



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

VINÍCIUS VASCONCELOS GOMES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DAS LESÕES INFLAMATÓRIAS E DA CARGA PARASITÁRIA EM  
ÓRGÃOS DO SISTEMA GENITAL MASCULINO E FEMININO DE CÃES COM  
INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908)**

RECIFE - PE  
2013

VINÍCIUS VASCONCELOS GOMES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DAS LESÕES INFLAMATÓRIAS E DA CARGA  
PARASITÁRIA EM ÓRGÃOS DO SISTEMA GENITAL MASCULINO E  
FEMININO DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania*  
(*Leishmania*) *infantum* (Nicolle, 1908)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) como exigência final para obtenção do grau de mestre em Biociência Animal.

Orientador: Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior - UFRPE

Co-orientador: Dr. Leucio Câmara Alves - UFRPE

RECIFE - PE  
2013

VINÍCIUS VASCONCELOS GOMES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DAS LESÕES INFLAMATÓRIAS E DA CARGA  
PARASITÁRIA EM ÓRGÃOS DO SISTEMA GENITAL MASCULINO E  
FEMININO DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania*  
(*Leishmania*) *infantum* (Nicolle, 1908)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) como exigência final para obtenção do grau de mestre em Biociência Animal.

APROVADA EM \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior – DMFA/UFRPE  
Orientador - Presidente

---

Dr. Leucio Câmara Alves – DMV/UFRPE

---

Dr. Fábio de Souza Mendonça – DMFA/UFRPE

---

Dra. Márcia Paula Oliveira Farias – Médica Veterinária Autônoma

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pela ajuda e proteção, pela sua força e presença constante, e por me guiar à conclusão de mais uma preciosa etapa de minha vida;

À Vera Cristina Gomes de Oliveira, minha mãe, por ter me dado a oportunidade de crescer e “voar com minhas próprias asas”. Por estar sempre presente, mesmo quando a distância nos separava;

À Josemildo Vasconcelos de Oliveira, meu pai, por ter contribuído para minha formação pessoal e pelas lições de vida;

Ao meu irmão Joseílson Vasconcelos Gomes de Oliveira por ter me servido como exemplo e pelo apoio;

À minha linda sobrinha Beatriz Vasconcelos Gomes da Cunha por simplesmente existir e fazer meus dias mais felizes;

À família Vasconcelos, minha origem pernambucana, em especial a Antonia Vasconcelos de Oliveira, Maria das Dôres Ferreira da Silva, Josemilbson Vasconcelos de Oliveira, Patrícia Soraya Gomes de Brito, Luane Gomes Vasconcelos de Oliveira e Joseílson Gomes Vasconcelos de Oliveira por ter me acolhido em seus braços durante toda minha formação. Por sempre estar ao meu lado, me incentivando e me ajudando nas minhas caminhadas;

À família Gomes, minha origem baiana, em especial a Manoel Gomes da Silva, Oldemia de Oliveira Gomes, Maria das Graças Gomes de Oliveira Bezerra, Manoela Gomes de Oliveira Bezerra e Marcela Gomes de Oliveira Bezerra pela atenção, carinho e amor sempre presentes;

À Suellen de Oliveira Santos por todo o carinho, amor e companheirismo. Por ser para mim “uma pequena grande mulher” sempre presente nos momentos mais fáceis e mais difíceis da vida;

Ao amigo e professor/orientador Valdemiro Amaro da Silva Junior, por estar presente na maior parte da minha formação acadêmica e no meu crescimento pessoal. Por ter me orientado e guiado nos trilhos da sabedoria;

Ao professor e amigo Leucio Câmara Alves, com incentivo e orientação qualificada, vem contribuindo na minha formação profissional com conselhos, críticas e sugestões;

Às pessoas que fazem e fizeram parte do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos durante todo este período e que me propiciaram bons momentos: Augusto, Carina, Gabriela, Edna, Edson, Fernanda, Francine, Glaucia Haliny, Hévila, Inês, João, Júlio, Luana, Luciana, Maíra, Marcelo, Márcia, Marília, Nadine, Nataly, Neurisvan, Rafael, Rebeqa, Silvia, Tiago, Vítor e às Professoras Gílcia e Maria Aparecida.

Aos atuais e antigos integrantes do Laboratório de Histologia pela amizade, apoio e companheirismo: Bruno, Cássia, Érica, Sandra e Simone;

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular da Área de Sanidade Animal do Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte (CNPGC –EMBRAPA) em especial ao Dr. Flávio Ribeiro de Araújo e Carlos Alberto;

Ao Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Petrolina, em especial à Médica Veterinária Michelle, pela boa vontade e valiosa colaboração no fornecimento dos cadáveres dos cães para execução deste trabalho.

Ao Departamento de Controle de Vetores e Vigilância Animal da Prefeitura Municipal de Caruaru, em especial à Médica Veterinária Cláudia, pela boa vontade e valiosa colaboração no fornecimento dos cadáveres dos cães para execução deste trabalho.

À todos meus amigos da graduação e mestrado com quem convivi durante anos, onde passamos momentos felizes e tristes, aborrecimentos e boas conversas mas nunca deixamos de estar juntos. Todos vocês serão para sempre lembrados;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal por terem contribuído para minha formação;

A todos os amigos que perto ou longe contribuíram com seu apoio;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal pela possibilidade de realização deste curso;

E, enfim, a todos que contribuíram de forma direta e indireta na minha formação acadêmica.

*Eu quase que nada não sei. Mas  
desconfio de muita coisa.*

(João Guimarães Rosa)

## RESUMO

A leishmaniose visceral canina é uma importante zoonose parasitária endêmica no Brasil, causada por *Leishmania infantum*. Em áreas urbanas, os cães são considerados os principais reservatórios deste parasito, no qual, diversos órgãos e tecidos podem apresentar lesões decorrentes do parasito, inclusive com o envolvimento do sistema genital. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as lesões inflamatórias e carga parasitária em órgãos do sistema genital masculino e feminino de cães com infecção natural por *Leishmania infantum*. Para tanto, foram utilizados fragmentos de órgãos do sistema genital de 12 cadelas e 19 machos naturalmente infectados por *L. infantum* provenientes dos municípios de Caruaru e Petrolina, Pernambuco, respectivamente. Amostras de vulva, vagina, cérvix, corpo e cornos uterinos e ovários para as fêmeas e testículos, epidídimos, próstata, glande, prepúcio e escroto para os machos foram coletados para avaliação estrutural, imunohistoquímica e molecular. No presente estudo, pode-se observar que os principais locais de desenvolvimento de lesões e imunomarcção de formas amastigotas de *L. infantum* no trato reprodutor das fêmeas foram vulva e vagina, enquanto que nos machos as lesões inflamatórias foram observadas no epidídimo, próstata, glande, prepúcio e escroto. Imunomarcção de formas amastigotas de *L. infantum* foram observadas nos testículos, epidídimo, glande e escroto. Em ambos os sexos, não foi observada correlação entre carga parasitária e lesão inflamatória nos órgãos genitais.

