

## LEISHMANIA M(MISTERIOSA): PROVÁVEL NOVA ESPÉCIE OCORRENTE EM GOIÁS, ISOLADA DO SANGUE PERIFÉRICO DE CHAGÁSICO CRÔNICO\*

William Barbosa \*\*, Ana Cândido Czerewuta \*\*\*, Osvaldira Seabra de Oliveira \*\*\*  
Fátima M. M. Barbosa \*\*\*\*, Goiás da Veiga Jardim \*\*\*\*\*  
Joana Rosa de Mendonça \*\*\*\*\* e Raquel Lopes de Oliveira \*\*\*\*\*

---

### RESUMO

Descrevemos o isolamento ocasional de uma *Leishmania* do sangue periférico de um paciente chagásico crônico em Goiás, durante a tentativa de isolamento do *T. cruzi* em meio LIT.

O estudo taxonômico dela sugere tratar-se de uma nova espécie, ou no mínimo uma subespécie do grupo da *Leishmania Gasparvianai*.

---

### INTRODUÇÃO

Das *Leishmanias* ocorrentes no Novo Mundo responsáveis por Leishmaniose tegumentar: cutânea ou cutâneo-mucosa, presumia-se que em Goiás ocorresse a *L. brasiliensis brasiliensis* em função dos numerosos casos de espúndia observados(1) e também a *L. b. guayanensis* ou até a *L. panamensis* em virtude de aspectos clínicos com úlceras múltiplas ou "pean-bois" verificados em razoável número de pacientes. A partir de 1975 se verificou, inicialmente, em doentes do Centro-Oeste e logo depois da Região Norte,

indivíduos com formas clínicas sui-generis, que nos induziu ao estudo mais sistematizado do ponto de vista taxonômico, o que nos levou, durante a ocorrência de um surto epidêmico na Fazenda Santo Antônio-MT (12) a suspeitar da existência de uma provável nova espécie de *Leishmania* (7), o que veio a se confirmar mais recentemente, pelo isolamento de mais 9 amostras desta mesma espécie, que foram estudadas sob os diversos aspectos da sistemática (8, 10) e que se encontra em fase de publicação com o nome de *L. Gasparvianai*. Por outro lado, a constatação em um dos casos de espúndia do

---

\*Trabalho realizado com apoio financeiro do CNPq e OMS - Programa especial para treinamento e pesquisa em Doenças Tropicais.

\*\*Prof. Titular - Departamento de Medicina Tropical - UIGV - IPTSP-UFG.

\*\*\*Profas. Assistentes - Departamento de Medicina Tropical -UIGV-IPTSP-UFG.

\*\*\*\*Estagiária, bolsista CNPq

\*\*\*\*\*Técnicos de laboratório do Departamento de Medicina Tropical - UIGV-IPTSP-UFG.

isolamento de *Leishmania* identificada sob aspecto biológico – infecção experimental em animais, cultura, métodos enzimático (Zimodema) e anticorpos monoclonais como *Leishmania mexicana amazonensis* (9) tornou-se evidente também a existência desta espécie entre nós o que encontra respaldo no recente achado de *Lutzomyia flaviscutellatus* no Município de Cavalcante (11).

Esses aspectos da epidemiologia da leishmaniose em Goiás deveu-se à execução de um estudo sistematizado das *Leishmanias* isoladas, o que vem se intensificando de 1980 para cá.

Este programa de trabalho, visando o conhecimento das espécies, de leishmanias ocorrentes em Goiás vem se realizando, tentando-se o isolamento e identificação das leishmanias através de seus caracteres biológicos: como curvas de crescimento em diversos meios, infectividade para animais de laboratório (hamster e camundongos), comportamento clínico em hamster, exigências culturais – como facilidade do isolamento e velocidade do crescimento em meios “estandardizados” como NNN e RQ (2, 6) sensibilidade “in vitro” a drogas (4, 5), aspectos imunológicos relacionados às cepas ou espécies conhecidas; aspecto de seu estudo bioquímico como análise do zimodema com 6 enzimas e algumas vezes do esquizodema com 3 enzimas, estudo KDNA e anticorpos monoclonais, bem como localização no tubo digestivo do vetor e principalmente aspecto clínico da doença nos pacientes em que são isolados os parasitos, bem como comportamento frente aos macrófagos peritoneais de camundongos. Aspectos todos estes que são, em parte, estudados com ajuda e intercâmbio de vários Centros de Pesquisa, no Brasil e Ex-

terior, sem o que se tornaria impossível este trabalho.

