

ARTIGOS

LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL:
II – ASPECTOS EVOLUTIVOS DA INFECÇÃO NO PRIMATA
CEBUS APELLA (CEBIDAE) PELA *LEISHMANIA* (V.)
BRAZILIENSIS E *L. (L.) AMAZONENSIS*

Fernando T. Silveira, Ralph Lainson, Jeffrey J. Shaw,
Lourdes M. Garcez, Adelson A. Souza,
Roseli R. Braga e Edna A. Ishikawa

Objetivando avaliar o potencial do primata C. apella como modelo experimental da leishmaniose cutânea, produzida pela L. (V.) braziliensis e L. (L.) amazonensis, inocularam-se, via intradérmica, 3 X 10⁶ de promastigotas dessas leishmanias, em 8 sítios da cauda de 10 espécimens desse primata, 5 deles com a L. (V.) braziliensis e outros 5 com a L. (L.) amazonensis. Posteriormente, às inoculações, o exame semanal dos animais e biópsias mensais, revelaram os seguintes resultados relativos a cada parasita: a) L. (V.) braziliensis: o período de incubação foi de 15-20 dias; aos 30 dias evidenciaram-se lesões pápulo-eritematosas, que evoluíram para nódulos ao fim de 60 dias; no 3.º mês, notou-se ulceração espontânea destas lesões e, no 4.º mês, deu-se o início da reparação das lesões ulceradas, culminando com a cura em um dos animais após 5 meses, em dois após 6 meses, noutro após 7 meses e, no último, após 10 meses. Quanto ao parasitismo nas lesões, foi demonstrado nos 5 animais, até 90 dias; depois disto, somente em 2 até 120 dias e, por fim, até 180 dias apenas naquele que curou depois de 10 meses. b) L. (L.) amazonensis: o período de incubação foi de 20 dias; aos 30 dias notou-se lesões pápulo-eritematosas, que também evoluíram para nódulos ao fim de 60 dias, porém, a partir do 3.º mês, estas lesões regrediram rapidamente ao fim de 90 dias, quando não mais detectou-se o parasita na pele dos animais. Em relação aos testes de Montenegro, somente 2 dos 5 animais infectados com a L. (V.) braziliensis reagiram ao teste, 60 e 90 dias após as inoculações. Os resultados observados permitiram confirmar a infectividade do C. apella a estas leishmanias e, também, reforçar a indicação desse primata como modelo experimental da leishmaniose cutânea causada por estes parasitas.

Palavras-chaves: Leishmaniose cutânea experimental. Primata *Cebus apella*. *Leishmania (V.) braziliensis*. *Leishmania (L.) amazonensis*.

O estudo da leishmaniose cutânea experimental, em primatas neotropicais, tem se constituído objeto de grande interesse, face às evidências sobre a capacidade de alguns desses primatas em reproduzir os aspectos lesionais observados na leishmaniose tegumentar humana, sugerindo, por isso, sua utilização em estudos experimentais dessa patologia no homem. Sobre o assunto, trabalhos anteriores^{1 2 3 6 8 10} já haviam evidenciado a susceptibilidade de algumas

espécies de primatas, entre as quais o *Cebus apella*, à infecção experimental pelos agentes de leishmaniose tegumentar americana. Destes, faz-se importante salientar o trabalho de Lainson & Shaw³ que, ao investigarem a imunidade cruzada entre espécie de *Leishmania* dos grupos *braziliensis* e *mexicana* no *Cebus apella*, demonstram a infecção desse primata às diferentes espécies de parasitas inoculados, assim como, o desenvolvimento de lesão cutânea no local dos inóculos. Além disto, outro fato que veio reforçar as evidências já obtidas em estudo experimental, refere-se à recente publicação de Lainson col.⁴ na qual os autores deram conhecimento à infecção natural do primata *Cebus apella* por *Leishmania*, cujo parasita foi isolado da pele, aparentemente íntegra, de três espécimens desse primata, capturados em zona endêmica de leishmaniose tegumentar na região Amazônica, constituindo, assim, mais uma evidência do potencial desse animal como modelo de estudo da doença humana.

