com grande quantidade de pequenos lisossomas. Nos linfonodos, foram vistos muitos plasmócitos, grandes macrófagos contendo numerosos pequenos lisossomas (Fig 12D), raros eosinófilos e neutrófilos. Os macrófagos parasitados foram vistos em poucas regiões do linfonodo e apresentaram vacúolos contendo *Leishmania* em número variado, geralmente de uma a três por vacúolo, envoltas por material eletrondenso (Fig 12E), algumas vezes sugerindo a fusão de fagossoma e lisossoma (Fig 12F). Frequentemente foram observados macrófagos grandes agrupados e justapostos, contendo muitos e pequenos lisossomas. Células gigantes multinucleadas também foram vistas, apresentando citoplasma rico em pequenos lisossomas (Fig 12G) e retículo endoplasmático granular e com superfície (membrana citoplasmática) apresentando grandes projeções citoplasmáticas. Alguns plasmócitos apresentaram retículo endoplasmático granular dilatado (Fig 12H). Estruturas elétrondensas com pequena camada eletrólúcida na periferia e tendendo ao formato circular foram vistas, geralmente envoltas por célula gigante multinucleada ou macrófagos justapostos. Em maiores ampliações, o material eletrondenso exibiu aspecto filamentosso emaranhado (Fig 12I). Eventualmente foi observada a presença de vacúolo eletróluscente em eosinófilo, com conteúdo sugestivo de amastigota degenerada (Fig 13A). Também foram observadas estruturas com eletrondensidade média, com aparência estratificada (Fig 13B). Neste período pós-inoculação, não foram observadas alterações dignas de nota no fígado, baço e medula óssea.

#### 4.3.3 – Isolado II

A pele aos 15 dias após a inoculação apresentou estrutura normal, com epitélio íntegro e derme rica em fibras colágenas, fibrócitos e raríssimos macrófagos. O linfonodo neste período pós-inoculação mostrou a presença de alguns macrófagos degenerados, com “figuras de mielina” em seu interior (Fig 13C). Não foram observadas forma amastigotas de *Leishmania*. Fígado, baço e medula óssea mostraram-se sem alterações ultra-estruturais.

Aos 30 dias após a inoculação, todas as amostras de órgãos apresentaram-se com estrutura normal.

Com 60 dias de infecção, a derme apresentava moderado infiltrado celular (Fig 13D), constituído principalmente por macrófagos e linfócitos, estando presentes também neutrófilos e raros eosinófilos. Não foi observado *Leishmania*, porém haviam macrófagos com lisossomas e vacúolos cujo conteúdo apresentava-se degradado (Fig 13E). Nos linfonodos notou-se a presença de macrófagos, alguns com numerosos e pequenos lisossomas e pequenos vacúolos. Eosinófilos foram vistos com frequência. Não foram encontrados parasitos. Fígado, baço e medula óssea mostraram-se com estrutura normal.

Com 120 dias de infecção, a pele apresentava infiltrado inflamatório intenso na derme, constituído por macrófagos, linfócitos e raros plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos. Os macrófagos continham grandes vacúolos com amastigotas, preenchidos por material com eletrondensidade semelhante a dos lisossomas (Fig 13F e 13G). Neste período após a inoculação, os linfonodos exibiram macrófagos vacuolizados contendo *Leishmania* envolto por conteúdo eletrondenso (Fig 13H), geralmente uma amastigota por vacúolo, podendo ser vistas até sete por vacúolo (Fig 13I). Macrófagos justapostos também foram observados, exibindo citoplasmas ricos em pequenos lisossomas e retículo endoplasmático rugoso (Fig 14A), sendo que alguns destes macrófagos mostraram a presença de vacúolos, contendo geralmente uma *Leishmania* em seu interior. O fígado neste período mostrou a presença de células de Kupfer com vacúolos contendo “figuras de mielina” (Fig 14B). No baço aos 120 dias de inoculação foram observados macrófagos parasitados, geralmente contendo pequenos e numerosos lisossomas, onde as

*Leishmania* encontravam-se em vacúolos de conteúdo eletrondenso, sendo geralmente em número de uma a três (Fig 14C). Eventualmente foram observados vacúolos contendo uma *Leishmania*, cuja membrana apresentava-se justaposta ao parasito (Fig 14D). Não foram observadas alterações ultra-estruturais na medula óssea.

#### **4.3.4 – PBS (Controle)**

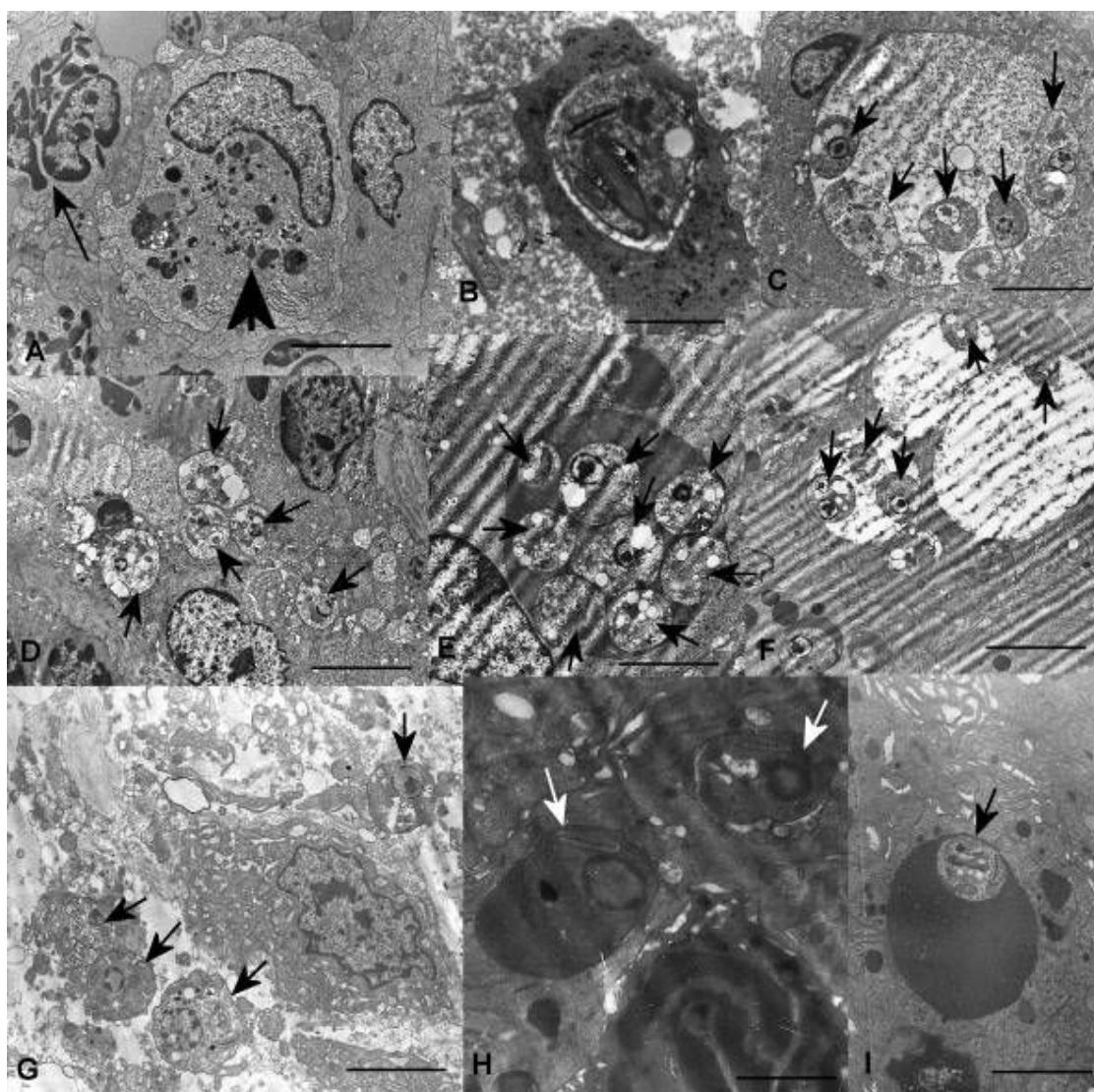
Todos os fragmentos de órgão avaliados apresentaram ultra-estrutura normal.