Palavras chave: Leishmaniose Visceral Canina, alterações estruturais, patologias genitais, imunohistoquímica, qPCR.

## ABSTRACT

The canine visceral leishmaniasis is an important parasitic zoonosis endemic in Brazil, caused by protozoa *Leishmania infantum*. In urban areas, dogs are considered the main reservoir of this parasite, in which the inflammatory lesions observed in tissues and organs may be related with parasite presence, including the genital system. Therefore, the aim of this study was to evaluate the inflammatory lesions and parasite load in the genital tract of dogs naturally infected with *L. infantum*. Thus, tissue samples collected from 12 female dogs and 19 dogs naturally infected by *L. infantum* from the municipalities of Caruaru and Petrolina, Pernambuco, respectively. Fragments of vulva, vagina, cervix, uterine body and horns and ovaries of the females and testes, epididymis, prostate, glans penis, prepuce and scrotum of the males were collected for structural assessment, immunohistochemistry and molecular. In the present study, vulva and vagina were the major sites to inflammatory lesion development and *L. infantum* amastigotes immunostaining in the reproductive tract of female dogs. Moreover, in the reproductive tract of male dogs: epididymis, prostate, glans penis, prepuce and scrotum showed lympho-histio-plasmacytic inflammatory lesion. *L. infantum* amastigotes immunolabeling just was visualized in testes, epididymis, glans penis and scrotum. In both sexes, there is no correlation between parasite load and inflammatory lesion on the genitals.

Key words: Canine Visceral Leishmaniasis, structural changes, genital pathologies, immunohistochemistry, qPCR

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

Tabela 1 - Intensidade das reações inflamatórias e o comprometimento do órgão avaliado para a variável HE e para a determinação do número de formas amastigotas imunomarcadas através da IHQ ..... 34

Tabela 2 - Valores absolutos e relativos das lesões histopatológicas (HE), imunomarcações teciduais e positividade via qPCR dos órgãos do sistema genital feminino de cães naturalmente infectados por *L. infantum* ..... 37

Tabela 3 - Teste de Kruskal-Wallis e comparações entre ranks médios de cada órgão para as variáveis qPCR, IHQ e HE ..... 38

Tabela 4 - Valores-p para correlação entre qPCR (carga parasitária) e HE (“score” de inflamação) por tecido ..... 38

### Capítulo II

Tabela 1 - Intensidade das reações inflamatórias e o comprometimento do órgão avaliado para a variável HE e para a determinação do número de formas amastigotas imunomarcadas através da IHQ ..... 48

Tabela 2 - Valores absolutos e relativos das lesões histopatológicas (HE), imunomarcações teciduais e positividade via qPCR dos órgãos do sistema genital masculino de cães naturalmente infectados por *L. infantum* ..... 51

Tabela 3 - Teste de Kruskal-Wallis e comparações entre ranks médios de cada órgão para as variáveis qPCR, IHQ e HE ..... 52

Tabela 4 - Valores-p para correlação entre qPCR (carga parasitária) e HE (nível de inflamação) por tecido ..... 53

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

- Figura 1 – Vulva. Infiltrado inflamatório mononuclear moderado difuso na derme papilar (estrela), periglandular e perifolicular (cabeça de seta). HE. Detalhe: macrófago contendo formas amastigotas de *L. infantum*. Barra = 400µm ..... 41
- Figura 2 - Processo inflamatório vaginal (estrela) com macrófago contendo formas amastigotas de *L. infantum* (seta). HE. Barra = 100µm ..... 41
- Figura 3 - Cérvix. Infiltrado inflamatório linfocitoplasmocitário intenso e difuso. HE. Barra = 400µm ..... 41
- Figura 4 - Corpo do útero. Infiltrado inflamatório linfocitoplasmocitário intenso no endométrio (estrela). HE. Barra = 100µm ..... 41
- Figura 5 - Formas amastigotas de *L. infantum* na vulva (seta). Complexo estreptavidina-peroxidase. Barra = 100µm ..... 41
- Figura 6 - Formas amastigotas de *L. infantum* na vagina (seta). Complexo estreptavidina-peroxidase. Barra = 100µm ..... 41
- Figura 7 - Correlação de Spearman entre qPCR (“score”) e HE para o tecido do corpo do útero ..... 39

### Capítulo II

- Figura 1 - Testículo. Infiltrado inflamatório crônico e difuso (estrela). Observar degeneração testicular e atrofia de túbulos seminíferos. HE. Barra = 200µm ..... 56
- Figura 2 - Epidídimo. Processo inflamatório difuso e intenso ao longo do interducto (estrela). HE. Barra = 200µm ..... 56
- Figura 3 - Próstata. Infiltrado inflamatório linfocitoplasmocitário difuso (estrela). HE. Barra = 200µm ..... 56
- Figura 4 - Próstata. Adenocarcinoma moderadamente diferenciado. HE. Barra = 200µm 56
- Figura 5 - Escroto. Infiltrado inflamatório discreto ao longo da derme papilar. Observar macrófagos ingurgitados com melanina (seta) e hiperpigmentação de estrato basal e espinhoso no epitélio (cabeça de seta). HE. Barra = 200µm ..... 56
- Figura 6 - Formas amastigotas de *L. infantum* no interstício testicular (seta). Complexo estreptavidina-peroxidase. Barra = 50µm ..... 56