Trabalho do Instituto Evandro Chagas (Fundação SESP).
Apoio da Fundação Serviços de Saúde Pública, Ministério da Saúde, Brasil, Wellcome Trust, Londres e UNDP/World/Bank/who special programme for research and training in Tropical Diseases.

Endereço para correspondência: Dr. Fernando T. Silveira.
Instituto Evandro Chagas. CP: 1128, Cep: 66050 Belém, PA, Brasil.

Recebido para publicação em 28/08/89.

Desse modo, tendo em vista as observações acima, o presente trabalho objetiva relatar os aspectos evolutivos da infecção experimental no primata *C. apella* pela *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, os quais constituem, de fato, os primeiros resultados de um estudo mais amplo, que visa abordar a patogênese da doença em caráter experimental, com o intuito de melhor entender a doença humana causada por estas parasitas.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais de experiência

Objetivando o estudo em questão, foram selecionados dez exemplares jovens desta espécie de primata (10 – 20 meses de idade), sendo seis machos e quatro fêmeas, com pesos variando de 1280-1870 gramas, todos provenientes do Centro Nacional de Primatas (F. SESP), Belém, Pará, onde esses animais são originados de reprodução em cativeiro. Antes, porém, de proceder a inoculação dos parasitas nos animais, foram realizados testes sorológicos específicos (Imunofluorescência indireta) e intradérmicos com antígeno de Montenegro com a finalidade de ser excluída, totalmente, a possibilidade de serem usados animais previamente infectados por *Leishmania*.

No Instituto Evandro Chagas, local onde o experimento foi realizado, os animais eram mantidos em biotério isolado para primatas, sendo guardados em gaiolas individuais, com dimensões de 47cm de largura, 72cm de altura e 60cm de profundidade, respectivamente. A dieta alimentar dos animais consistiu de leite, ovo, frutas e legumes variados, ração balanceada comercialmente chamada “bonzo” e água.

Parasitas

Visando o desenvolvimento das infecções experimentais nos primatas foram usadas cepas padrões da *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/88/M11.636 – Monte Dourado, Pará) e da *L. (L.) amazonensis* (IFIA/BR/67/PH8 – Utinga, Belém, Pará), mantidas no laboratório através de repiques semanais em meio de cultura Difco B45¹² e, também, através de repiques mensais em hamsters (*Mesocricetus auratus*).

Infecções experimentais

Os inóculos, em número de dois, utilizados para infectar os primatas com as respectivas espécies de *Leishmania*, consistiram de suspensões (0,1ml de fosfato de sódio glicosado = PSG 4:6, pH 8,0) contendo 3×10^6 de promastigotas, obtidas da fase estacionária de cultivo em meio Difco B45, a partir de

tecido de hamster infectado com os parasitas. Desse modo, dos dez animais utilizados no experimento, foram formados dois grupos de cinco animais, sendo cada grupo inoculado, separadamente, com uma das espécies de *Leishmania*. As inoculações foram feitas intradermicamente, na região dorsal da cauda dos animais, previamente depilada, em oito sítios diferentes, recebendo, portanto, cada animal uma carga total de 24×10^6 de promastigotas.

Objetivando o controle das infecções nos primatas, dois grupos de quatro hamster foram inoculados, intraderme, nas patas posteriores com os mesmos inóculos (3×10^6 de promastigotas) utilizados para os primatas.