#### **4.3.5 – Análise ultra-estrutural das amastigotas**

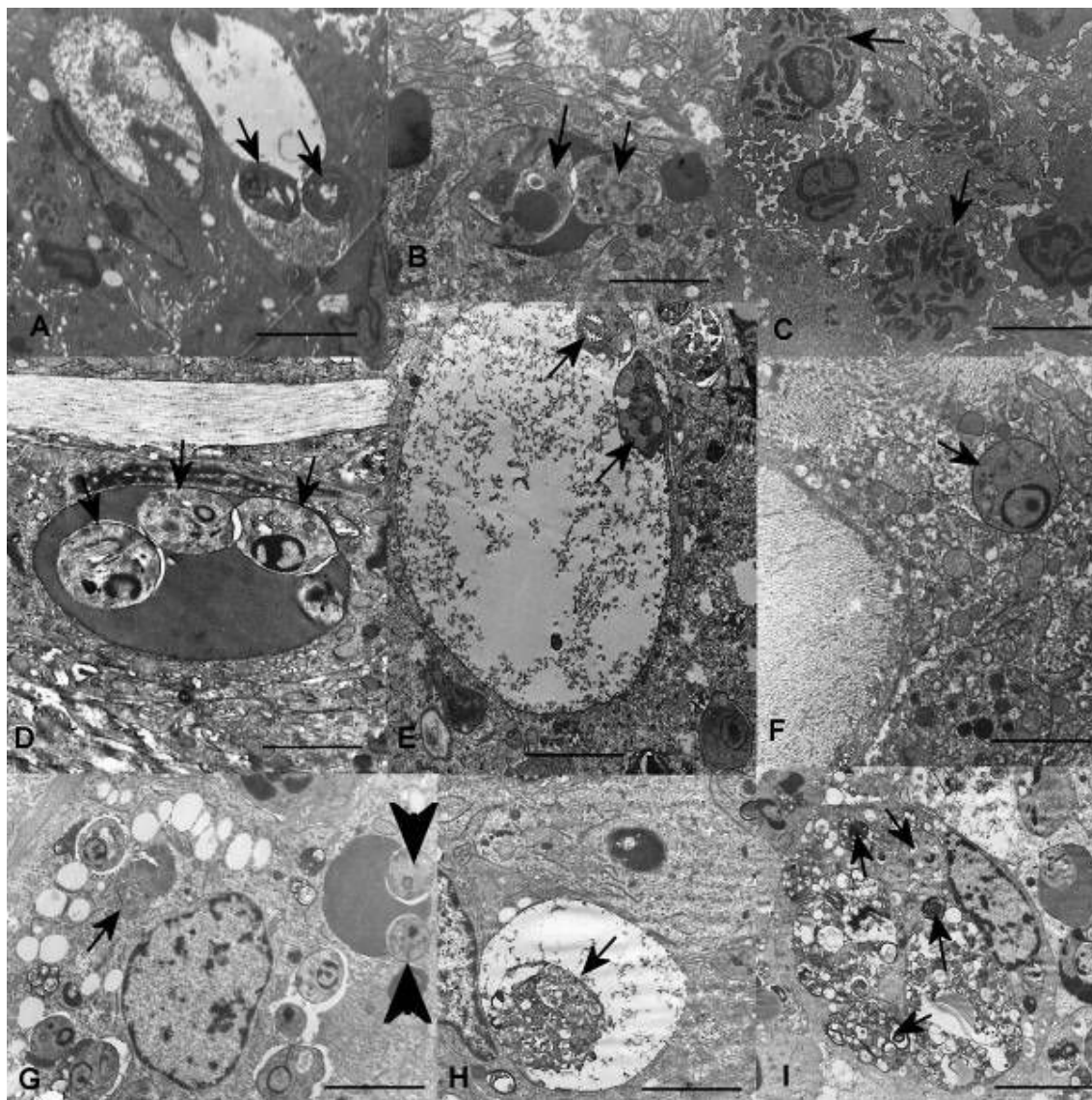
Independente da cepa, as amastigotas observadas nas diversas situações experimentais mostraram ultra-estrutura semelhante. Geralmente possuía forma elíptica com uma invaginação da membrana formando uma cavidade (bolsa flagelar) contendo um axonema (nove pares de microtúbulos periférico e um par central) envolto por membrana (flagelo rudimentar). Na base do axonema, já no interior do citoplasma do parasito, foi possível observar uma estrutura semelhante a corpúsculo basal (nove trincas de microtúbulos) envolto por material eletrondenso. No interior do parasito quase sempre foi possível notar a presença de núcleo com envoltório nuclear formado por duas unidades de membrana e espaço perinuclear. Geralmente o núcleo era constituído de cromatina densa (heterocromatina) adjacente ao envoltório nuclear e cromatina frouxa (eucromatina) na porção central, onde com frequência era possível notar pelo menos um nucléolo (Fig 15A, 15 B e 15C).

Sob a superfície interna da membrana citoplasmática foi possível observar uma camada de microtúbulos posicionados paralelamente e equidistantes um dos outros. No interior do citoplasma, em posição oposta e geralmente perpendicular a cauda rudimentar foi observada uma estrutura cilíndrica ligeiramente curva (cinetoplasto) contendo na porção central material eletrondenso, com lamelas transversais e acompanhando o formato da estrutura. Também eram frequentemente observados vacúolos com conteúdo eletrolúcido, entremeado com

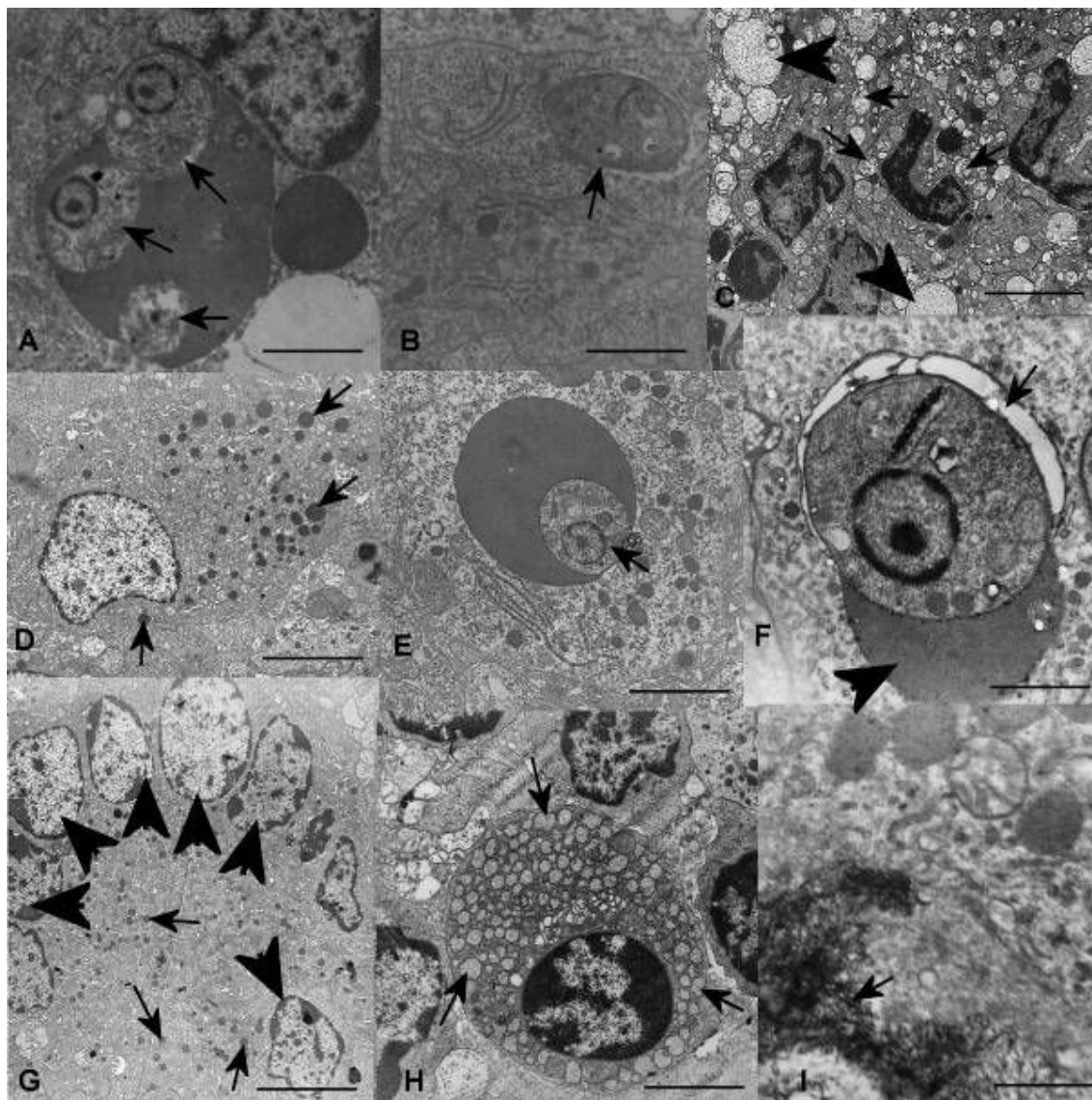
estruturas tendendo a circulares contendo material eletrondenso (calcissomos) ou com conteúdo de eletrondensidade média (glicossomos). Raramente foi visualizado o aparelho de Golgi (Fig 15 A, B e C).