## LISTA DE ABREVIATURAS

DAB	Diaminobenzidina
ELISA	Ensaio imunoenzimático
HE	Hematoxilina e Eosina
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IHQ	Imunohistoquímica
IL	Interleucina
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	PCR em tempo real
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
T CD4+	Linfócito T CD4+
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 GERAL .....	15
2.2 ESPECIFICOS .....	15
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
3.1 EPIDEMIOLOGIA .....	16
3.2 AGENTE ETIOLÓGICO E TRANSMISSÃO .....	16
3.3 HOSPEDEIROS SUSCETÍVEIS .....	17
3.4 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC).....	18
3.5 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS NA LVC.....	18
3.6 DIAGNÓSTICO .....	20
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	22
<b>CAPÍTULO I</b> .....	30
<b>RESUMO</b> .....	31
<b>ABSTRACT</b> .....	31
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	32
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
2.1 AMOSTRAS BIOLÓGICAS .....	33
2.2 HISTOPATOLOGIA .....	33
2.3 IMUNOHISTOQUÍMICA .....	34
2.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR .....	34
<b>2.4.1 EXTRAÇÃO DE DNA</b> .....	34
<b>2.4.2 qPCR</b> .....	35
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	35
<b>3 RESULTADOS</b> .....	36
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	38
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42
<b>CAPÍTULO II</b> .....	44
<b>RESUMO</b> .....	45
<b>ABSTRACT</b> .....	45
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	46
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	47
2.1 AMOSTRAS BIOLÓGICAS .....	47
2.2 HISTOPATOLOGIA .....	47
2.3 IMUNOHISTOQUÍMICA .....	48
2.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR .....	48
<b>2.5.1 EXTRAÇÃO DE DNA</b> .....	48
<b>2.5.2 qPCR</b> .....	48
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	49
<b>3 RESULTADOS</b> .....	50
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	52

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57
<b>CAPÍTULO III</b> .....	60
<b>RESUMO</b> .....	61
<b>ABSTRACT</b> .....	61
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	61
<b>2 ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO</b> .....	64
<b>3 ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO</b> .....	66
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	67
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68

## 1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose parasitária relatada em mais de 88 países (TOZ et al., 2009), acometendo o homem e diversas espécies de mamíferos silvestres e domésticos provocando variadas manifestações clínicas (FIGUEIREDO et al., 2009). É ocasionada por protozoários da família Trypanosomatidae os quais, uma vez dentro do organismo dos mamíferos apresentam tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear (NEVES, 2005).

O protozoário causador da LV pertence ao gênero *Leishmania*, agrupado no complexo donovani, incluindo *L. donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo e *L. chagasi* no Novo Mundo (SHAW, 1994). Entretanto, estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram a *L. chagasi* e a *L. infantum* uma única espécie (MAURICIO et al., 2000).

Embora várias espécies silvestres possam ser potencialmente infectadas (LUPPI et al., 2008), o cão doméstico é o principal reservatório da LV no novo mundo, particularmente em áreas urbanas (DINIZ et al., 2008), onde a transmissão se dá pela ação hematófaga de insetos vetores pertencentes à subfamília Phlebotominae (MARZOCHI et al., 1985), particularmente a espécie *Lutzomyia longipalpis* (BARATA et al., 2004). Todavia, a transmissão vertical em cadelas (DUBEY et al., 2005; MASUCCI et al., 2003; ROSYPAL et al., 2005), bem como transmissão venérea (SILVA et al., 2009) tem sido relatadas.

Os principais sinais clínicos observados nos cães acometidos pela LV são linfadenomegalia, dermatopatias (SOLANO-GALLEGO et al., 2009), hepatoesplenomegalia, onicogribose (ALBUQUERQUE et al., 2007) e oftalmopatias (BRITO et al., 2006). No entanto, formas amastigotas de *L. infantum* podem ter uma ampla distribuição em tecidos de cães (TAFURI et al., 2004), que pode resultar em manifestações clínicas atípicas (SOUZA et al., 2005).

Dentre os quadros atípicos, incluem-se desordens neurológicas (BLAVIER et al., 2001), nefropatias (COSTA et al., 2003), cardiopatias e pneumopatias (TORRENT et al., 2005), bem como envolvimento do sistema genital (AMARA et al., 2009; DINIZ et al., 2005; SILVA et al., 2008).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as lesões inflamatórias e carga parasitária em órgãos do sistema genital masculino e feminino de cães com infecção natural por *L. infantum*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as lesões inflamatórias e carga parasitária em órgãos do sistema genital masculino e feminino de cães com infecção natural por *L. infantum*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as alterações histopatológicas na genitália interna e externa masculina em cães com a infecção natural por *L. infantum*;
- Avaliar as alterações histopatológicas na genitália interna e externa feminina em cães com a infecção natural por *L. infantum*;
- Detectar formas amastigotas de *L. infantum* nos órgãos genitais masculinos e femininos através da técnica imunohistoquímica em cães com a infecção natural por *L. infantum*;
- Quantificar a carga parasitária de *L. infantum* por meio da PCR em tempo real (qPCR) nos órgãos genitais masculinos e femininos em cães com a infecção natural por *L. infantum*;
- Correlacionar a carga parasitária de *L. infantum* por meio qPCR nos órgãos genitais masculinos e femininos com as alterações histopatológicas em cães com a infecção natural por *L. infantum*.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 EPIDEMIOLOGIA

A Leishmaniose Visceral (LV) apresenta amplo espectro epidemiológico no mundo, ocorrendo em vastas áreas tropicais e subtropicais do globo (MONTEIRO et al., 2005), sendo causada pela *Leishmania infantum*, acometendo diversas espécies de mamíferos silvestres, o cão e o homem (CARRILO & MORENO, 2009; KUHLS et al., 2008). A doença acomete mais de 350 milhões de pessoas em diversos países (HOSSAIN & JAMIL, 2011).

O Brasil enfrenta a expansão e urbanização da LV, em decorrência de alterações ambientais antropogênicas e da rápida e intensa migração de populações rurais às periferias urbanas (COLOMBO et al., 2011; LAURENTI, 2009; MAIA-ELKHOURY et al., 2008). A falta de saneamento e infraestrutura adequados, associada à simultânea interação e mobilização de reservatórios silvestres e cães infectados, acarretaram no aumento do número de casos humanos e um elevado número de cães infectados em vários estados do país (GONTIJO & MELO, 2004).

A doença é considerada endêmica em 21 estados da federação brasileira, destacando-se aqueles da região Nordeste, responsáveis por 50% dos casos anuais do país (AGUIAR et al., 2007; DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006), sendo os estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí e Pernambuco os mais acometidos (ALBUQUERQUE et al., 2009; COSTA, 2008; MENDES et al., 2002).