Parâmetros de avaliação da evolução das infecções

Posteriormente à inoculação dos parasitas, os animais eram examinados, semanalmente, com o fim de ser observado o aparecimento e o desenvolvimento de lesão nos sítios inoculados, permitindo dessa forma não só identificar o período de incubação das infecções, por esses parasitas mas, também, acompanhar a evolução e a resolução das lesões nos dois grupos de animais. Além disto, foram feitos, também, outros procedimentos que serviram para avaliar o curso das infecções:

a) Biópsias: realizadas a cada 30 dias após as inoculações e utilizadas para a pesquisa dos parasitas em esfregaços de aposição corados pelo Giemsa.

b) Testes intradérmicos com antígeno de Montenegro: realizados a cada 30 dias após as inoculações, visando observar o desenvolvimento de resposta imune mediada por células. O antígeno empregado nos testes foi preparado com promastigotas de cultura da *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/88/M11.636 – M. Dourado, Pará), de acordo com método descrito por Shaw & Lainson⁹. As injeções intradérmicas eram feitas com 0,1ml do antígeno (10×10^6 de promastigotas/ml), na face anterior do antebraço dos animais e a leitura realizada após 48-72 horas. Reações formadas de eritema e/ou de induração maiores que 0,5cm, foram consideradas positivas.

RESULTADOS

As principais observações pertinentes à evolução das infecções experimentais no primata *C. apella* pela *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, estão contidas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Entretanto, será apresentada abaixo uma breve descrição dessas observações, na tentativa de tornar mais clara a dinâmica desses processos.

1. Infecção experimental pela *L. (V.) braziliensis*:

O primeiro indício, sugerindo o aparecimento de lesão nos animais foi observado entre 15 e 20 dias após as inoculações do parasita, período no qual foram vistas nos cinco animais lesões focais de eritema, em quase todos os pontos de inoculação do parasita. No trigésimo dia, as lesões existentes mostravam-se agora mais salientes, de aspecto tipicamente pápulo-eritematoso. Nesta ocasião, a pesquisa do parasita nas lesões resultou positiva nos cinco animais, porém, nenhum deles respondeu ao teste intradérmico de

Montenegro.

No segundo mês de observação, foi evidenciado progressivo aumento das lesões, fato este, que originou lesões nodulares eritematosas 60 dias depois das inoculações, quando, mais uma vez, foram demonstradas amastigotas do parasita nestas lesões. Por outro lado, foram registrados, também, os primeiros resultados positivos à reação intradérmica de Montenegro, verificados apenas nos animais de número 2 e 4 (Tabela 1).

Tabela 1 - Aspectos evolutivos da infecção experimental do primata *Cebus apella* pela *Leishmania (V.) braziliensis*.

Animal nº	Período P.I.* (meses)	Nº de lesões	Tipo de lesão	Pesquisa do parasita (Ex. direto)	R.I.M.
1	1º	7	Eritemato-papulosa	+	-
	2º	7	Nodular	+	-
	3º	7	Ulcerada	+	-
	4º	6	Ulcerada	+	-
	5º	6	Ulcerada	+	-
	6º	6	Ulcerada (em cicatrização)	+	-
	7º	6	Ulcerada (em cicatrização)	-	-
	8º	6	Cicatrizada (bordos infiltrados)	-	-
2	1º	7	Eritemato-papulosa	+	-
	2º	7	Nodular	+	+
	3º	6	Nodular (2), Ulcerada (4)	+	+
	4º	4	Ulcerada, em cicatrização (2)	-	-
	5º	2	Ulcerada (em cicatrização)	-	-
	6º	0	-	-	-
	7º	0	-	-	-
	8º	0	-	-	-
3	1º	7	Eritemato-papulosa	+	-
	2º	7	Nodular	+	-
	3º	7	Nodular (3), Ulcerada (4)	+	-
	4º	7	Nodular (2), Ulcerada (5)	+	-
	5º	6	Ulcerada	-	-
	6º	6	Ulcerada (em cicatrização)	-	-
	7º	0	-	-	-
	8º	0	-	-	-
4	1º	7	Eritemato-papulosa	+	-
	2º	7	Nodular	+	+
	3º	7	Nodular (2), Ulcerada (5)	+	-
	4º	7	Ulcerada, em cicatrização (5)	-	-
	5º	2	Ulcerada (em cicatrização)	-	-
	6º	0	-	-	-
	7º	0	-	-	-
	8º	0	-	-	-

Tabela 1 - (continuação)

Animal nº	Período P.I.* (meses)	Nº de lesões	Tipo de lesão	Pesquisa do parasita (Ex. direto)	R.I.M.
5	1º	7	Eritemato-papulosa	+	-
	2º	6	Nodular	+	-
	3º	6	Nodular (1), Ulcerada (5)	+	-
	4º	4	Ulcerada (em cicatrização)	-	-
	5º	0	-	-	-
	6º	0	-	-	-
	7º	0	-	-	-
	8º	0	-	-	-

* Pós-inoculação; R.I.M. Reação Intradérmica de Montenegro: + Positivo; - Negativo.