**Figura 10- Eletromicrografias de órgãos de hamsters infectados com cepa de referência e isolado I.**(A) seta: eosinófilos, cabeça de seta: macrófago com lisossomas (baço, cepa M2903 aos 60 dias de infecção). (B) *Leishmania* em vacúolo com membrana justaposta (pele, cepa M2903 aos 120 dias de infecção). (C) vacúolo grande com conteúdo eletróluscente e flocculento, repleto de amastigotas (seta) (pele, cepa M2903 aos 120 dias de infecção). (D) seta: amastigotas na matriz extracelular (pele, cepa M2903 aos 120 dias de infecção). (E) seta: amastigotas em vacúolo de conteúdo eletrondenso (linfonodo, cepa M2903 aos 120 dias de infecção). (F) seta: amastigotas em vacúolos de conteúdo eletróluscente e flocculento (linfonodo, cepa M2903 aos 120 dias de infecção). (G) seta: amastigotas na matriz extracelular próximas a macrófago (pele, isolado I aos 15 dias de infecção). (H) seta: amastigotas em vacúolos justapostos (pele, isolado I aos 30 dias de infecção). (I) seta: amastigota única em vacúolo eletrondenso aderida à membrana interna do vacúolo (pele, isolado I, aos 30 dias de infecção) (Barra em A= 9 $\mu$ m, B= 2 $\mu$ m, C = 7 $\mu$ m, D= 6 $\mu$ m, E= 5  $\mu$ m, F= 7 $\mu$ m, G= 5 $\mu$ m, H= 3 $\mu$ m, I= 6 $\mu$ m)

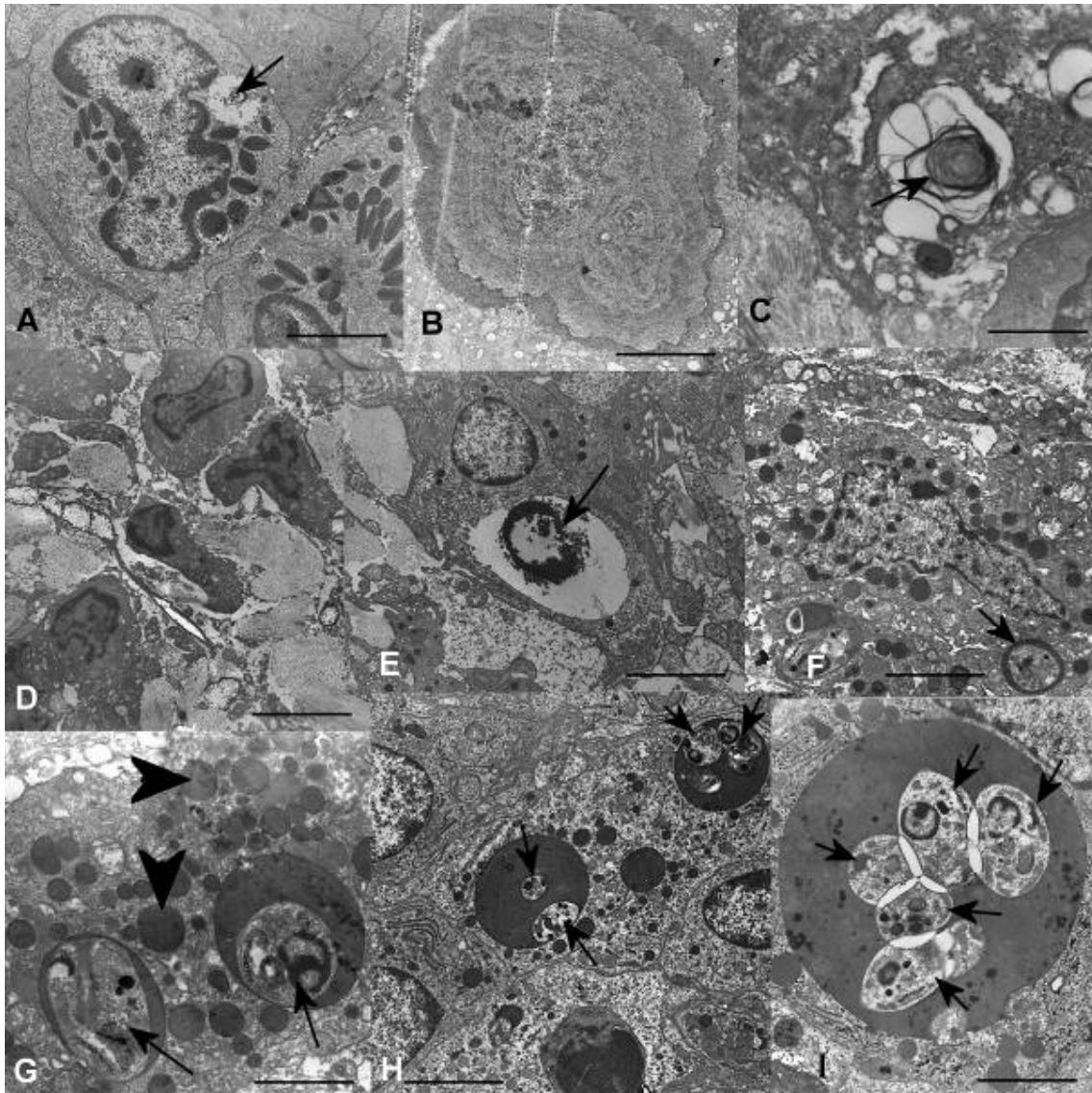


**Figura 11- Eletromicrografias de órgãos de hamsters infectados com isolado I. (A)** seta: amastigotas em vacúolo eletróluscente (linfonodo, isolado I aos 30 dias de infecção). **(B)** amastogita em vacúolo eletrondenso (linfonodo, isolado I aos 30 dias de infecção). **(C)** seta: eosinófilos (linfonodo, isolado I aos 30 dias de infecção); **(D)** seta: amastigotas dentro de vacúolo eletrondenso (pele, isolado I aos 60 dias de infecção). **(E)** seta: amastigotas dentro de vacúolo eletróluscente, presos à membrana interna (pele, isolado I aos 60 dias de infecção). **(F)** seta: amastigota no meio extracelular (pele, isolado I aos 60 dias de infecção). **(G)** seta: amastigota em vacúolo com membrana justaposta, cabeça de seta: amastigotas em vacúolo eletrondenso (Isolado I linfonodo 60 dias). **(H)** seta: *Leishmania* degenerada em vacúolo eletróluscente (linfonodo, isolado I aos 60 dias de infecção). **(I)** macrófago degenerado com amastigotas degeneradas (seta) formando corpos mielínicos (linfonodo, isolado I aos 60 dias de infecção) (Barra em A= 7µm, B= 5µm, C = 10µm, D= 4µm, E= 7µm, F= 5µm, G= 7µm, H= 3µm, I= 9µm).