#### 3.2 AGENTE ETIOLÓGICO E TRANSMISSÃO

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) é causada por um protozoário heteroxênico, intracelular obrigatório, da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (COLOMBO et al., 2011; LIMA et al., 2010), espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* (MAURICIO et al., 2000), a qual se encontra inserida no complexo *Leishmania donovani* (ASHFORD, 2000; FEITOSA, 2001), sendo transmitido para os hospedeiros suscetíveis por insetos hematófagos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, por ocasião do repasto sanguíneo (NOLI, 1999).

A ausência de flebotomíneos em determinadas áreas onde a LV é enzoótica (TORRES et al., 2010) e o baixo grau de infecção da *L. longipalpis* pela *L. infantum* ( $\leq 0,5\%$ ) (MONTROYA-LERMA et al., 2003) sugere a existência de outras formas de transmissão da doença (DANTAS-TORRES, 2006; PAZ et al., 2010). Meios alternativos de transmissão incluem transfusão sanguínea (OWENS et al., 2001), via transplacentária (ROSYPAL et al., 2005), cópula (SILVA et al., 2009) ou, ainda, tem sido aventada a possibilidade da participação de outros artrópodes, tais como pulgas e carrapatos (COUTINHO & LINARDI, 2007; COUTINHO et al., 2011; McKENZIE, 1984).

### 3.3 HOSPEDEIROS SUSCETÍVEIS

Existe uma variedade de hospedeiros vertebrados suscetíveis a infecção por *L. infantum*, sendo denominados hospedeiros reservatórios aqueles que constituem uma fonte de infecção para o homem, permitindo a multiplicação ilimitada do parasita, podendo existir ainda hospedeiros considerados acidentais como o urso, o porco-espinho, o guaxinim, o esquilo, o rato-negro, a vaca, a ovelha, a cabra (ROZE, 2005), além dos gatos domésticos (POLI et al., 2002; SIMÕES-MATOS et al., 2005;) e equinos (FERNANDÉZ-BELLON et al., 2006; ROLÃO et al., 2005).

Várias espécies de mamíferos têm sido encontradas naturalmente infectadas por *L. infantum*, particularmente os canídeos silvestres (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) (VIANNA, 2001) e marsupiais (*Didelphis marsupialis*), que constituem um importante elo na cadeia epidemiológica na interface dos ciclos silvestres e urbanos da LV no Brasil (LAINSON & RANGEL, 2005). Não obstante, áreas com criação de animais domésticos, (BORASCHI & NUNES, 2007), particularmente cães (COSTA et al., 1990), resquício de vegetação primária e baixos índices de saneamento básico, associado ao acúmulo de resíduos sólidos nas cidades favorecem a domiciliação das espécies vetores da LV (MISSAWA & LIMA, 2005).

Nestas condições os canídeos domésticos são apontados como os mais importantes reservatórios urbanos da infecção (DEANE & DEANE, 1955; SILVA et al., 2005; VERÇOSA et al., 2008) com taxas de prevalência da doença variando de 1,9 a 35 % (FRANÇA-SILVA, 2003), representando importante função na manutenção do

ciclo de transmissão do parasita ao homem (CARRILO & MORENO, 2009; QUEIROZ et al., 2009).

### 3.4 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC)

Do ponto de vista epidemiológico, a infecção canina é mais importante que a infecção no homem, pois a precede, além de ser mais prevalente e apresentar grande contingente de animais assintomáticos que albergam parasitos na derme (BONATES, 2003).

No cão, a infecção por *L. infantum* é considerada uma enfermidade crônica, presente em vários continentes (CARDOSO et al., 2007; LIMA et al., 2003; TRAVI et al., 2002), representando um grande problema de saúde pública, particularmente pela presença de animais assintomáticos (COSTA, 2008).

Dependendo da resposta imune do animal, o período de incubação ou pré-patente em animais naturalmente infectados pode variar de três meses a sete anos, levando a diferentes apresentações clínicas da doença (GENARO, 1993; SLAPPENDEL & FERRER 1990).

### 3.5 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS NA LVC

As infecções por *Leishmania* sp ativam uma resposta imunológica específica por parte do hospedeiro. Há uma expansão de vários tipos de células, que pode ser caracterizada pelo aumento de células T CD4+, apresentando um perfil de citocinas Th1 ou Th2 (HOLZMULLER et al., 2006; REIS et al., 2006). Se a resposta for do tipo Th1, citocinas como IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 serão produzidas, ativando os macrófagos e, conseqüentemente, levando a destruição dos parasitos. Mas, se a resposta for do tipo Th2 serão produzidos IL-4 e IL-10, que inibem a ativação macrofágica e, conseqüentemente, as formas clínicas aparecerão (VERAS et al, 2010). A *Leishmania* sp. é capaz de direcionar a diferenciação de células T para uma resposta do tipo Th2, caracterizada pela persistência da infecção (REIS et al., 2006).

As infecções por *L. infantum* são caracterizadas por três características patogênicas principais, sendo a primeira determinada pela capacidade do parasito de inibir a atividade dos macrófagos, fazendo destes o seu sítio de replicação. Segundo, o estabelecimento e evolução da doença dependem da resposta imunológica do hospedeiro. Por último, uma vez estabelecida, a infecção persiste nos tecidos, principalmente nos que possuem maior concentração de células do sistema fagocítico mononuclear (PALTRINIERI et al., 2010).

Além da presença do protozoário nos tecidos, a deposição de imunocomplexos em alguns locais é importante para caracterização da patogenia da doença, particularmente nas paredes dos vasos sanguíneos, olhos, rins, e articulações (GARCIA-ALONSO et al., 1996).

A LVC caracteriza-se pela grande variedade de sinais clínicos, relacionados basicamente a fatores individuais associados ao tipo de resposta imunológica desenvolvida, grau de infecção, tempo de evolução da doença e órgãos acometidos (EZQUERRA, 2001; MARCONDES et al., 2011). De acordo com os sinais clínicos observados, os animais podem ser classificados em assintomáticos ou sintomáticos (BLAVIER et al., 2001) sendo que os assintomáticos representam importante papel como reservatório da doença (BARBIÉRI, 2006).

Os principais sinais clínicos observados nos animais acometidos pela LVC são linfadenomegalia, dermatopatias (SOLANO-GALLEGO et al., 2009), hepatoesplenomegalia, onicogribose (ALBUQUERQUE et al., 2007) e oftalmopatias (BRITO et al., 2006). No entanto, formas amastigotas de *Leishmania* sp podem ter uma ampla distribuição em tecidos de cães (TAFURI et al., 2004), o que pode resultar em manifestações clínicas atípicas (SOUZA et al., 2005).