“Pari passu” ao desenvolvimento deste trabalho acima referido, ocorria em nosso laboratório a tentativa também do isolamento de *T. cruzi* em pacientes chagásicos de formas clínicas conhecidas, na fase crônica da doença, após tratamento da doença com quimioterápicos, como controle de cura, ou em pacientes sorologicamente positivos, de fase aguda desconhecida.

Ocorreu que em uma série consecutiva de 250 pacientes chagásicos, de um deles, isolamos tripanosomatídeo do sangue periférico que identificamos pelos parâmetros acima descritos como uma possível nova espécie de leishmania encontrada em Goiás, este o motivo desta comunicação.

## MATERIAL E MÉTODOS

Consta a casuística de uma *Leishmania sp* isolada no 20º dia, do sangue periférico de um paciente chagásico, de forma cardíaca, na sua fase crônica, oligossintomática compensada, em que se buscava isolar o *T. cruzi* em meio LIT, usando dezesseis tubos com 5ml de meio, inoculados com sangue venoso colhidos com EDTA e que foram incubados a 28°C (3). Após o isolamento, em quatro, dos dezesseis tubos, a leishmania foi mantida em dois tubos de LIT e os promastigotas foram semeados em meio RQ – novo meio desenvolvido em nosso laboratório (2, 6) e no meio 199 mais SFB a 30%, a partir de 2 meses do isolamento, tão logo se estabilizou. Foi também inoculada em dois hamsters e dois camundongos “Swiss star”, por vias subcutânea e intraperitoneal, 2 e 1 mês respectiva-

mente, após o isolamento, e posteriormente em várias oportunidades, em seis hamsters e dez camundongos da mesma linhagem.

Também realizamos curvas de crescimento em meios RQ e 199 mais SFB a 30%, durante a fase de adaptação da leishmania e após a adaptação em meios LIT e RQ.

Do seu estudo biológico constou a verificação da transformação de promastigota em amastigota, em meios de cultura acelular RPMI a 32°C e 35°C bem como no meio 199 mais SFB a 30% às mesmas temperaturas, bem como meio RQ mais soro de galinha, a 35°C e RQ mais soro de pato, bem como RPMI mais soro de galinha a 20%.

As formas amastigotas de 6 dias, mantidas em RPMI foram postas à temperatura de 26°C após esse tempo em três meios RPMI, RQ e 199 mais SFB a 30%.

Também foi tentado a infecção do macrófago do sangue periférico de um homem sadio e um leishmaniótico e de macrófagos de peritônio de camundongos, em culturas de 2 dias, tanto em tubo capilar, livres, como fixados em lâminulas, que foi a usada.

As culturas de macrófagos de peritônio de camundongos foram infectados com inóculos conhecidos, da ordem  $7 \text{ a } 8 \times 10^6$  parasitas por ml, das leishmanias *L. Gasparvianai* – Spp. nov. (amostras Heleno e Isaac), *L. mexicana amazonensis*, cultura recente de paciente com forma de leishmaniose cutânea difusa – e provavelmente de *L. brasiliensis brasiliensis* (amostra Hildeu), visando observar o comportamento dessas leishmanias nessas culturas a partir de 24 horas até 72 horas, (o máximo que conseguimos manter os macrófagos em boas condições com

a técnica usada em dissecador e produção de Co2 por chama). Verificamos a fagocitose, qualitativamente, a reprodução intracelular e sua velocidade; após experimento preliminar que demonstrou boa reprodutibilidade do método.

Submetemos esta leishmania “in vitro” à ação de derivados imidazólicos, glucantime e anfotericina B, tanto os promastigotas quanto as “amastigoides” para testar sua susceptibilidade às drogas e também a submetemos à ação de antifúngicos, normalmente, usados para purificar nossas culturas de leishmanias – o tiabendazol e o bicromato de potássio, visando verificar sua tolerância e comprometimento através de curvas de crescimento e pelo uso do parasita como elemento figurado nas reações de IFI (imunofluorescência indireta).

O estudo imunológico constou inicialmente em se verificar a comunidade antigênica com outras leishmanias conhecidas através de reações de imunodifusão em gel e pela imunofluorescência indireta.