No decorrer do terceiro mês, foi notada ulceração espontânea das lesões nos animais, de maneira que, 90 dias após as inoculações, todos apresentavam mais da metade das lesões já ulceradas (Figura 1), nas quais, foi possível identificar, novamente, amastigotas do parasita. Quanto ao teste de Montenegro, foi observada resposta positiva somente no animal 2, uma vez que o animal 4 não mais reagiu e os outros três (1, 3 e 5) continuaram negativos.

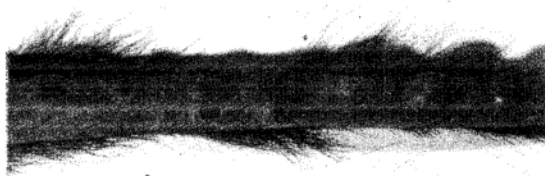


Figura 1 - Notar o aspecto ulcerado das lesões na cauda do primata *Cebus apella*, 90 dias após a inoculação de *Leishmania (V.) braziliensis*.

Prosseguindo as observações, constatou-se durante o quarto mês das infecções, o início da reparação das lesões ulceradas, principalmente nos animais 2, 4 e 5, nos quais grande parte dessas lesões já se apresentava em fase de cicatrização, quando estes animais foram examinados 120 dias depois das inoculações. Associada a este fato, a pesquisa de *Leishmania*, nestas lesões, resultou totalmente negativa, diferindo em muito das pesquisas nos animais 1 e 3, uma vez que, nestes, não foi difícil encontrar amastigotas do parasita nas lesões, as quais apresentavam ainda aspecto francamente ulcerado. Nesta ocasião, foi visto também que nenhum dos animais respondeu ao teste de Montenegro, inclusive o animal

2, que havia respondido 60 e 90 dias depois das inoculações.

No quinto mês das infecções, notou-se que a cicatrização das lesões nos animais 2, 4 e 5, sofreu grande avanço nesse período, fim do qual, pelo menos o animal 5 já estava completamente curado. Ao contrário disto, as lesões nos animais 1 e 3 ainda conservavam aspecto ulcerado, embora somente no primeiro tenham sido encontradas amastigotas do parasita. Quanto ao teste de Montenegro, os resultados mantiveram-se negativos nos cinco animais, conservando-se desta maneira até o final das avaliações, cerca de 240 dias após as inoculações.

Continuando as observações, foi evidenciada durante o sexto mês das infecções, a cura definitiva das lesões nos animais 2 e 4. Por outro lado, observou-se, também nesse período, o começo da reparação das lesões nos animais 1 e 3, embora, mais uma vez, somente no primeiro continuasse positiva a pesquisa do parasita nas lesões.

No sétimo mês, notou-se que a cicatrização das lesões se fez mais rapidamente no animal 3, o que ficou evidenciado pela cura completa das lesões no animal, ao final desse período. Em contrapartida, as lesões no animal 1, embora parcialmente cicatrizadas, ainda mostravam áreas ulceradas na superfície. Entretanto, nesta ocasião, não foram mais detectadas amastigotas do parasita nestas lesões.

Concluindo as observações, cabe dizer que, após 8 meses de acompanhamento das infecções, não foram mais evidenciadas lesões na pele dos animais 2, 3, 4 e 5. Por outro lado, foi visto que as lesões no animal 1 haviam finalmente cicatrizado, porém, apresentavam ainda sinais de infiltração nos bordos, denotando com isto que o processo não estava completamente curado, embora não houvesse confirmação

da presença do parasita nestas lesões. Por esta razão, continuou-se as observações neste animal até 10 meses após as inoculações, quando então não foram mais observados sinais de lesão no animal.