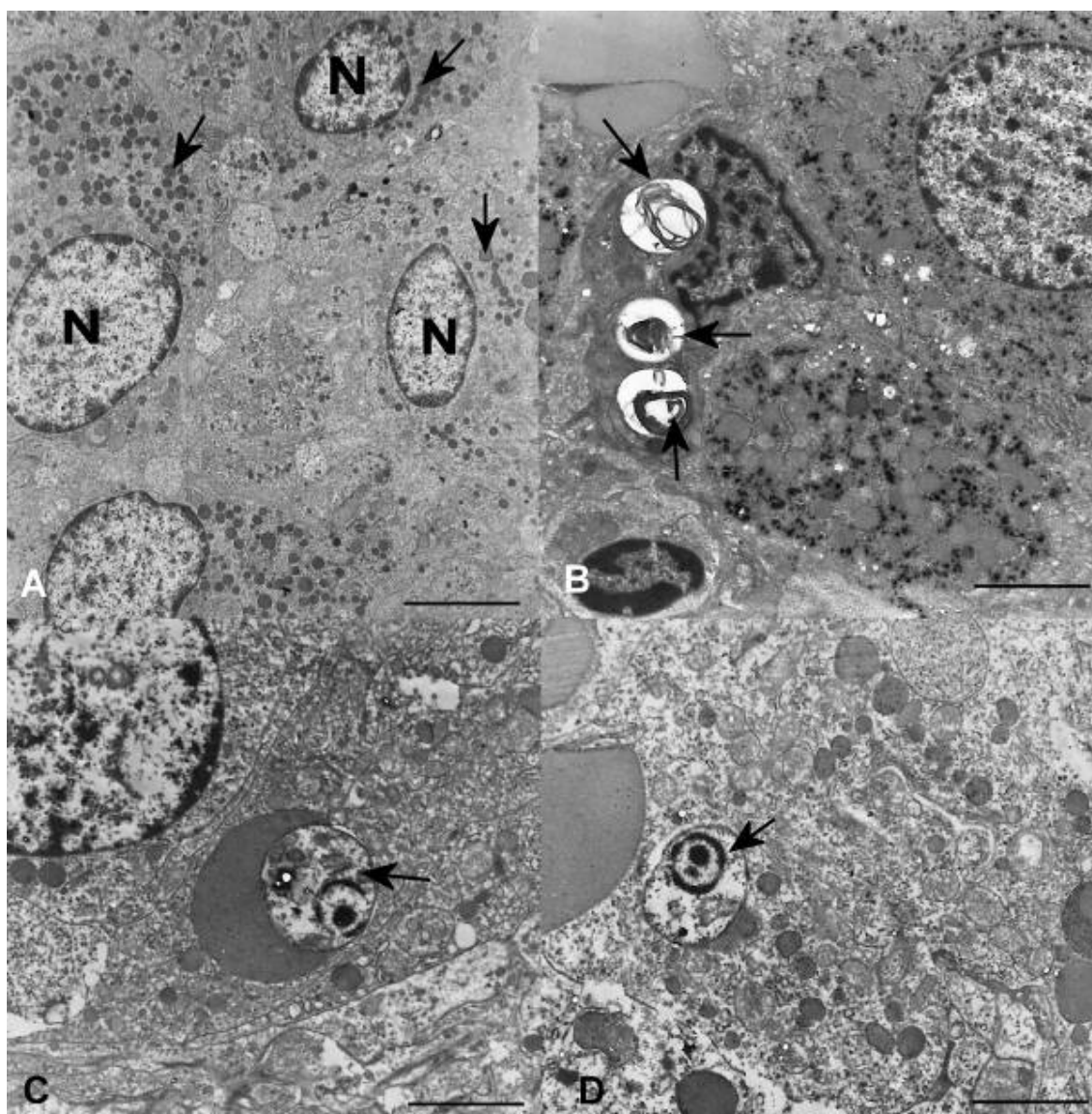


**Figura 12- Eletromicrografias de órgãos de hamsters infectados com isolado I. (A)** seta: amastigotas em vacúolo eletrondenso (baço, isolado I aos 60 dias de infecção). **(B)** seta: amastigota em vacúolo justaposto (baço, isolado I aos 60 dias de infecção) **(C)** macrófagos com sinais de degeneração (seta: mitocôndrias claras com cristas degradadas) e com vacúolos (cabeça de seta) (pele, isolado I aos 120 dias de infecção). **(D)** macrófago repleto de lisossomas (seta)(linfonodo, isolado I aos 120 dias de infecção). **(E)** seta: *Leishmania* em vacúolo eletrondenso (linfonodo, isolado I aos 120 dias de infecção). **(F)** *Leishmania* em vacúolo com forma que sugere estar ocorrendo a fusão do fagossoma (seta) com lisossoma (cabeça de seta) (linfonodo, isolado I aos 120 dias de infecção). **(G)** célula gigante multinucleada, cabeça de seta: núcleos, seta: lisossomas (linfonodo, isolado I aos 120 dias de infecção). **(H)** plasmócito com retículo endoplasmático dilatado (seta) (linfonodo, isolado I aos 120 dias de infecção). **(I)** seta: estrutura eletrondensa filamentar (linfonodo, isolado I aos 120 dias de infecção) (Barra em A= 4 $\mu$ m, B= 3 $\mu$ m, C= 12 $\mu$ m, D= 13 $\mu$ m, E= 5  $\mu$ m, F= 2 $\mu$ m, G= 18 $\mu$ m, H= 7 $\mu$ m, I= 0,5 $\mu$ m).

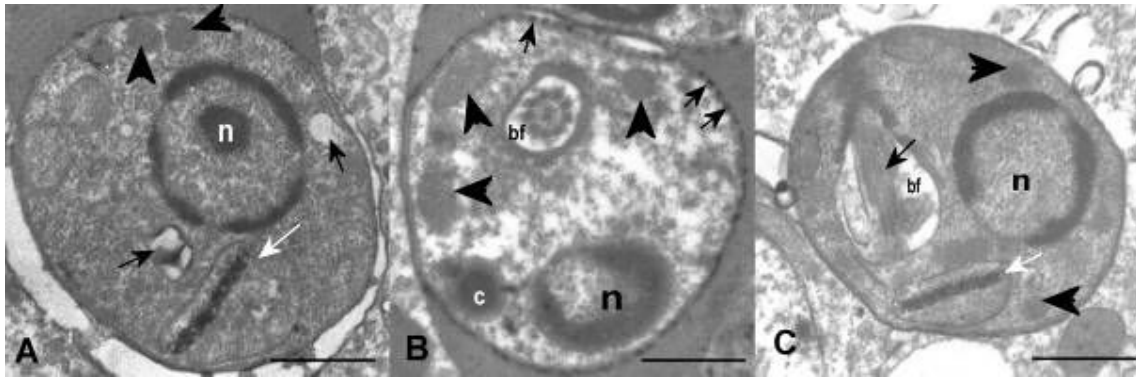




**Figura 13- Eletromicrografias de órgãos de hamsters infectados com isolados I e II. (A)** seta: vacúolo com conteúdo degenerado em eosinófilo (linfonodo, isolado I aos 120 dias de infecção). **(B)** estrutura de eletrondensidade média estratificada (linfonodo, isolado I aos 120 dias de infecção). **(C)** seta: figura de mielina em vacúolo de macrófago (pele, isolado II aos 15 dias de infecção). **(D)** infiltrado celular na derme (pele, Isolado II aos 60 dias de infecção). **(E)** seta: conteúdo degenerado dentro de vacúolo de macrófago (pele, isolado II aos 60 dias de infecção). **(F)** macrófagos contendo amastigotas (seta) em vacúolo eletrondenso (pele, isolado II aos 120 dias de infecção). **(G)** vacúolos contendo *Leishmania* (seta) com conteúdo apresentando mesma eletrondensidade dos lisossomas (cabeça de seta) (pele, isolado II aos 120 dias de infecção). **(H)** seta: *Leishmania* em vacúolo eletrondenso (linfonodo, isolado II aos 120 dias de infecção). **(I)** seta: amastigotas em vacúolo eletrondenso (linfonodo, isolado II aos 120 dias de infecção) (Barra em A= 7µm, B= 30µm, C = 2,5µm, D= 12µm, E= 12 µm, F= 7µm, G= 3,5µm, H= 8µm, I= 4,5µm).



**Figura 14- Eletromicrografias de órgãos de hamsters infectados com isolado II.** (A) macrófagos justapostos (N- núcleo), contendo vários pequenos lisossomas (seta) (linfonodo, isolado II aos 120 dias de infecção). (B) seta: vacúolos com figuras de mielina em célula de Kupfer (fígado, isolado II aos 120 dias de infecção). (C) seta: *Leishmania* em vacúolo eletrondenso (baço, isolado II aos 120 dias de infecção). (D) seta: *Leishmania* em vacúolo justaposto (baço, Isolado II aos 120 dias de infecção) (Barra em A= 13µm, B= 4µm, C = 5µm, D= 5µm).



**Figura 15- Eletromicrografias de amastigotas encontradas em órgãos de hamsters infectados com cepa de referência e isolados I e II. (A)** amastigota do isolado I, onde pode-se observar a presença de núcleo com nucléolo central (n), vacúolo eletrólúcido (seta negra), estruturas esféricas com eletrondensidade média (cabeça de seta)(glicossomo) e o cinetoplasto (seta branca). **(B)** amastigota do isolado II, onde pode-se observar microtúbulos periférico (seta negra), núcleo (n), estruturas elípticas com eletrondensidade média (cabeça de seta)(glicossomo), estruturas esféricas eletrondensa (c)(calcissomo), bolsa flagelar (bf) com axonema no centro contendo nove pares de microtúbulos periféricos e um par de microtúbulo central. **(C)** amastigota do isolado I, onde pode-se notar bolsa flagelar (bf), flagelo rudimentar (seta negra), cinetoplasto (seta branca), estruturas esféricas com eletrondensidade média (cabeça de seta)(glicossomo) e núcleo (n) (Barra = 1,2 $\mu$ m).