Dentre os quadros atípicos, incluem-se desordens neurológicas (BLAVIER et al., 2001), nefropatias (COSTA et al., 2003), cardiopatias e pneumopatias (TORRENT et al., 2005), bem como envolvimento do sistema genital (AMARA et al., 2009; DINIZ et al., 2005).

Cães machos naturalmente infectados, muitas vezes, desenvolvem lesões genitais associadas com a presença de formas amastigotas, principalmente no epidídimo, prepúcio, e glândula (DINIZ et al., 2005), além de lesões específicas nos testículos (AMARA et al., 2009).

Por outro lado, os principais locais de desenvolvimento de lesões e imunomarcção de formas amastigotas de *L. infantum* no trato reprodutor de cadelas são a vulva e vagina (OLIVEIRA et al, 2012).

### 3.6 DIAGNÓSTICO

Atualmente, diversas metodologias estão disponíveis para o diagnóstico da LVC. O diagnóstico laboratorial pode ser feito através do exame parasitológico direto, por meio de testes imunológicos, como imunofluorescência indireta (RIFI) ou ensaios imunoenzimáticos (ELISA), por método de imunohistoquímica (IHQ) e, mais recentemente, através de métodos moleculares de amplificação do ácido nucleico como a PCR e PCR em tempo real (qPCR) (QUEIROZ et al., 2010; MOREIRA et al., 2007; SOLCÁ et al., 2012).

O diagnóstico parasitológico baseia-se na identificação microscópica direta de formas amastigotas do protozoário em esfregaços de aspirado de linfonodos, medula óssea, baço e fígado (FEITOSA, 2001; MARCONDES et al., 2011; MOREIRA et al., 2007). Apesar da presença de uma única forma amastigota ser confirmatória para o diagnóstico da LVC, esta técnica tem a sensibilidade de apenas 50%, nos aspirados de medula óssea, e 30%, nos aspirados obtidos de linfonodos (FERRER, 1999), além de ser um método invasivo, com probabilidade de riscos para o animal (SUNDAR & RAI, 2002).

A IHQ combina técnicas histológicas, imunológicas e bioquímicas, e consiste na detecção de antígenos “*in situ*” por meio da utilização de um anticorpo policlonal ou monoclonal primário e específico, e de um sistema de enzima e substrato cromógeno que se deposita no local da reação antígeno-anticorpo, possibilitando sua visualização. Na LVC, o diagnóstico depende do achado de estruturas coradas pelo cromógeno, de forma e tamanho compatíveis com formas amastigotas (RAMOS-VARA, 2005).

Os métodos imunológicos são úteis para a triagem de casos, particularmente em inquéritos epidemiológicos (REY, 2001). Os testes mais largamente utilizados são a RIFI, o ELISA, o teste de aglutinação indireta (DAT) e o Western blotting (GRIMALDI JR et al., 2012), sendo a RIFI e o ELISA (BRASIL, 2006; MARCONDES et al., 2011),

as técnicas recomendadas pelo Ministério da Saúde para avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários.

A RIFI é amplamente utilizada no diagnóstico da LVC, apresentando elevadas taxas de sensibilidade, mesmo quando se utiliza como antígeno outras espécies de *Leishmania*, tais como *L. mexicana* e *L. braziliensis* (COSTA, 2004). No entanto, pode haver resultados falso positivos em alguns cães saudáveis resistentes que entraram previamente em contato com o parasito, além de resultados falso negativos em cães afetados que não produziram anticorpos (fase pré-patente) (FEITOSA, 2001). A especificidade deste teste torna-se prejudicada pela presença de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos, como o da doença de Chagas, os da leishmaniose tegumentar americana (LTA) (ALVES & BEVILACQUA, 2004) e nas infecções por *Anaplasma sp* e *Ehrlichia sp* (LIRA, 2005).

O teste ELISA é um método clássico utilizado na detecção de anticorpos para *Leishmania* não apresentando limitações quanto à necessidade de condições laboratoriais e técnicas específicas. O diagnóstico baseado neste teste permite o uso de um grande número de amostras, com altos níveis de sensibilidade e especificidade, a depender do antígeno utilizado. Antígenos solúveis derivados a partir da fase promastigota de espécies de *Leishmania* diferentes são os mais comumente usados no diagnóstico da LVC, apresentando sensibilidade e especificidade de 80 para 100% e 85 a 95%, respectivamente (LAURENTI, 2009; MARCONDES et al., 2011; SANTARÉM et al., 2010). Extratos totais do parasita têm sido descritos como sensíveis para a detecção de infecções clínicas e subclínicas em cães, demonstrando entretanto baixa especificidade (SOUSA et al., 2011). Objetivando ampliar a especificidade no diagnóstico da LVC, alguns antígenos recombinantes purificados de *Leishmania* têm sido propostos, tais como as proteína rHSP70, a LicTXNPx e a rK39 (SANTARÉM et al., 2010; SILVESTRE et al., 2008; SOUZA et al., 2012).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método molecular que permite a amplificação do DNA do parasito. A extração do DNA pode ser realizada a partir de amostras de tecidos do paciente, incluindo sangue, aspirado de medula óssea, linfonodo, baço, fígado, além de biópsias cutâneas. A sensibilidade e especificidade atingem patamares próximos a 100% (FERRER, 1999; LUVIZOTTO, 2005).

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, P.H.P. et al. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 4, p. 283-294, 2007.
- ALBUQUERQUE, A.R. et al. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na Região Metropolitana do Recife. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 71, p. 78-80, 2007.
- ALBUQUERQUE, P.L.M. M. et al. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 26, n. 4, p. 330-333, 2009.
- ALVES, W.A. & BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, v. 20, n. 01, p. 259-265, 2004.
- AMARA, A. et al. Etude histologique des lésions testiculaires chez les chiens leishmaniens. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 160, n. 1, p. 54-60, 2009.
- ASHFORD, R.W. The Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal of Parasitology**, v.30, n.12-13, p.1269-1281, 2000.
- BARATA, R.A. et al. Phlebotomine sandflies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 481-487, 2004.
- BARBIÉRI, C.L. Immunology of canine Leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 28, p. 329-337, 2006.
- BLAVIER, A., et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, London, v. 162, n. 2, p. 108-120, 2001.
- BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar). **Veterinary News**, v.10, n. 61, p. 04-05, 2003.
- BORASCHI, C.S.S.; NUNES, C.M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. **Revista Clínica Veterinária**, v. 71, n. 1, p. 44-48, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.
- BRITO, F.L.C. et al. Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n. 5, p.768-775, 2006.