2. Infecção experimental pela *L. (L.) amazonensis*

A primeira indicação do aparecimento de lesão nos animais foi observada 20 dias depois das inoculações do parasita, ocasião em que foram vistas nos animais 2, 3, 4 e 5, áreas focais de eritema em mais da metade dos pontos de inoculação do parasita. Di-

ferente disto, o animal 1 não apresentou qualquer sinal de lesão nesta ocasião, o que, curiosamente, só foi evidenciado cerca de 75 dias após as inoculações, quando também foram notadas áreas focais de eritema, em pelo menos quatro dos oito sítios inoculados com o parasita. No trigésimo dia, as lesões presentes nos animais 2, 3, 4 e 5, apresentavam agora aspecto mais elevado, de caráter nitidamente pápulo-eritematoso. Nesta oportunidade, a pesquisa do parasita nas lesões revelou-se positiva nos quatro animais examinados. De outro modo, o teste intradérmico com leishmanina resultou negativo nos cinco animais.

Tabela 2 - Aspectos evolutivos da infecção experimental do primata *Cebus apella* pela *Leishmania (L.) amazonensis*.

Animal nº	Período P.I.* (meses)	Nº de lesões	Tipo de lesão	Pesquisa do parasita (Ex. direto)	R.I.M.
1	1º	0	-		-
	2º	0	-		-
	3º	4	Eritemato-papulosa	+	-
	4º	4	Nodular	+	-
	5º	0	-		-
2	1º	3	Eritemato-papulosa	+	-
	2º	3	Nodular	+	-
	3º	0	-		-
	4º	0	-		-
	5º	0	-		-
3	1º	7	Eritemato-papulosa	+	-
	2º	7	Nodular	+	-
	3º	0	-		-
	4º	0	-		-
	5º	0	-		-
4	1º	7	Eritemato-papulosa	+	-
	2º	7	Nodular	+	-
	3º	0	-		-
	4º	0	-		-
	5º	0	-		-
5	1º	6	Eritemato-papulosa	+	-
	2º	6	Nodular	+	-
	3º	0	-		-
	4º	0	-		-
	5º	0	-		-

* Pós-inoculação; R.I.M. Reação Intradérmica de Montenegro; + Positivo; - Negativo.

No decorrer do segundo mês das infecções, foi visto nítido crescimento das lesões nos animais 2, 3, 4 e 5, as quais, assumiram então aspecto nodular

eritematoso, 60 dias depois das inoculações (Figura 2). Nesta ocasião, a pesquisa do parasita nas lesões mostrou-se mais uma vez positiva nos quatro animais,

porém, a reação de Montenegro manteve-se negativa nos cinco animais testados.



Figura 2 – Notar o aspecto nodular das lesões na cauda do primata *Cebus apella*, 60 dias após a inoculação de *Leishmania (L.) amazonensis*.

Prosseguindo as observações, foi constatada durante o terceiro mês das infecções, rápida e progressiva regressão das lesões nos quatro animais, culminando com a cura total e simultânea das lesões, 90 dias após as inoculações. Em contraste, notou-se nesse período, o aparecimento das lesões iniciais no animal 1, o qual, após 90 dias de inoculado, apresentava agora quatro lesões de aspecto pápulo-eritematoso, semelhantes aquelas vistas nos outros animais 30 dias depois de inoculados. Associado a este fato, demonstrou-se amastigotas do parasita em uma das lesões desse animal. Por outro lado, o teste de Montenegro permaneceu negativo nos cinco animais, da mesma forma que antes observado.

Continuando as observações, notou-se no decorrer do quarto mês, aumento visível das lesões no animal 1, o que gerou lesões do tipo nodular eritematoso, 120 dias depois das inoculações no animal. Neste momento, foi possível identificar novamente amastigotas do parasita em uma das lesões do animal, porém, mais uma vez, nenhum deles respondeu ao teste de Montenegro.