## RESULTADOS:

De nossa observação pessoal verificamos que dos animais inicialmente infectados em nosso laboratório – um hamster e um camundongo, morreram sem serem examinados microscopicamente, ao 7o. e 8o. mês de inoculados, respectivamente, macroscopicamente apresentavam estarem sadios. Dos dois animais restantes sacrificados após um ano de inoculação, aproximadamente, 10.02.83, o camundongo apresentava sinais de doença – pelo arrepiado, protusão abdominal, inapetência e palidez; ao ser aberto apresentava líquido na cavidade peritoneal escasso, um tumor cístico de “sangue” subdiafragmático e um tumor sólido esbranquiçado, tinha questionável aumento de

baço e fígado. Foram colhidos para exame direto e histológico, o fígado, baço, pulmões, rins, intestinos e as massas tumorais.

Das impressões, em lâminas, do tumor hemático, coradas pelo Giemsa verificou-se elementos "tripanosômicos", três ou quatro, em uma das impressões em lâmina, identificados como promastigotas - FIG. 1, cortes histológicos corados pelo HE dos tumores e de todas as vísceras exaustivamente examinados foram negativos para parasitos - os tecidos dos tumores não foram identificados

e não houve sinais importantes inflamatórios ou de qualquer natureza ao nível das vísceras, senão discretos infiltrados inflamatórios inespecíficos e hiperplasia do SRE no fígado e baço.

Os subinóculos das vísceras - fígado e baço, contudo, em meios NNN, LIT, 199 mais SFB e RQ, foram positivos no 11º dia no LIT e RQ. (Fig. 2)

Todas as tentativas de infecção com promastigotas provindos da cepa "priceps", quanto do reisolado do tumor hemático e fígado do camundongo foram sempre negativos.

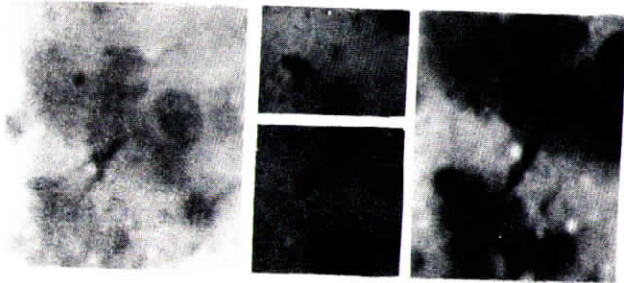


FIG. 1 - Formas de promastigotas encontradas em cisto intraperitoneal de camundongo - 1 ano após a infecção de *Leishmania M.*

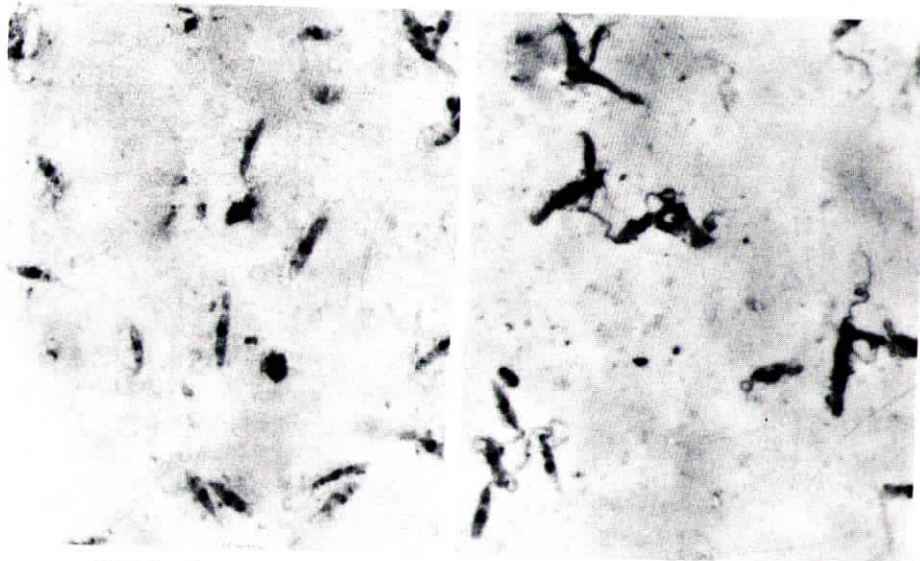


FIG. 2 - Formas grosseiras de promastigotas em cultivo de *Leishmania M.*

O crescimento da leishmania foi abundante em LIT desde o isolamento, teve um bom crescimento no RQ e crescimento abundante, ótimo também, no meio 199 mais SFB (10 a 30%); quando na fase de adaptação obtivemos seu crescimento máximo -  $62 \times 10^4$  no RQ e  $102 \times 10^4$  no meio 199 mais SFB a 30% no 15º dia; e quando adaptada no 21º repique teve seu crescimento máximo  $2 \times 10^6$  em ambos os meios no 5º dia. Posteriormente, após sucessivos repiques, no 6º dia, obtivemos o máximo crescimento no 8º dia,  $9 \times 10^7$  no meio LIT e  $5 \times 10^7$  no meio RQ.