- CARDOSO, L. et al. Anti-*Leishmania* humoral and cellular response in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Immunopathology**, v.117, n.1-2, p. 35-41, 2007.
- CARRILO, E. & MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 67-70, 2009.
- COLOMBO, F.A. et al. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitology Research**, v. 109, n.2, p 267-274, 2011.
- COSTA, C.H.N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral Leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n.12, p.2959- 2963, Rio de Janeiro, 2008.
- COSTA, C.H.N. et al. Epidemia de Leishmaniose Visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, p. 361-371, 1990.
- COSTA, F. A. L. et al. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 6, p.677-684, 2003.
- COSTA, K.G.N. **Identificação de casos de leishmaniose visceral canina através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em Maceió – Alagoas**. Monografia (Graduação em Farmácia). Universidade Federal de Alagoas. Maceió. 2004.
- COUTINHO, M.T.Z. & LINARDI, P.M. Can fleas from dogs infected with canine visceral Leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology**, v. 147, n3-4, p. 320-325, 2007.
- COUTINHO, C.E.R. et al. Evaluaton of *Leishmania (Leishmania) chagasi* strain isolated from dogs originating from two visceral Leishmaniasis-endemic areas in Brazil using multilocus enzyme electrophoresis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 05, p. 572-575, 2011.
- DANTAS-TORRES, F. Current epidemiological status of visceral Leishmaniasis in Noutheastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, p. 537-541, 2006.
- DANTAS-TORRES, F. & BRANDÃO-FILHO, S. P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral do Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n.4, p. 352-356, 2006.
- DEANE, L.M. & DEANE, M.P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex ventulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar no Ceará. **O Hospital**, v. 48, p. 61-76, 1955.
- DINIZ, S.A. et al. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania sp.* in the semen of naturally infected dogs. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 5, p. 650–658, 2005.

DINIZ, S.A. et al. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 1, p. 24–33, 2008.

DUBEY, J.P. et al. Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 8, p. 1266–1269, 2005.

EZQUERRA, L.P.A. **Las Leishmaniasis: La biología al control**. Philadelphia: W.B. Saunders. (2. ed) 2001. Cap. 6, p. 157-159.

FRANÇA-SILVA, J.C. **Distribuição especial e temporal da Leishmaniose Visceral Canina em relação à densidade vetorial e ao controle de cães infectados em Porteirinha - Minas Gerais (1998-2002)**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

FEITOSA, M.M. **Leishmaniose visceral: um desafio crescente**. São Paulo: Intervet pet, 2001. 15p.

FERNANDÉZ-BELLON, H. et al. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 02, p. 181-185, 2006.

FERRER, L. Clinical aspects of canine Leishmaniasis. In: International Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona, 1999. p. 6-10. 1999.

FIGUEIREDO, F.B. et al. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p.141-145, 2009.

GARCIA-ALONSO, M. et al. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 18, n. 12, p. 617-623, 1996.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. Tese de doutorado em parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

GONTIJO, C.M.F. & MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafio e novas perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRIMALDI JR, G. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral Leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, p. 54-59, 2012.

HOLZMULLER, P.; BRAS-GONÇALVES, R.; LEMESRE, J. R. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. **Parasitology**, v. 132, p. S19-S32, 2006.

HOSSAIN, M. & JAMIL, K.M. Geographical Distribution of Kala-Azar in South Asia. **Kala Azar in South Asia**, v. 1, p. 3-9, 2011.

KUHLS, K. et al. Differentiation and gene flow among european populations of *Leishmania infantum* MON-1. **PLoS- Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 7, p. 1-18, 2008.

LAINSON, R. & RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral Leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n.8, p. 811-827, 2005.

LAURENTI, M.D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, n. 67, p. 13-23, 2009.

LIMA, V.M.F. et al. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral Leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n.4, p. 485-489, 2003.

LIMA, V. M. F. et al. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rk39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 330-333, 2010.

LIRA, R.A. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: Avaliação do Desempenho dos Kits EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos**. 2005. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz-CPqAM/FIOCRUZ, Recife. 2005.

LUPPI, M.M. et al. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.155, n. 1-2, p. 146–151, 2008.

LUVIZOTTO, M.C.R. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina**. In: \_\_\_ *Leishmune Manual Técnico Leishmaniose Visceral*, Fort Dodge, seção 3, p. 28-29, 2005.

MAIA-ELKHOURY, A.N. et al. Visceral Leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, p. 2941–2947, 2008.

MARCONDES, M. et al. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapi test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n.1-2, p. 15-19, 2011.

MARZOCHI, M.C.A. et al. Canine visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutic and epidemiological findings (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 3, p. 349-357, 1985.

MASUCCI, M. et al. Canine leishmaniasis in the newborn puppy. **Veterinary Research Communications**, v. 27, suple. 1 p. 771–774, 2003.

MAURICIO I.L. et al. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, p 188-189, 2000.

McKENZIE, K.K. **A study of the transmission of canine Leishmaniasis by the tick *Rhipicephalus sanguineus*, and an ultrastructural comparison of the promastigote.** PhD Dissertation, Oklahoma State University, 1984.

MENDES, W.S. et al. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luis, Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 3, p. 227-231, 2002.

MISSAWA, N.A. & LIMA, G.B.M. **Levantamento dos vetores das leishmanioses no município de Várzea Grande, estado do Mato Grosso, no ano de 2004.** In: Caderno de resumos do XVI Encontro de Biólogos do CRBio-1. Campo Grande, MS, 2005, p. 104

MONTEIRO, E.M. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 147-152, 2005.

MONTOYA-LERMA, J. et al. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lutzomyia longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. **Acta Tropica**, v. 85, n. 1, p. 19-29, 2003.

MOREIRA, M.A.B. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of Leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.245, 2007.

NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**, v. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11 ed . São Paulo: Ed. Atheneu, 2005. 494 p.

OLIVEIRA, V.V.G.; ALVES, L.C.; SILVA JUNIOR, V.A. Patologias genitais associadas à leishmaniose visceral canina. **Ciência Rural**, v.42, n.9, p.1614-1620, 2012.

OWENS, S. D. et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.219, n.8, p. 1076 -1083, 2001.