## V - Discussão

Neste presente trabalho, as alterações macroscópicas observadas na pele dos animais nos períodos pós-inoculação dos Isolados I, II e da cepa de referência demonstraram diferenças nos períodos de prepatência, no tamanho e na evolução da lesão, no que diz respeito à ulceração. Em ordem de aparecimento das lesões, o isolado I apresentou o menor período de prepatência, cuja lesão já foi percebida aos 15 dias pós-inoculação, e ulceração, percebida aos 60 dias de infecção, seguido pelo Isolado II, com lesão percebida macroscopicamente aos 30 dias, não apresentando ulceração em nenhum dos tempos analisados, e por fim pela Cepa de referência, onde só foi possível observar lesão aos 60 dias de infecção, esta também não apresentando ulceração durante sua evolução, sugerindo diferença na patogenia entre os materiais inoculados. As diferenças observadas na evolução das lesões na pele dos animais inoculados com a Cepa de referência no último período de análise foram relacionadas com diferentes respostas individuais à infecção. Essas alterações macroscópicas sugerem diferentes comportamentos desses isolados em comparação com a cepa de referência, no que diz respeito a patogenicidade e a infectividade.

Fato semelhante foi observado por Sinagra e colaboradores (1997) em estudo com isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* de pacientes portadores de LC na Argentina, onde foram analisados quatro isolados, sendo que três apresentaram períodos de prepatência mais curtos que o quarto isolado. As lesões eram predominantemente nodulares em um isolado, nodular e ulcerada em dois isolados e ulcerada no outro isolado. Um dos isolados mostrou-se mais infectivo que os outros, o que foi confirmado pelo menor período de prepatência observado e ulceração com longo período de duração e evolução. Este estudo mostrou variações intraespecíficas de isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* obtidos de pacientes portadores de LC na Argentina.

As alterações observadas na pele dos hamsters inoculados com os isolados I e II e com a cepa de referência seguiram a mesma seqüência histopatológica, constituída cronologicamente por: presença de infiltrado inflamatório difuso formado principalmente por macrófagos, contendo também neutrófilos, linfócitos e eosinófilos;

formação da reação granulomatosa organizada, com granuloma formado predominantemente por macrófagos epitelióides (formando as clareiras de Montenegro) e perifericamente neutrófilos, linfócitos e eosinófilos; presença de áreas de necrose, em alguns casos; presença de célula gigante multinucleada, contendo ou não corpúsculos de Schaumann. No entanto, foram observadas diferenças histopatológicas entre os isolados e a cepa de referência quanto ao período de aparecimento das lesões, a quantidade de parasitos observados e quanto à intensidade do infiltrado inflamatório e da reação granulomatosa. Esses achados, confirmados por trabalhos em hamsters e em outras espécies de animais experimentais como o de Laurenti e colaboradores (1990), Kahl e colaboradores (1991), Sinagra e colaboradores (1997), Silveira e colaboradores (1990), e Donnelly, Lima e Titus (1998), mostram que a infecção por *Leishmania* na pele segue essa seqüência de eventos, caracterizados como padrões histopatológicos. Contudo, Bittencourt e Barral em 1991 afirmaram que os padrões histopatológicos não representariam estágios da doença e que não seria possível a classificação histopatológica das lesões de LC, visto que mais de um padrão foi observado em biópsias de locais diferentes de uma mesma lesão.

Ridley em 1979, ao estudar a patogenia da LC, ressaltou a importância da carga parasitária nos achados histopatológicos das lesões. Esta estaria diretamente relacionada com a intensidade da necrose e da reação granulomatosa, visto que a necrose representa o principal mecanismo efetor da morte dos parasitos, além da reação de hipersensibilidade, tendo sempre como seqüela a reação granulomatosa, com células epitelióides e células gigantes multinucleadas. Lesões contendo baixa carga parasitária não apresentaram reação granulomatosa, cujo início dependia do aumento desta carga e cuja necrose dependia da presença de grandes quantidades de linfócitos e plasmócitos. Lesões com carga parasitária média levaram a uma boa estimulação antigênica, com o desencadeamento do processo necrótico que freqüentemente destruía os macrófagos hospedeiros bem como os parasitos. Quando a carga parasitária era alta, a doença se apresentou de forma anérgica, levando à não resolução desta. Estas observações estão de acordo com os resultados encontrados no presente trabalho, onde o Isolado I mostrou, já aos 30 dias

de infecção quantidade parasitária suficiente para o desencadeamento reação inflamatória já com características de granuloma. Já o Isolado II e a cepa de referência mostraram poucos parasitos no primeiro período analisado após a inoculação, justificando a inexistência dessa reação granulomatosa. Esta começou a ser percebida à medida que os parasitos apresentaram-se em maior quantidade na lesão. Este fato reforça a maior infectividade do Isolado I, representada pela precocidade no estabelecimento da infecção e pela maior quantidade de parasitos observados desde o início da avaliação histopatológica, assim como a intensidade da resposta inflamatória e da formação do granuloma, quando comparado com o Isolado II e a Cepa de referência. O Isolado II, durante a evolução da lesão, apresentou aumento na quantidade de parasitos, porém estes se mantiveram sempre em níveis baixos, principalmente quando comparado com qualquer período de análise do Isolado I. Em contrapartida, a reação granulomatosa observada foi mais exacerbada do que da Cepa de Referência quando esta apresentou baixos níveis de parasitos. Já a Cepa de Referência apresentou discreto aumento na quantidade de parasitos durante os três primeiros períodos da análise, com reação granulomatosa também discreta acompanhando a multiplicação dos parasitos e com acentuado aumento dos parasitos no último período analisado, acompanhado de intensa reação granulomatosa.

Na análise histopatológica deste presente estudo, o Isolado I mostrou maior precocidade no aparecimento do infiltrado inflamatório e maior quantidade de leucócitos presentes nesse infiltrado, além da maior quantidade de *Leishmania* observados já no primeiro período de análise, enquanto o Isolado II e a Cepa de referência neste período mostraram discreto aumento de macrófagos, que continham pequenas quantidades de parasitos. Diante dessas evidências, este trabalho mostrou que os isolados e a cepa padrão exibiram diferenças na indução do processo inflamatório, no que diz respeito ao influxo de leucócitos, onde o Isolado I apresentou maior número de infiltrado de macrófagos e neutrófilos comparados com o Isolado II e a Cepa de referência. Esses dados são observados também no trabalho de Teixeira e colaboradores (2005), quando estudaram isolados de *Leishmania* (V.) *braziliensis* provenientes de duas localidades geográficas distintas do Brasil. A

análise histopatológica desses isolados mostrou diferenças na patogenicidade entre eles, representada pela diferença nos tamanhos das lesões e no recrutamento celular, onde um exibiu maior lesão no local de inoculação e um infiltrado inflamatório três vezes maior que o outro, representado principalmente pela maior quantidade de PMN e macrófagos. Esses dados reforçam o papel das variações intraespecíficas dos parasitos nas diferenças observadas no processo inflamatório induzido por dois isolados de *Leishmania (V.) braziliensis* provenientes de duas localidades geográficas distintas. Nosso trabalho mostra também diferença entre os isolados analisados (do complexo *Braziliensis*), sendo que estes são provenientes de uma mesma localidade geográfica.

A observação de estruturas lamelares basofílicas em nosso trabalho denominadas Corpúsculos de Schaumann, foram achados constantes, onde estas apareceram tanto nos dois isolados quanto na cepa de referência, em pelo menos um período pós-inoculação, na maioria das vezes associado com a reação granulomatosa e freqüentemente dentro de célula gigante multinucleada. Esses Corpúsculos, também chamados de corpúsculos concoidais, são formados a partir de debris celulares, oriundos de necrose celular que são calcificados no centro do granuloma (Kahl et al, 1991). Corpúsculos de Schaumann foram encontrados em infecções experimentais de Hamster gold com *Leishmania* em trabalhos de Kahl e colaboradores (1991), Laurenti e colaboradores (1990) e Sinagra e colaboradores (1997). De acordo com Laurenti e colaboradores (1990), os Corpúsculos de Schaumann são vistos freqüentemente em macrófagos de hamsters e são considerados nestes animais como indicativo de um sistema fagocítico mononuclear frágil. Os achados freqüentes dessas estruturas no presente trabalho levou à sua associação com a reação granulomatosa e por conseguinte à infecção pela *Leishmania*, apesar do seu aparecimento nem sempre estar relacionado com o encontro do parasito na lesão. Os dados encontrados no presente estudo reforçam o papel da espécie de modelo experimental usada na ocorrência desta estrutura, visto que não existe descrição desse corpúsculo em outra espécie de animal experimental.