Obtivemos transformação de forma promastigota de *Leishmania M (misteriosa)* para amastigota em meios RPMI mais SFB e 199 mais SFB de ordem de 90 a 100% no 4º e 5º dias respectivamente; a 32°C e a 35°C. Obtivemos transformação de 92 e 98% de promastigota para amastigota no meio RQ e RPMI mais soro de galinha ou de pato a 20% no 5º dia de incubação. (Fig. 3)

As culturas de amastigotas de 6 dias em RPMI a 32°C colocadas à temperatura, mais baixa: 26°C, em três meios RPMI - com 3 dias apresentavam promastigotas lentos, com 6 dias poucos e lentos; RQ - com 3 dias viam-se promastigotas ativos, com 6 dias muito abundantes e ativos, o mesmo ocorrendo no meio 199 mais SFB a 30% que também apresentavam promastigotas ativos e abundantes.

A tentativa de infecção de macrófagos humanos de dois pacientes: um sadio e um leishmaniótico falharam.

Ao contrário, culturas de macrófagos de peritônio de camundongos aderidos em lamínulas observados até 72 horas infectaram-se. Culturas de macrófagos expostos à *Leishmania M (misteriosa)* observados de 24 a 72 horas, mostraram-se suscetíveis de infecção, mas apresentaram no máximo dois amastigotas no seu interior - de cada 100 macrófagos contados, 80% estavam infectados e houve um índice de 95 amastigotas para 100 macrófagos (Fig. 4). Esses dados quando compa-

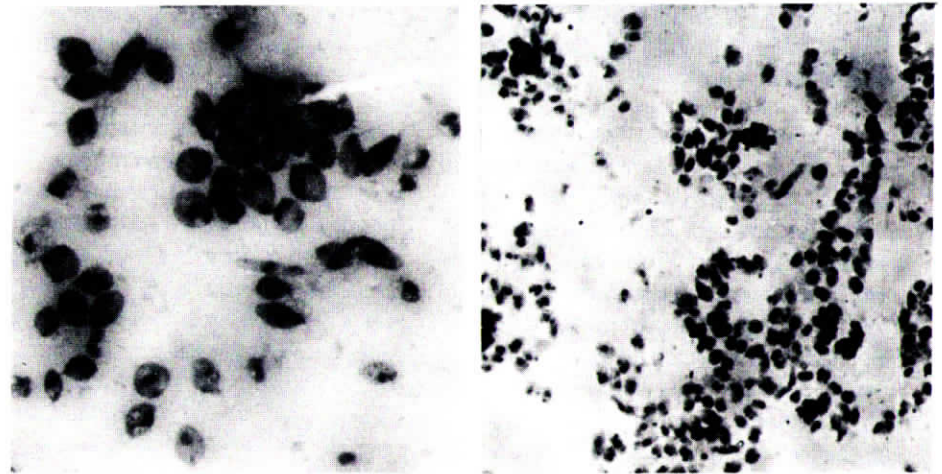


FIG. 3 - Formas amastigotas e esfomastigota de cultivo em RQ + Soro de Galinha no 4o. dia