Finalizando as observações, foi constatada no quinto mês das infecções, progressiva diminuição das lesões no animal 1, cuja resolução completa se deu em torno de 150 dias após as inoculações. Quanto à reação intradérmica de Montenegro, esta manteve-se inalterada até este momento e, também, até 180 dias depois das inoculações, ocasião em que foi feita a última avaliação nos animais, na qual todos permaneciam assintomáticos.

DISCUSSÃO

Conforme referido, inicialmente, o presente trabalho constitui uma primeira etapa de um estudo mais amplo, que visa abordar a patogênese da leishmaniose cutânea produzida experimentalmente no primata *C. apella*, na tentativa de obter uma noção mais precisa sobre a patogênese da doença ocorrida no

homem. Desse modo, após inocular o primata *C. apella* com 3×10^6 de promastigotas da *L. (V.) braziliensis* e da *L. (L.) amazonensis*, pareceu razoável admitir que os resultados observados foram bastante satisfatórios, no que tange ao objetivo pretendido nesta fase inicial do estudo. Assim, vejamos: quanto às infecções produzidas pela *L. (V.) braziliensis*, verificou-se que o período de incubação das infecções foi de 15 à 20 dias após as inoculações do parasita, ocasião em que surgiram as primeiras manifestações de lesão (áreas focais de eritema) nos animais, fato este que se apresentou de forma coincidente ao período de incubação observado na infecção humana. Ao fim de 30 dias, eram vistas então lesões de aspecto pápulo-eritematoso, bastante semelhantes à lesão cutânea observada na fase inicial da doença no homem. No segundo mês, estas lesões evoluíram para nódulos eritematosos, que ulceraram espontaneamente durante o terceiro mês das infecções, de modo que, 90 dias após as inoculações, o quadro lesional era francamente ulcerado, lembrando, igualmente, a úlcera leishmaniótica observada nesta fase da doença no homem. Em seguida, notou-se a partir do quarto mês, o início da reparação das lesões ulceradas, o que gerou a cura das lesões em um dos animais, cinco meses após as inoculações. Em outros dois, após seis meses, noutro, após sete meses e, no último, após dez meses de inoculado. Dessa forma, esta seqüência de eventos, foi outro elemento que serviu para avaliar a capacidade individual de resposta dos animais perante um mesmo inóculo da *L. (V.) braziliensis*, o que, certamente, poderá ser de grande valor na interpretação do processo de cura da lesão humana, quando estes resultados forem confrontados com aqueles referentes à histopatologia e à imunopatologia dessas infecções.

Quanto ao parasitismo nas lesões, foi visto que esteve presente nos cinco animais, até 90 dias após as inoculações, momento no qual o quadro lesional era francamente ulcerado, o que, aliás, está plenamente de acordo com nossas observações sobre a leishmaniose cutânea humana, uma vez que é comum demonstrar amastigotas do parasita em lesões ulceradas de pacientes, com igual tempo de evolução. Entretanto, logo em seguida, notou-se que, concomitantemente ao início da reparação das lesões, a carga parasitária nos tecidos foi reduzida, de modo que 120 dias após as inoculações, a presença do parasita só foi confirmada nos dois animais (1 e 3) que curaram as lesões mais tardiamente e, por fim, até 180 dias, apenas naquele (1) que curou depois de dez meses de inoculado.

Por outro lado, no caso das infecções produzidas pela *L. (L.) amazonensis*, pode-se dizer que os resultados obtidos até o segundo mês das infecções, pareceram semelhantes aqueles provocados pela *L.*

(V.) *braziliensis*, uma vez que o período de incubação visto em quatro dos cinco animais foi de 20 dias após as inoculações. com exceção do *Cebus* 1. no qual as lesões iniciais (áreas focais de eritema) só apareceram cerca de 75 dias depois dos inoculos. Em seguida, a evolução das lesões também gerou papulas-eritematosas ao fim de 30 dias, assim como, lesões nodulares após dois meses, porém, a partir de então, notou-se marcante diferença no curso das infecções, visto que não foi observada ulceração espontânea desses nódulos, que regrediram rápida e simultaneamente nos quatro animais ao fim de 90 dias, quando também não foram mais detectadas amastigotas do parasita na pele dos animais, sugerindo, com isto, a possibilidade de uma maior resistência do *C. apella* a infecção pela *L. (L.) amazonensis*.