Na análise histopatológica dos órgãos dos animais inoculados foi observada a presença de *Leishmania* dos dois isolados analisados, tanto no linfonodo, como no

fígado e no baço. A cepa padrão mostrou formas amastigotas no linfonodo, enquanto que no fígado e baço foram observadas inclusões citoplasmáticas sugestivas de *Leishmania* em macrófagos. A positividade da infecção foi confirmada não só pela presença do parasito como também pelas alterações histopatológicas vistas nos parênquimas desses órgãos. Outros trabalhos que utilizaram infecções experimentais em pele de hamsters com *Leishmania (V.) braziliensis* também evidenciaram a presença do parasito em linfonodo, fígado e baço através de análise histopatológica (Almeida et al, 1996), de provas de detecção de DNA dos parasitos (Kahl et al, 1991), ou através da recuperação dos parasitos a partir de cultura dos órgãos dos animais infectados (Sinagra et al, 1997).

As alterações observadas nos órgãos dos animais deste presente trabalho foram compatíveis com infecção por *Leishmania* viscerotrópica, de acordo com trabalhos de Rica-Capela (2003), Laurenti e colaboradores (1990), Binhazim e colaboradores (1993), Giunchet e colaboradores (2007) e Porrozzi e colaboradores (2006). Da mesma forma, alterações compatíveis com infecção por *Leishmania* foram observadas em linfonodos, fígados e baços de hamsters inoculados com cepa de *Leishmania (V.) braziliensis*, de acordo com estudo realizado por Kahl e colaboradores (1991) e Almeida e colaboradores (1996).

De acordo com Sundar e Rai (2002), a pesquisa de amastigotas na medula óssea apresenta uma sensibilidade entre 60 a 85 % e, por representar um órgão de mais fácil obtenção de biópsia, quando comparado com o baço, que apresenta alto risco de hemorragia na realização deste procedimento, pode ser considerada como o órgão de eleição para pesquisa de *Leishmania*. No presente estudo não foram evidenciadas amastigotas nas medulas ósseas dos animais analisados, em análise histopatológica ou ultra-estrutural, sendo a possível causa a pequena quantidade do material coletado. A única alteração sugestiva da infecção por *Leishmania* em tal órgão foi presença de célula gigante multinucleada envolvendo corpúsculo de Schaumann, observado em apenas um animal do Isolado I no período de 120 dias após a inoculação. Já na biópsia de baço a sensibilidade pode ser maior que 95%. Os resultados do presente trabalho mostraram ser o baço um órgão de grande sensibilidade de detecção de *Leishmania*, visto que foi o órgão onde mais se



observou a presença do parasito, tanto em análise pelo microscópio ótico quanto pelo microscópio eletrônico.

As amastigotas visualizadas ao microscópio eletrônico apresentaram estruturas celulares comuns a este gênero, como a presença de microtúbulos dispostos sob a membrana celular unitária, o flagelo contendo estrutura de axonema e envolto pela bolsa flagelar, o cinetoplasto de aspecto cilíndrico, visto ou em cortes transversais ou longitudinais, o núcleo com cromatina peculiar, sistema de Golgi, calcissomos e glicossomos. Esses achados estão de acordo com as descrições de REY (2001), VANNIER-SANTOS, MARTINY & SOUZA (2002) e MEHREGAN e colaboradores (1999). A observação destas características ultra-estruturais permitiu facilmente identificar o parasito ao microscópio eletrônico, sendo pouco provável confundi-lo com outra estrutura (alta especificidade), situação totalmente diferente da microscopia de luz, onde geralmente é difícil garantir que estruturas observadas são amastigotas. No entanto, a avaliação ao microscópio eletrônico é realizada em fragmentos milimétricos, nem sempre representativos da lesão, levando muitas vezes a não observação dos parasitos em animais sabidamente infectados (baixa sensibilidade). Ou seja, as análises ultra-estruturais realizadas no presente trabalho mostraram maior especificidade e menor sensibilidade na detecção da *Leishmania* nos tecidos analisados quando comparadas às análises histopatológicas.

De maneira geral, as alterações ultra-estruturais nos tecidos analisados foram semelhantes entre os dois isolados e a cepa de referência, no que diz respeito às alterações teciduais e aos tipos celulares presente na reação inflamatória a *Leishmania*. Esses achados foram semelhantes aos encontrados por Corrêa, Brasil e Soares (2007) em infecção de hamster com *Leishmania (V.) lainsoni*, espécie de *Leishmania* dermatrópica pertencente também ao subgênero *Viannia*. As principais características presentes na pele além da presença do parasito foram os tipos celulares prevalentes, onde associados ao parasito eram freqüentemente vistos macrófagos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e plasmócitos. A cepa de referência mostrou maior quantidade de parasitos aos 120 dias após a inoculação, onde puderam ser vistas até 10 amastigotas por vacúolo parasitóforo. O isolado I manteve grande quantidade de amastigotas até os 60 dias de infecção, sendo observado

diminuição nessa quantidade e presença de *Leishmania* degenerada aos 120 dias de inoculação. Já o isolado II manteve níveis constantes de infecção em relação a quantidade de parasitos, mostrando maior reação inflamatória no último período de análise. Essas evidências sugerem que os dois isolados e a cepa de referência apresentaram diferentes comportamentos quanto à quantidade de parasitos e quanto ao tempo de estabelecimento e intensidade da reação inflamatória.

Foram observados neste presente trabalho, macrófagos contendo vacúolos parasitóforos com diferentes características ultra-estruturais: pequenos com membrana justaposta ao parasito e conseqüentemente sem conteúdo além da amastigota, onde esta era vista geralmente individualizada no seu interior e grande, cujo conteúdo apresentava-se ou de aspecto eletrondenso ou floculento, envolvendo uma ou mais amastigotas, as quais geralmente estavam localizadas aderidas a sua membrana. Esses dados reforçam achados de Ridley e Wells (1986) em estudo ultra-estrutural que avaliou as modificações encontradas nos vacúolos em infecções cutâneas por *Leishmania*.

Castro e colaboradores (2006), também em estudo ultra-estrutural para a avaliação de vacúolos parasitóforos produzidos por *Leishmania (L.) major* e *Leishmania (L.) amazonensis*, observaram a existência de dois tipos de vacúolos parasitóforos, um justaposto ao parasito e outro com conteúdo grande e espaçoso. Espécies do Velho Mundo encontravam-se individualizadas em vacúolos justapostos à membrana do parasito e espécies do Novo Mundo ocupavam vacúolos grandes contendo uma ou mais amastigotas aderidas à membrana do vacúolo por um único ponto. No presente trabalho observamos a existência desses dois tipos de vacúolos tanto nos dois isolados quanto na cepa de referência, em todos os períodos de análise. A partir dessas evidências, supomos que os diferentes vacúolos existentes podem estar relacionados com a fase de desenvolvimento destes, e não com a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção.

Essas fases de desenvolvimento dos vacúolos podem estar associadas com as etapas do processo de fagocitose e fusão do fagossomo aos lisossomos. Assim, o vacúolo com membrana justaposta, pode ser um fagossomo recém-formado, já que a fagocitose é um fenômeno que envolve receptores de membrana do macrófago e

ligantes da *Leishmania*, estando a membrana deste ligada molecularmente a substâncias da membrana do parasito. Já o vacúolo com conteúdo eletrondenso pode ser o fagossomo após a fusão do mesmo aos lisossomos. A forma do vacúolo da figura 12F corrobora ainda mais para esta suposição. É importante salientar que mesmo após esta fusão o parasito continua sua multiplicação no interior do fagolisossomo, pois foi possível visualizar este tipo de vacúolo com muitas amastigostas íntegras. O terceiro tipo de vacúolo seria um estágio mais avançado, onde o conteúdo estaria alterado pela ação das hidrolases lisossomais ou por ação de substâncias produzidas pelo próprio parasito.

Outra evidência encontrada no estudo ultra-estrutural foi a presença de *Leishmania* em neutrófilo, neutrófilo no interior de vacúolos de macrófago e possivelmente a presença do parasito em eosinófilo, onde foi observado vacúolo com conteúdo degenerado. Zandbergen e colaboradores (2004) em trabalho ultra-estrutural, observaram *Leishmania* no interior de PMN, concluindo que essas células são as primeiras a chegar no local da infecção e a fagocitar o parasito, porém sem conseguir matá-lo. Uma vez dentro dos PMN, a *Leishmania* levaria a um aumento da sobrevivência dessas células para dois dias, permitindo sua fagocitose pelos macrófagos, que chegam mais tarde no local de infecção. Esses achados sugerem que os PMN serviriam como “cavalo de Tróia” para a entrada do parasito no interior da célula hospedeira final silenciosamente e sem ser reconhecida.