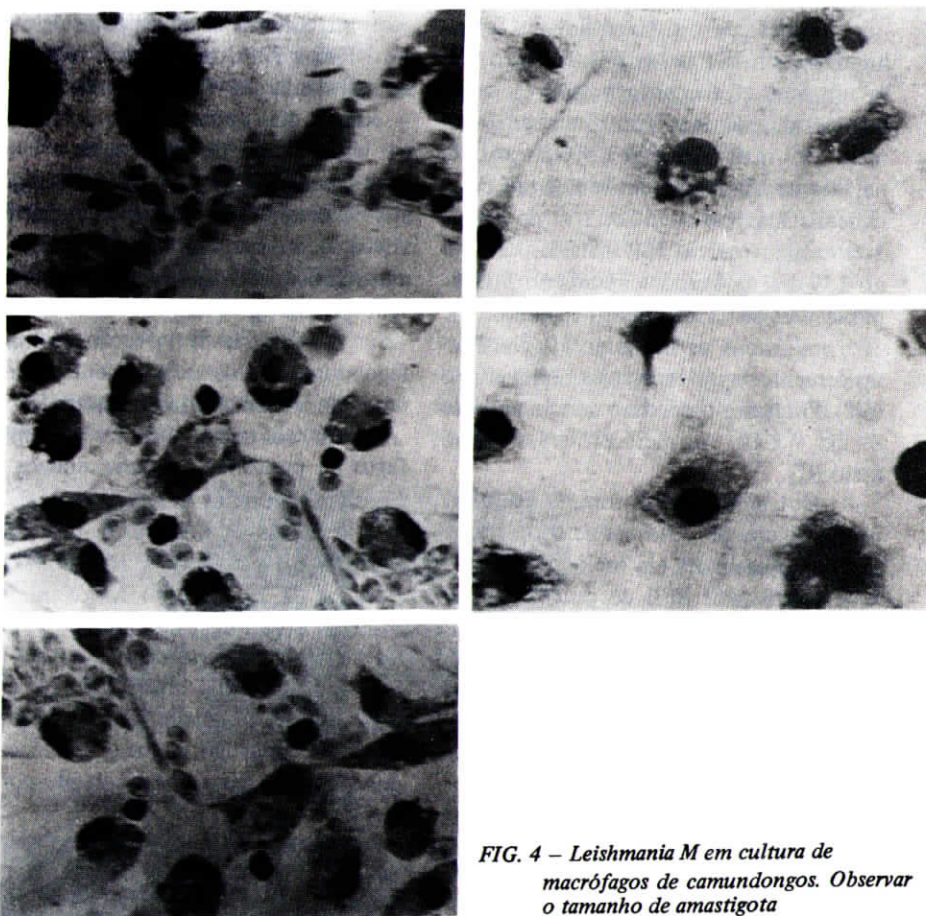


FIG. 4 – *Leishmania M* em cultura de macrófagos de camundongos. Observar o tamanho de amastigota

rados com *Leishmanias* de outras espécies, por exemplo, à cepa Hildeu, tido como *L. brasiliensis* (ainda não tipificada), mostrava no mesmo período 364 amastigotas para 100 macrófagos; a cepa de *L. mexicana amazonensis* demonstrava intensa capacidade de fagocitose e multiplicação intracelular, enquanto que as cepas Heleno e Isaac, da *L. Gasparvianai*, só se observou a infecção de 1 em 100 macrófagos. (Fig. 5A, B e 6).

Os testes realizados com drogas “in vitro” visando observar sua sensibilidade a

diversos fármacos, demonstrou o seguinte: observou-se resistência aparente “in vitro” para o Glucantimé nas concentrações de  $5 \mu\text{g/ml}$  para a forma promastigota e até  $0,625 \mu\text{g/ml}$  para amastigotas; respostas discretas ao ketoconazol simples e melhor para o ketoconazol hidrolizado, enquanto a Anfotericina B foi ativa para ambas as formas até  $0,001 \mu\text{g/ml}$  (4, 5).

Respostas ao estudo imunológico realizados em soro de 11 pacientes de leishmaniose tegumentar usando como