PALTRINIERI, S. et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1184-1191, 2010.

PAZ, G.F. et al. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in transmission of canine visceral Leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 106, n. 2, p. 523-528, 2010.

POLI, A. et al. Feline leishmaniosis due *Leishmania infantum* in Italy, **Veterinary Parasitology**, v. 106, n.3, p. 181-191, 2002.

QUEIROZ, N.M.G.P. et al. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunohistoquímica e PCR em tecidos cutâneas em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 34-40, 2010.

QUEIROZ, P.V.S. et al. Canine visceral Leishmaniasis in rural and urban areas of Northeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n.2, p. 267-273, 2009.

RAMOS-VARA, J.A. Technical aspects of immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 4, p. 405-426, 2005.

REIS, L. C., et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 103-115, 2006.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2001.424p.

ROLÃO, N. et al. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. **Parasite**, v. 12, n. 2, p. 183-186, 2005.

ROSYPAL, A. C. et al. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in a experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 970–972, 2005.

ROZE, M. Canine leishmaniasis. A spreading disease. Diagnosis and treatment. **European Journal of Companion Animal Practice**, v. 15, p. 39–52, 2005.

SANTARÉM, N. et al. A. Application of an improved enzyme-linked immunoabsorbent assay method for serological diagnosis of canine Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 1866-1874, 2010.

SHAW, J.J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 471–478, 1994.

SILVA, A.V.M. et al. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cadernos de Saúde Pública**, v.21, n. 1, p. 324-328, 2005.

SILVA, F.L. et al. Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 151, n.1, p. 86–90, 2008.

SILVA, F.L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 55-59, 2009.

SILVESTRE, R. et al. Serological evaluation of experintally infected dogs by LicTXNPx-ELISA and amastigote-flow cytometry. **Veterinary Parasitology**, v. 158, p. 23-30, 2008.

SIMÕES-MATOS, L. et al. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 3-4, p. 199-208, 2005.

- SLAPPENDEL, R.J. & FERRER, L. **Leishmaniosis**. In: GREENE, C. E. (Ed). *Clinical Microbiology and Infetious Diseases of the Dog and Cat*. Philadelphia: W.B.Saunders Co., p. 450- 458, 1990.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1, p. 1–18, 2009.
- SOLCÁ, M.D.S. et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 184, p. 133-140, 2012.
- SOUSA, S. et al. Seroepidemiological survey of *Leishmania infantum* infection in dogs from northeastern Portugal. **Acta Tropica**, v. 120, p. 82-87, 2011.
- SOUZA, A.I. et al. Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 1-2, p. 51–54, 2005.
- SOUZA, C.M. et al. Evaluation of na ELISA for canine leishmaniasis immunodiagnostic using recombinat proteins. **Parasite Immunology**, v. 34, p. 1-7, 2012.
- SUNDAR, S. & RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 951-958, 2002.
- TAFURI, W.L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, n.1-2, p. 17–23, 2004.
- TRAVI, B.L. et al. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from nonendemic areas. **Research in Veterinary Science**, v. 72, n. 1, p. 83-86, 2002.
- TORRENT, E. et al. Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, New York, v. 46, n.11, p. 549–552, 2005.
- TORRES, M. et al. Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **Veterinary Journal**, v. 188, n. 3, p. 346-351, 2010.
- TOZ, S.O. et al. Leishmaniasis in Turkey: molecular characterization of *Leishmania* from human and canine clinical samples. **Tropical Medicine and International Health**, v. 14, n. 11, p. 1401–1406, 2009.
- VERAS, P.S.T. et al. Primary Immune Response and Parasite Dissemination in Canine Visceral Leishmaniasis. **Animal Biology Journal**, v. 1, n. 4, p. 205-222, 2010.
- VERÇOSA, B.L.A. et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitismo f symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Veterinary Research**, v. 4, n. 45, p. 45, 2008.

VIANNA, M. S. R. **Sobre a transmissão da leishmaniose visceral**. Saúde-Rio: Secretaria Municipal de Saúde, Rio de Janeiro, 19 dez. 2001. Disponível em: <file://A:\Saude-Rio. SecretariaMunicipaldeSaudeoRiodeJaneiro.htm>. Acesso em: 14 dez. 2012.

## **CAPITULO I**

# **AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA EM ÓRGÃOS DO SISTEMA GENITAL FEMININO EM CÃES INFECTADOS NATURALMENTE POR *Leishmania infantum***

**Avaliação das alterações histopatológicas e determinação da carga parasitária em órgãos do sistema genital feminino em cães infectados naturalmente por *Leishmania infantum***

*Histopathological evaluation and parasite load determination in genital organs of female dogs naturally infected by *Leishmania infantum**

**RESUMO**

Os cães são os reservatórios mais importantes da *Leishmania infantum* e os flebotomíneos são a principal forma de transmissão. Apesar de, após a infecção, o parasito multiplica e migra do tecido linfóide para outros órgãos como o baço, fígado e sistema genital, em particular o sistema genital masculino. Considerando-se a ausência de estudos sobre a correlação da carga parasitária e lesões do trato genital de cadelas com leishmaniose visceral, o objetivo deste trabalho foi de estabelecer uma correlação entre alterações histopatológicas e carga parasitária de órgãos do sistema genital feminino de cães naturalmente infectados por *L. infantum* através de imunohistoquímica e PCR em tempo real. Para tanto, fragmentos de órgãos do sistema genital de 12 cadelas adultas não senis positivas para leishmaniose visceral foram coletados para avaliações estruturais, imunohistoquímica e molecular por meio da PCR em tempo real. Os mesmos foram provenientes do Departamento de Controle de Vetores e Vigilância Animal da Prefeitura Municipal de Caruaru, Pernambuco, Brasil. Lesões microscópicas associadas com formas amastigotas de *L. infantum* imunomarcadas foram observadas somente na vulva e vagina enquanto alterações estruturais sem imunomarcagem foram observadas em todos os órgãos com exceção dos ovários. Por outro lado, DNA do parasito foi encontrado em todos os órgãos não havendo diferença estatística com relação à carga parasitária entre eles. Não foi encontrada correlação estatística entre carga parasitária e lesão inflamatória em nenhum órgão, com exceção do tecido do corpo do útero, onde houve correlação inversa. Desta forma, pode-se concluir que os principais locais de desenvolvimento de lesões e imunomarcagem de formas amastigotas de *L. infantum* no trato reprodutor de cadelas são a vulva e a vagina, não existindo, porém, correlação entre carga parasitária e lesão inflamatória nestes órgãos e ainda na cérvix, corpo e cornos uterinos.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral Canina, alterações estruturais, patologias genitais, imunohistoquímica, qPCR.