Em relação aos testes intradérmicos de Montenegro, os resultados relativos aos animais infectados com a *L. (V.) braziliensis*, não foram muito diferentes daqueles registrados anteriormente (Silveira e col¹¹), quando da infecção experimental do *C. apella* pela *L. (V.) lainsoni*. No referido trabalho, os autores verificaram que, dos cinco espécimens desse primata infectados com a *L. (V.) lainsoni*, somente três mostraram reatividade ao teste de Montenegro, fato que foi inicialmente demonstrado cerca de 90 dias após as inoculações do parasita. Verificaram, ainda, que os testes persistiram positivos até 150 dias após as inoculações desses animais, com exceção de um deles que, nesta ocasião, não mais respondeu ao teste. No trabalho presente, foi visto que, dos cinco animais infectados com a *L. (V.) braziliensis*, apenas dois (2 e 4) responderam ao teste, cujas reações foram detectadas 60 dias após as inoculações do parasita. Entretanto, notou-se em seguida, que a reatividade expressa pelos animais foi de curta duração, haja visto que somente o *Cebus* 2 exibiu reação quando testado ao fim de 90 dias, o que não mais ocorreu depois de 120 dias das inoculações. Quanto aos animais infectados com a *L. (L.) amazonensis*, os resultados obtidos foram 100% negativos nos cinco animais, fato este que, possivelmente pode ser explicado, face ao rápido processo de cura das lesões nos animais, impossibilitando o completo desenvolvimento da resposta de hipersensibilidade. Não obstante, faz-se oportuno salientar, a alta prevalência (\pm 60%) de testes negativos verificados em pacientes com leishmaniose cutânea localizada, causada pela *L. (L.) amazonensis*⁵. Desta forma, os resultados deste trabalho, somados àqueles previamente referidos (Silveira e col.¹¹), vêm, sem dúvida, consubstanciar as limitações do uso do teste de Montenegro, especialmente em trabalhos desta natureza, embora existam indicações sugerindo o estabelecimento de hipersensibilidade tardia, evidenciada através do teste

de Montenegro, no *Aotus trivirgatus* infectado pela *L. (V.) braziliensis*¹⁷.

Em conclusão, os achados descritos neste trabalho, permitem dizer que ficou confirmada a infectividade do *C. apella* à *L. (V.) braziliensis* e à *L. (L.) amazonensis*, as quais produziram, nesse primata, quadro lesional que, sem dúvida, vem reforçar a indicação desse animal, como um modelo experimental da leishmaniose cutânea causada por estes parasitas.

SUMMARY

As a means of assessing the usefulness of the monkey *Cebus apella* as an experimental model for the study of cutaneous leishmaniasis, 5 of these animals were inoculated intradermally at 8 sites along the tail with 3×10^6 promastigotes of *L. (V.) braziliensis*, while a further 5 monkeys received similar inoculations with 3×10^6 promastigotes of *L. (L.) amazonensis*. Following the inoculations, weekly examinations and monthly biopsies showed evolution of resulting skin lesions to be as follows: a) *L. (V.) braziliensis*: lesions were first visible 15-20 days post-inoculation (p.i), and at 30 days they were clearly of an erythematous-papular nature, which assumed a nodular form at 60 days; after 3 months a spontaneous ulceration of these lesions was noted and, at 4 months, the initiation of healing. In one animal total healing was apparent 5 months p.i; in two others at 6 months, in another monkey after 7 months, and in the last animal at 10 months p.i. Amastigotes were demonstrated in smears from the lesions of all monkeys up to 90 days p.i; up to 120 days in two animals, and at 180 days p.i. in the monkey which showed resolution of the lesions after 10 months. b) *L. (L.) amazonensis* lesions were first apparent after 20 days p.i; at 30 days they were of an erythematous-papular nature, developing into nodules at 60 days. From the third month of infection onwards, however, the lesions diminished rapidly and, at 90 days p.i. amastigotes were no longer detectable in the skin. With regards to the Montenegro (leishmanin) skin tests, only two of the monkeys (infected with *L. (V.) braziliensis*) gave positive reactions, at 60 and 91 days p.i. These results confirm the susceptibility of *C. apella* to infections with both *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis*, and support previous indications that this monkey may serve as a useful experimental model for the study of cutaneous leishmaniasis caused by these parasites.