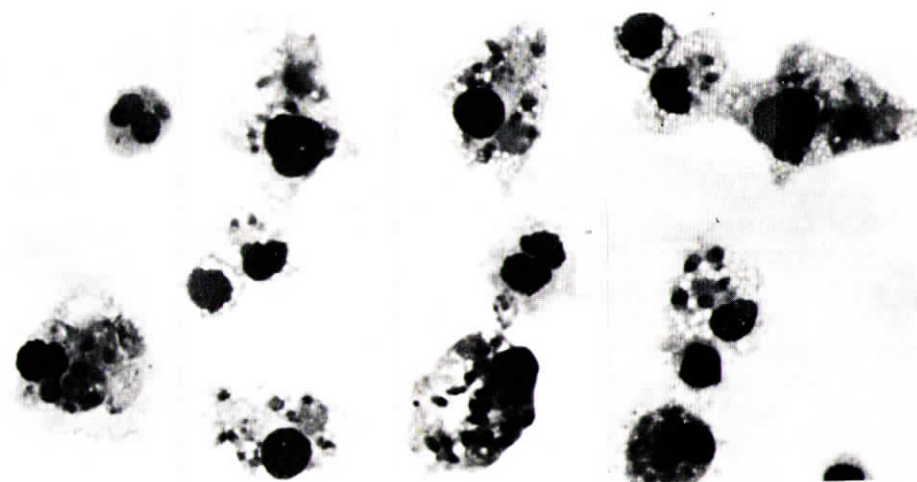


FIG. 5A – *Leishmania* de espécie não determinada Hildeu, supostamente *brasiliensis*, nos macrófagos de camundongos

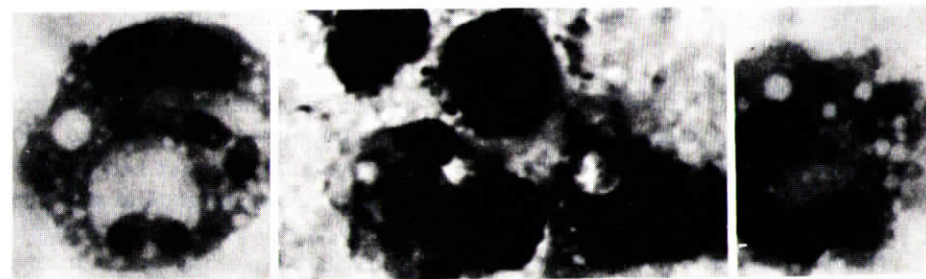


FIG. 5B – *Leishmania* da cepa “Heleno-Isac” – *L. gasparvianai* spp nov. Observar a presença de grandes vacúolos, como os descritos na *Leishmania mexicana amazonensis*.



FIG. 6 – Macrófago de *Leishmania mexicana*. Comparar com os macrófagos 5B e com L. M Fig. 4

elemento figurado a *Leishmania M (misteriosa)*, crescidos em dois meios diferentes o LIT, no qual a *Leishmania M (misteriosa)* foi isolada e o meio RQ – mostrou reações praticamente idênticas que variaram de 1/20 e 1/320; com o antígeno da *Leishmania Gasparvianai* spp. nov (8) os títulos foram ligeiramente maiores em uma diluição, variando de 1/80 a 1/640; com antígeno de *L. donovani* os títulos foram iguais ao da *Leishmania M (misteriosa)* crescidos respectivamente em LIT ou RQ.

A análise de 10 soros de calazar contra antígenos de *Leishmania donovani*, *Leishmania M (misteriosa)* e *Leishmania Gasparvianai* (nova espécie) crescidos em LIT ou RQ, demonstrou títulos mais elevados em uma diluição com o antígeno homólogo.

O estudo de 8 soros de pacientes com leishmaniose tegumentar e de 8 soros de pacientes com calazar contra antígeno solúvel de *Leishmania M (misteriosa)* – foram negativos com os soros de leishmaniose tegumentar na imunoprecipitação em gel de agarose a 1%; dos 8, de calazar, 4 foram positivos neste teste inclusive 2 que haviam sido negativos na reação de imunofluorescência.

Das amostras de leishmania encarninhadas para outros pesquisadores só recebemos resposta por escrito da UnB – (Universidade de Brasília), do Dr. Air Colombo, que nos informou: a) ser a *Leishmania* classificada como suprapylaria pelo teste realizado com *Lutzomya longipalpis* (flebotomos alimentados através de membrana); b) não ter infectado hamster e c) pela caracterização com anticorpos monoclonais ser negativo para *Leishmania brasiliensis brasiliensis*, *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania mexicana amazonensis*;

Dr. Zilton Andrade em comunicação pessoal relatou que o protozoário não infectou animal e que crescia abundantemente em meios de cultura; Dr. Gabriel Grimaldi confirmou os dados do Dr. Air Colombo quanto aos anticorpos monoclonais em relação às leishmanias conhecidas, mas supõe que se trate de *Leishmania Gasparvianai*, pelo exame de anticorpos monoclonais; os Drs. Laison e Dr. Shaw mencionaram o estranho desenvolvimento do parasita em meios de cultura, crescendo rapidamente e confirmaram os dados relativos a diferenças com as leishmanias conhecidas em relação aos antígenos monoclonais e estudo enzimático, sugeriram até a hipótese de se tratar de outro gênero. Não conseguiram também infecção de animais de laboratório.