De acordo com Handman (2001) e Choi e Lerner (2001), a visceralização de cepas dermatrópicas de *Leishmania* em humanos já foi observada em casos de infecção por *Leishmania (L.) tropica*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) aethiopica*. Em infecções experimentais em hamsters, Almeida e colaboradores (1996), Kahl e colaboradores (1991) e Sinagra e colaboradores (1997) demonstraram a visceralização de *Leishmania (V.) braziliensis* em linfonodo, fígado e baço. Entre pacientes humanos, a maioria os casos onde se observa visceralização de cepas dermatrópicas geralmente está associada com o status imunológico do indivíduo, como visto em pacientes portadores do vírus HIV (Silva et al, 2002) ou pacientes submetidos a drogas imunossupressoras em virtude de transplantes de órgãos (Gontijo et al, 2002).

Outro fator que poderia justificar esse comportamento incomum estaria associado com a variabilidade genética intraespecífica do parasito. De acordo com Oliveira e colaboradores (2004), em trabalho realizado com dois isolados de *Leishmania (V.) braziliensis* de duas localidades geográficas distintas, estes apresentaram polimorfismo genético em análise de seus perfis genômicos, além de mostrar diferentes manifestações clínicas quando inoculados em camundongos, reforçando a hipótese de que a variação na patogenicidade da *Leishmania* estaria relacionada com sua diversidade genética e poderia influenciar na apresentação clínica da doença, sendo esta diversidade menos pronunciada em populações de parasitos de áreas geográficas mais próximas. O presente trabalho mostrou variação clínica, variação histopatológica e ultra-estrutural dos isolados quando inoculados em hamsters, bem como variação no tropismo tecidual, levantando a possibilidade de existir variabilidade genética entre isolados de uma mesma localidade geográfica.

## VI – Conclusão

- A cepa de referência MHOM/BR/75/M2903 e os isolados analisados neste trabalho obtidos de lesões cutâneas de pacientes de Uberlândia (MG) pertencentes ao complexo *Leishmania braziliensis*, apresentaram patogenicidade e infectividade diferentes quando inoculados em coxim plantar de Hamster golden (*Mesocricetus auratus*);

- A cepa de referência MHOM/BR/75/M2903 e os isolados analisados neste trabalho obtidos de lesões cutâneas de pacientes de Uberlândia (MG) pertencentes ao complexo *Leishmania braziliensis*, demonstraram capacidade de visceralização em linfonodo, fígado e baço quando inoculados em coxim plantar de Hamster golden (*Mesocricetus auratus*).

## VII - REFERÊNCIAS

ABREU-SILVA, AL.; CALABRESE, K.S.; CUPOLILO, S.M.N.; CARDOSO, F.O.; SOUZA, C.S.F.; GONÇALVES DA COSTA, S.C. Histopathological studies of Visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mice Experimentally Infected. **Veterinary Parasitology**, . Amsterdam, v. 121, p. 179-187, 2004.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSELL, D.G. *Leishmania* species: Models of Intracellular Parasitism. **Journal of Cell Science**, London, v. 112, n. 18, p. 2993-3002, 1999.

ALMEIDA, M.C.; CUBA-CUBA, C.A; MORAES, M.A.P.; MILES, M.A. Dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 115, p. 311-316, 1996.

ALTAMIRANO-ENCISO AJ, MARZOCHI MC, MOREIRA JS, SCHUBACH AO, MARZOCHI KB. On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on pre- and post- colombian historical source. **Historia, ciencias, saúde-Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 10; ed. 3, p. 852-82, 2003.

AMARAL, V.F.; RANSATTO, V.A.O.; CONCEIÇÃO -SILVA, F.; MOLINARO, E.; FERREIRA, V.; COUTINHO, S.G.; McMAHON-PRATT, D.; JR., G.G. *Leishmania amazonensis*: The Asian Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*) as na Experimental Model for Study of Cutaneous Leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, New York, v. 82, p. 34-44, 1996.

BASANO, S.A., CAMARGO, L.M.A Leishmaniose Tegumentar: Histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. V. 7, n. 3, p. 328-336, 2004.

BAILEY, M.S.; LOCKWOOD, D.N.J. Cutaneous Leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**,

Philadelphia, v. 25, p. 203-211, 2007.

BINHAZIM, A.A; CHAPMAN JR., W.L.; SHIN, S.S.; HANSON, W.L. Determination of Virulence and Pathogenesis of a canine strain of *Leishmania leishmania infantum* in Hamsters and Dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 54, n. 1, p. 113-121,1993.

BITTENCOURT, A.L.; BARRAL, A. Evaluation of the Histopathological Classifications of American Cutaneous Leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 1, p. 51-56,1991.

BOZZOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists**. 2 ed. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 1998. 670p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnóstico Clínico e Diferencial. **Série A. Normas e Manuais Técnicos**. Brasília, Editora do Ministério da Saúde, 136p. 2006.

CAMARGO, L.B.; LANGONI, H. Impact of Leishmaniasis on Public Health. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**. v.12, n. 4, p. 527-548, 2006.

CAMERA, P.O.; JUNGER, J.; PIRES, F.E.S.S.; MATTOS, M.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; FERNANDES, O.; PIRMEZ, C. Haematogenous Dissemination of *Leishmania (Viannia) Braziliensis* in Human American Tegumentary Leishmaniasis. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 100, p. 1112-1116, 2006.

CASTRO, R; SCOTT, K.; JORDAN, 1.; EVANS, B.; CRAIQ, J.; PETERS, E.L.; SWIER, K. The Ultrastructure of the parasitophorous Vacuole Formed by *Leishmania major*. **The**

**Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 92, n. 6, p. 1162-1170, 2006.

CHANG, K.; AKMAN, L.; NIELSEN, J.S. *Leishmania* Virulence and Genetic Heterogeneity. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 17, p. 269-273, 1999.

CHOI, C.M.; LERNER, E.A. Leishmaniasis as an Emerging Infection. **The Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 6, ed. 3, p. 175-82, 2001.

CORRÊA, J.R.; BRAZIL, R.P.; SOARES, M.J. *Leishmania (Viannia) lainsoni* (Silveira et al. 1987): Ultrastructural Aspects of the Parasite and Skin Lesions in Experimentally Infected Hamster (*Mesocricetus auratus*). **Parasitology Research**, Berlin, v. 100, p. 1227-1232, 2007.

CUBA-CUBA, C.A. Diagnostico Parasitologico de la Leishmaniasis Tegumentária Americana. **Revista de Medicina Experimental**. Lima, v. 17, p. 1-4, 2000.

DEDET, J.; PRATLONG, F.; LANOTTE, G.; RAVEL, C. The Parasite. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 17, p. 261-268, 1999.

DESJEAUX, P. Leishmaniasis: Current Situation and New Perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v. 27, p. 305-318, 2004.

DIAS, E.S.; FRANÇA-SILVA, J.C.; SILVA, J.C., MONTEIRO, E.M.; PAULA, K.M.; GONÇALVES, C.M.; BARATA, R.A. Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) de um Foco de Leishmaniose Tegumentar no Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 1, p. 49-52, 2007.

DONNELL Y, K.B.; LIMA, C.L.; TITUS, R.G. Histologic Characterization of Experimental Cutaneous Leishmaniasis in Mice Infected With *Leishmania braziliensis* in The Presence and Absence of Sand Fly Vector Salivary Gland Lysate. **The Journal of Parasitology**,



Lawrence, v. 84, n. 1, p. 97-103, 1998.

DUARTE, M.L.; ROCHAEL, M.C. Histopathological and Immunohistochemical profile of the American Cutaneous Leishmaniasis with Emphasis on FXIIIa Dermal Dendrocytes. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 6, p. 537-544, 2006.

GHERSETICH, I.; MENCHINI, G.; TEOFOLI, P.; LOTTI, I. Immune Response to *Leishmania* Infection in Human Skin. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 17, p. 333-338, 1999.

GIUNCHETTI, R.C.; MARTINS-FILHO, O.A; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, AB. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 121, n. 1-2, p. 23-33, 2007.