Key-words: Experimental cutaneous leishmaniasis. Primate *Cebus apella*. *Leishmania* (V.) *braziliensis*. *Leishmania* (L.) *amazonensis*.

AGRADECIMENTOS

Prestamos nossos agradecimentos ao Sr. Manoel Carmelino, pela dedicação no manejo dos animais. Aos Drs. José Augusto Muniz e Marco Aurélio Malacco, veterinários do Centro Nacional de Primatas, pelo apoio técnico durante este trabalho. Aos Srs. Antonio F. P. Martins e Raimundo da C. Mendonça, pelo auxílio na coleta de material dos animais. Ao Sr. Aluizio Figueiredo, pelo serviço fotográfico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Christensen HA, Vasquez AM. Susceptibility of *Aotus trivirgatus* to *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30:54-56, 1981.
2. Cuba-Cuba, Vexenat JA, Netto E, Marsden PD, Magalhães A, Barreto AC, Thiago de Melo M. *Callithrix* sp. (*Callitricidae*) e *Leishmania braziliensis braziliensis*. Tentativas do desenvolvimento de um modelo de leishmaniose mucosa experimental. In: Resumos do XXII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belo Horizonte, p. 80, 1986.
3. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: XII. Observations on cross-immunity in monkeys and man infected with *Leishmania mexicana mexicana*, *L. m. amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis*, *L. b. guyanensis* and *L. b. panamensis*. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, London 80:29-35, 1977.
4. Lainson R, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EA, Souza AA, Silveira FT. Isolation of *Leishmania* from monkeys in the Amazon region of Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82: 231, 1988.
5. Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR, Ryan L, Povoas MM, Ishikawa EAY. A *Leishmania* e as leishmanioses. In: Instituto Evandro Chagas; 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. Fundação Serviços de Saúde Pública, Belém, p. 83-124, 1986.
6. Lujan R, Chapman Jr WL, Hanson WL, Dennis VA. *Leishmania braziliensis*: Development of primary and satellite lesions in the experimentally infected owl monkey, *Aotus trivirgatus*. *Experimental Parasitology* 61: 348-358, 1986.
7. Lujan R, Dennis VA, Chapman Jr WL, Hanson WL. Blastogenic responses of peripheral blood leukocytes from owl monkeys experimentally infected with *Leishmania braziliensis panamensis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35: 1103-1109, 1986.
8. Medina R. Leishmaniasis experimental en animales silvestres. *Dermatologia Venezolana* 5:91-119, 1966.
9. Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil: X. Some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 69:325-335, 1975.
10. Silva AA. Susceptibilidade do sagüis do gênero *Callithrix* Erxleben, 1777 (Primates, Callitricidae) e alguns protozoários parasitas do homem. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1974.
11. Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Garcez LM, Souza AA, Braga RR, Ishikawa EAY. Leishmaniose cutânea experimental: I - Sobre a susceptibilidade do primata *Cebus apella* (Cebidae) à infecção pela *Leishmania (Viannia) lainsoni* Silveira, Shaw, Braga & Ishikawa 1987. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 22: 125-129, 1989.
12. Walton BC, Shaw JJ, Lainson R. Observations on the *in vitro* cultivation of *Leishmania braziliensis*. *The Journal of Parasitology* 63: 1118-1119, 1977.