Ainda quanto ao aspecto puramente morfológico todos foram unânimes em achar a leishmania muito grande tanto na sua forma promastigota quanto à forma amastigota. O Professor Leonidas Deane, visitando nosso laboratório teve oportunidade de vê-la e teve a impressão de que a mesma lhe pareceu “maior mesmo do que a *L. Euriettii*”.

#### DISCUSSÃO

Por tudo que foi feito e dito a *Leishmania M (misteriosa)* (HOM-BR-82-M) não me pareceu ser idêntica à *Leishmania Gasparvianai*, pois ela foi isolada do sangue, em um homem sem nenhum sinal clínico de leishmaniose, cujo o único dado epidemiológico relacionado à leishmaniose foi a coincidência de ter um cão doente em sua Fazenda à época do isolamento, enquanto a *Leishmania Gasparvianai*, ocorreu em paciente de lesão cutânea ou cutâneo-mucosa, com isola-

mento da lesão. A *Leishmania Gasparvianai*, nunca infectou animal de laboratório em vários experimentos realizados por nós mesmos, Prof. Zilton Andrade e seu grupo na Bahia; Prof. Air Colombo e seu grupo em Brasília; Prof. Laison e cols. em Manaus, enquanto que a *Leishmania M (misteriosa)* apresentou uma infecção criptica (sem formas de amastigotas nos tecidos) em camundongos na 1a. inoculação, embora, aparentemente apresentasse perda da sua infectividade já na 2a. passagem. Além do mais, morfológicamente a diferencia da *Leishmania Gasparvianai*,

por apresentar uma forma amastigota bem maior, penetrar com muito maior avidéz os macrófagos de camundongos, crescer exuberantemente nos meios de cultura. A análise de anticorpos monoclonais e estudo enzimático segundo Laison, comunicação pessoal, mostrou não haver identidade com nenhuma leishmania conhecida, enquanto que a informação obtida de Gabriel Grimaldi sugere que a mesma seja provavelmente idêntica à *Leishmania Gasparvianai*. Voltando ao aspecto morfológico, Laison de início aventou até a possibilidade de se tratar de tripanoso-

#### QUADRO I

#### QUADRO SINÓPTICO RELATIVO AOS DADOS TAXONÔMICOS DA *LEISHMANIA M*

- A – Isolada de sangue periférico de paciente sem leishmaniose (chagásico crônico da forma cardíaca compensada).
- B – Ocorrente em zona endêmica de chagas com casos ocasionais de Leishmaniose tegumentar.
- C – Isolado em meio LIT – 20º dia – Cresce bem, praticamente, em todos os meios usados.
- D – Em função da temperatura 32º a 35º C e fatores existentes no SFB – soro de galinha e soro de pato, apresenta forma amastigota precocemente (2 a 5 dias) em alta percentagem até 100%, nos meios LIT, RQ, RPMI e 199.
- E – Retorna facilmente à forma flagelada quando colocada a 26ºC em meio líquido, LIT fresco.
- F – É fagocitada por macrófago do peritônio de camundongos em proporção de 95/100, não se replicando com facilidade, apenas 2 parasitas, no máximo, por macrófago.
- G – Demonstra certa identidade antigênica para com as leishmanias patogênicas para o homem, mais próxima do complexo *Donovani*.
- H – Não infecta hamster – infectou camundongo Balb/c produzindo lesão tardia (1 ano) em que não se encontrou amastigota no tecido, raros promastigotas em um cisto – mas foi capaz de ser recuperada no 11o. dia em cultivo. Cultivos não patogênicos a partir do 1o. sub-inóculo.
- I – Anticorpos monoclonais incompatíveis com os de todas as leishmanias do Velho e Novo Mundo, mas próximos à *Leishmania Gasparvianai*.
- J – Zimodema característico.
- K – Ao teste com o vetor *Lutzomya longipalpis* agrupa-se no grupo Suprapylaria.

matéio de gênero diferente da *Leishmania*, com o que aliás não concordamos. Estudos relativos aos antígenos policlonais revelou que os mesmos apresentam frações comuns com leishmanias indutoras de doença cutâneo-mucosa, tanto quanto de leishmanias causadoras de doença visceral, em ambos, muitas vezes produzindo respostas com títulos maiores do que os obtidos com os antígenos homólogos.