GONTIJO, C.M.F.; PACHECO, R.S.; ORÉFICE, F.; LASMAR, E.; SILVA, E.S.; MELO, M.N. Concurrent Cutaneous, Visceral and Ocular Leishmaniasis Caused by *Leishmania (V.) braziliensis* in a Kidney Transplant Patient. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 5, p. 751-753, 2002.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 1, P. 71-80, 2003.

GRAMICIA, M.; GRADONI, L. The Current Status of Zoonotic Leishmaniasis and Approaches to Disease Control. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 35, p. 1169-1180, 2005.

GRIMALDI JR, G.; TESH, RB . Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 6, n.

3, p. 230-250, 1993.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n.:2, p. 229-243, 2001.

HARRIS, E.; KROPP, G.; BELLI, A.; RODRIGUEZ, B.; AGABIAN, N .. Single Step Multiplex PCR Assay for Characterization of New World *Leishmania* Complexes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 7, p. 1989-1995, 1998.

HEPBURN, N.C. Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, Oxford, v. 25, p. 363-370, 2000.

HEPBURN, N.C. Cutaneous Leishmaniasis: an overview. **Journal of Postgraduate Medicine**, Bombay, v. 49, n. 1, p. 50-54, 2003.

KAHL, L.P., BYRAM, J.E., DAVID, J.R, COMERFORD, S.A., LICHTENBERG, F. VON. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Comparative Pathology of Golden Hamsters Infected with Isolates from Cutaneous and Mucosal Lesions of Patients Residing in Três Rios, Bahia, Brasil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 44, n.2, p. 218-232, 1991.

LAURENTI, M.D., SOTTO, M.N., CORBETT, C.E.P., MATTA, V.L.R, DUARTE, M.I.R. Experimental Visceral Leishmaniasis: sequential events of granuloma formation at subcutaneous inoculation site. **International Journal of Experimental Pathology**, Madison, v. 71, ed. 6, p. 791-797, 1990.

MAGALHÃES, AV.; MORAES, M.AP.; RAICK, AN.; LLANOS-CUENTAS, A; COSTA, J.M.L.; CUBA, C.C.; MARSDEN, P.D. Histopatologia da Leishmaniose Tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*: Padrões histopatológicos e Estudo Evolutivo das Lesões. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 253-262, 1986.

MAYWALD, P.G.; MACHADO, M.I.; COSTA-CRUZ, J.M.; GONÇALVES-PIRES, M.R.F. Leishmaniose Tegumentar, Visceral, e Doença de Chagas caninas em Municípios do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 321-328, 1996.

MEHREGAN, D.R.; MEHREGAN, A.H.; MEHREGAN, D.A. Histologic Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 17, n. 1, p. 297--304, 1999.

NATAMI, A.; SAHIBI, H.; LASRI, S.; BOUDOUA, M.; GUESSOUSS-IDRRISSI, N.; RHALEM, A. Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the Khemisset province, Morocco. **Veterinary Research**, Paris, v.31, n. 3, p. 355-363, 2000.

OLIVEIRA, C.I.; TEIXEIRA, M.J.; GOMES, R.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C. Animal Models for Infectious Diseases Caused by Parasites: Leishmaniasis. **Drug Discovery Today: Disease Models**, Amstrdam, NewYork, v.1, n. 1, p. 81-86, 2004.

PORROZZI, R.; PEREIRA, M.S.; TEVA, A.; VOLPINI, A.C.; PINTO, M.A.; MARCHEVSKY, R.S.; BARBOSA JR., A.A.; GRIMALDI JR, G. *Leishmania infantum* - Induced Primary and Challenge Infections in Rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a Primate Model of Visceral Leishmaniasis. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 100, p. 926-937, 2006.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESÚS, M.N.; MARZAL, P.C. Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado da Arte. **Química Nova**, São Paulo, v. 6, n. 4, p. 550-555, 2003.

REITHINGER, R.; DIJARDIN, J.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous Leishmaniasis. <http://infection.thelancet.com>. Volume: 7, p. 581-596, 2007.

REY, L. **Parasitologia**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 3ed, 856p., 2000

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2001.

RIÇA-CAPELA, M.J.; CORTES, S.; LEANDRO, C.; PELETEIRO, M.C.; SANTOS-GOMES, G.; CAMPINO, L. Immunological and Histopathological Studies in a Rodent Model Infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. **Parasitology Research**, Berlin, v. 89, p. 163-169, 2003.

RIDLEY, D.S. The pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 73, n. 2, p. 150-160, 1979.

RIDLEY, M.J.; WELLS, C.W. Macrophage-parasite interaction in the lesions of Cutaneous Leishmaniasis. An Ultrastructural Study. **American Journal of Pathology**, Birmingham, v. 123, n. 1, p. 79-85, 1986.

ROJAS, E.; SCORSA, J.V.. *Leishmania braziliensis*: Aislamiento de Lesiones por Inoculación de Hámsteres com o sin Adición de Lisado de Glândulas Salivares de *Lutzomia youngi*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 1-5, 1995.

SILVA, E.S.; PACHECO, R.S.; GONTIJO, C.M.F.; CARVALHO, I.R.; BRAZIL, R.P. Visceral Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a Patient Infected with Human Immunodeficiency Virus. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 145-149, 2002.

SILVEIRA, F.T.; MORAES, M.A.P.; LAINSON, R.; SHAW, J.J. Leishmaniose Cutânea Experimental. III-Aspectos Histopatológicos do Comportamento Evolutivo da Lesão Cutânea Produzida em *Cebus apella* (Primates: Cebidae) por *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) amazonensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 387-394, 1990.

SILVEIRA, F.T.; LAINSONI, R; CORBETT, C.E. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil: a Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**,

SINAGRA, A; RIARTE, A; LUNA, C.; CAMPANINI, A; SEGURA, E.L. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Biological Behavior in Golden Hamsters of Isolates from Argentine Patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 57, n. 1, p. 115-118, 1997.

SOUZA, V.L.; SOUZA, J.A; SILVA, T.M.C.; WERAS, P.S.T.; FREITAS, L.A.R Different *Leishmania* Species Determine Distinct Profiles of Immune and Hostopathological Responses in CBA Mice. **Microbes and Infections**, Paris, New York, v. 2, p. 1807-1815,2000.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 9, n. 5. p. 951-958,2002.

TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L.; BARBOSA, A.J.A.; MICHALICK, M.S.M.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J.C.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E. Histopathology and Immunocytochemical Study of Type 3 and Type 4 Complement Receptors in the Liver and Spleen of Oogs Naturally and Experimentally Infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 81-89, 1996.

TEIXEIRA, M.J., FERNANDES, J.D., TEIXEIRA, C.R., ANORAOE, B.B., POMPEU, M.L., SILVA, J.S., BROOSKYN, C.I., BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A Distinct *Leishmania braziliensis* Isolates Induces Different Paces of Chemokine Expression Patterns. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 73, n. 2, 2005.

TEVA, A; PORROZZI, R; CUPOLILLO, E.; PIRMEZ, C.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; GRIMALDI JR, G. *Leishmania (Viannia) braziliensis*- Induced Chronic Granulomatous

Cutaneous Lesions Affecting the Nasal Mucosa in the Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*) model. **Parasitology**, London, New York, v. 127, p. 437-447, 2003.

TOLOSA, E.M.C.; RODRIGUES, J.R; BEHMER, O.A; FREITAS NETO, AG. **Manual de técnicas histológicas para histologia normal e patológica**. 2.ed., Barueri: Manole, 2003, 331 p.

TRIPATHI, P; SINGH, V.; NAIK, S. Immune Response to Leishmania: Paradox Rather than Paradigm. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, New York, v. 51, n. 2, p. 229-242, 2007.

VALE, E.C.S.; FURTADO, T. Leishmaniose Tegumentar no Brasil: Revisão Histórica da Origem, Expansão e Etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 4, p. 421-428, 2005.

VANNIER-SANTOS,M.A; MARTINY,A;SOUZA,W.Cell Biology of *Leishmania* spp: Invading and Evading.**Current Pharmaceutical Design**,Schiphol,v. 8, p.297-318, 2002.

VIANNA, V.L.; TAKYIA, C.M.; DE BRITO-GITIRANA, L. Histopathologic analysis of hamster hepatocytes submitted to experimental infection with *Leishmania donovani*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 88, n. 9, , p. 829-836, 2002.

WEIGLE, K.A; DAVALOS, M.; HEREDITA, P.;MOLINEROS, R.;SARAVIA, N.G.; D'ALESSANDRO, A Diagnosis of Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in Colômbia: a Comparision of Seven Methods. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 36, n. 1, p.489-496, 1987.

ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A; DANNENBERG, S.; GEBERT, A; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting Edge: Neitrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 173, p. 6521-6525,2004.