Como a *Leishmania Gasparvianai*, a *Leishmania M (misteriosa)* difere por todos os parâmetros taxonômicos conhecidos das outras leishmanias do Novo e Velho Mundo.

A *Leishmania M (misteriosa)* só foi infectante quando recém-isolada, produzindo infecção em camundongo, anômala, onde se encontra promastigota no tecido. Mesmo na ausência de formas amastigotas ou qualquer outra nos tecidos, se obteve cultura a partir desta primo infecção criptica.

Fato que não se reproduziu após várias tentativas, parecendo que o parasita perdeu sua patogenicidade.

No vetor, por infecção experimental foi colocada no grupo *Suprasyllaria*. Quadro I.

## SUMMARY

An occasional isolation of a *Leishmania* is described from peripheral blood of chronic chagasic patient of Goiás, during a tentative of isolation of *T. cruzi* in LIT medium. Its taxonomic study suggests to treat of a new species, or at least, a sub-species of the *Leishmania Gasparvianai* group.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - BARBOSA, W.; BORGES, P. C.; & REIS, M. - Informe preliminar sobre a leishmaniose tegumentar americana em Goiás. Rev. Goiana de Medicina, 11(1): 1965.
- 02 - BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A.C.; OLIVEIRA, O. S. & OLIVEIRA, R. L. - Novo meio líquido autoclavável isento de sangue, para isolamento primário de leishmanias de lesões tegumentares: 1 - sua potencialidade no estudo da biologia dos tripanosomatídeos. Rev. Pat. Trop., 13(1): 1984.
- 03 - - - - - Tentativa de isolamento primário de "T. cruzi" de pacientes crônicos de doenças de chagas por hemocultura - Agentes bloqueadores. Rev. Pat. Trop. 12(2): 1983.
- 04 - BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A. C. & TELLES Fº, F. Q. - Tentativa simplificada do uso de "Screening" de drogas para *Leishmania*. 1 - Promastigota. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 19, Rio de Janeiro, 1983, Anais, p. 66-67.
- 05 - - - - - Tentativa simplificada do uso de "Screening" de drogas para *Leishmania*. 2 - Amastigota. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 19, Rio de Janeiro, 1983. Anais. p. 67.
- 06 - BARBOSA, W.; OLIVEIRA, R.L. & CZEREWUTA, A.C. - Novo meio de cultura monofásico, autoclavável, sem sangue, para cultura de *Leishmanias* da região Centro-Oeste, Brasil. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 19, Rio de Janeiro, 1983. Anais. p. 56.
- 07 - BARBOSA, W.; SOUZA, M. C. M.; SOUZA, J. M.; RASSI, D. M.; GERAIS, B. B. & OLIVEIRA, R. L. - Note on the classification of the "*Leishmania* sp" responsible for cutaneous leishmaniasis in the East Central Region of Brazil. In: Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 70: 389-399, 1976.

- 08 - BARBOSA, W.; TELLES Fº, F. Q.; MORMEN, H.; PACHECO, R. S. & GRIMALDI JÚNIOR, G. - A new species of *Leishmania* responsible for cutaneous leishmaniasis in the west Central Region of Brazil. In: CONGRESSO DA SOC. BRAS. PARASITOLOGIA e CONGRESSO LATINO AMERICANO DE PARASITOLOGIA, 2 São Paulo, 1983.
- 09 - BARRAL, A.; PETERSEN, E. A.; SACKS, D. L. & NEVA, F. A. - Late metastatic leishmaniasis in the mouse. Am. J. Trop. Med. Hyg., 32(2): 277-285, 1983.
- 10 - GRIMALDI JR., G.; McMAHON-PRATT, D. ; TELLES Fº, F. Q. & BARBOSA, W. - Production of monoclonal antibodies to leishmania isolated in Brazil not reacting with available monoclonals specific for other new world *Leishmania*. In: III JORNADA CIENTÍFICA DA FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, Anais, 396. 1985.
- 11 - LUSTOSA, E. S.; NEVES, H. A. M.; & BARBOSA, W. - Sistemática, Biologia de Phlebotominae e Epidemiologia das Leishmanioses nas áreas endêmicas do Estado de Goiás - Comunicação pessoal.
- 12 - RASSI, D. M.; OLIVEIRA, G. S. C.; AUAD, A.; & DIAS, J. B. - Leishmaniose tegumentar (forma recente) na região Centro-Oeste. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 6, 376-377, 1972.