**ABSTRACT**

Dogs are the most important reservoirs of *Leishmania infantum* and sandflies are the principal form of transmission. Although after infection, the parasite multiplies and migrates to the lymphoid tissue of other organs such as the spleen, liver and genital system, in particular the male genital system. Due to the absence of studies on the genital tract lesions in dogs with Visceral Leishmaniasis and its relationship with parasite load, the objective of this study was to establish a correlation between parasite

load and histopathological changes of organs in the female genital system of dogs naturally infected by *L. infantum* by immunohistochemistry and real-time PCR. Fragments of the vulva, vagina, cervix, uterine body, uterine horns and ovaries were collected from 12 adult female dogs not senile positive for Visceral Leishmaniasis for structural evaluations, immunohistochemistry and molecular evaluation by real-time PCR. All samples were obtained from Department of Vector Control and Surveillance Animal City Hall Caruaru, Pernambuco, Brazil. Histopathological lesions associated with amastigotes of *L. infantum* immunostained were observed only in the vulva and vagina, while structural changes without immunostained were observed in all organs, except the ovary. Moreover, *L. infantum* DNA was found in all organs but none statistical difference was observed with respect to parasite load between them. There was no statistical correlation between parasite load and chronic inflammatory reaction in any organ, except in the uterus body which showed an inverse correlation. Thus, it can be concluded that vulva and vagina are the major sites with histopathological lesion and immunostaining of amastigotes of *L. infantum*. However, there is no correlation between parasite load and inflammatory lesions in these organs and even the cervix, uterine body and horns.

Key words: Canine Visceral Leishmaniasis, structural changes, genital pathologies, immunohistochemistry, qPCR

## 1 INTRODUÇÃO

No cão, a infecção por *Leishmania infantum* é considerada uma enfermidade crônica, (LIMA et al., 2003; NOLI, 1999) sendo observadas diferentes formas e aspectos de lesões, devido a complexas interações parasito-hospedeiro envolvidas além da resposta imune (MICHALICK & GENARO, 2005).

Apesar da forma primária de transmissão da Leishmaniose Visceral (LV) em cães ser realizada através de flebotomíneos (BARATA et al., 2004), a transmissão vertical em cadelas (BOGGIATTO et al., 2011; DUBEY et al., 2005; MASUCCI et al., 2003; NAUCKE & LORENTZ, 2012; PANGRAZIO et al., 2009; ROSYPAL et al., 2005), bem como a transmissão venérea (NAUCKE & LORENTZ, 2012; SILVA et al., 2009) tem sido relatadas.

O envolvimento do trato genital tem sido relatado com menor frequência em cães com LV (CATONE et al., 2003; DIAZ et al., 1982; DUBEY et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2012; ROSYPAL et al., 2005). Formas amastigotas de *L. infantum* tem sido descritas no útero (ROSYPAL et al., 2005), placenta (DUBEY et al., 2005), vulva e mucosa vaginal, sendo que, nestes últimos, a presença do parasito tem sido associada com infiltrado inflamatório multifocal discreto composto por macrófagos,

plasmócitos e linfócitos (OLIVEIRA et al., 2012; SILVA et al., 2008). Por outro lado, estes achados são conflitantes, pois Silva et al. (2008) não observaram lesões e formas amastigotas de *L. infantum* na cérvix, corpo do útero, cornos uterinos, tubas uterinas e ovários.

Diversas metodologias estão disponíveis para o diagnóstico da LV em cães. Sendo assim, o diagnóstico laboratorial pode ser realizado através de técnicas parasitológicas (BARROUIN-MELO et al., 2006) e testes imunológicos, como imunofluorescência indireta (RIFI) ou ensaio de imunoadsorção enzimático (ELISA), muito embora, estes últimos apresentem muitos resultados falso-negativos e reações cruzadas com outros organismos podem ocorrer, notadamente *Anaplasma* sp. e *Ehrlichia* sp. (MOREIRA et al., 2007). Ainda existem os métodos imunohistoquímicos (IHQ) (TAFURI et al., 2004) e, mais recentemente, métodos moleculares, particularmente a PCR e PCR em tempo real (qPCR) (QUEIROZ et al., 2010).

Considerando-se a ausência de estudos sobre a correlação da carga parasitária e lesões do trato genital de cadelas com LV, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações histopatológicas e carga parasitária em órgãos do sistema genital feminino de cães naturalmente infectados por *L. infantum* através de IHQ e qPCR.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

Foram utilizados fragmentos de vulva, vagina, cérvix, corpo do útero, cornos uterinos e ovários de 12 cadelas adultas não senis, sem raça definida, soropositivas a anticorpos anti-*L. infantum* (RIFI  $\geq$  40) e/ou com presença de formas amastigotas de *L. infantum* na biópsia de medula óssea. Todas as amostras foram provenientes do Departamento de Controle de Vetores e Vigilância Animal da Prefeitura Municipal de Caruaru, Pernambuco, Brasil.

### **2.2 HISTOPATOLOGIA**

Após a coleta, o material foi fixado em solução de formalina tamponada a 10% por 24 a 48 horas. Após a fixação, as amostras foram submetidas a processamento

histológico de rotina para inclusão em parafina. Cortes de 5 µm foram montados em lâmina e corados por Hematoxilina e Eosina (HE) (TOLOSA et al., 2003). Na análise histopatológica, os cortes foram analisados e descritos quanto à presença de infiltrados inflamatórios, onde foi estipulado um “score” de acordo com a intensidade das reações inflamatórias e o comprometimento do órgão avaliado segundo a Tabela 1.

### 2.3 IMUNOHISTOQUÍMICA

O mesmo material coletado para análise histopatológica foi processado para imuno-deteção de formas amastigotas de acordo com a metodologia descrita por Tafuri et al. (2004), com a utilização de soro hiperimune de cão como anticorpo primário e sistema de deteção a base de estreptavidina-biotina-peroxidase disponível comercialmente (LSAB+ kit, Dako USA). A marcação foi revelada com diaminobenzidina (DAB).

O número de formas amastigotas imunomarcadas foi pontuado de 0 a 3 segundo número de formas amastigotas por campo de maior ampliação microscópica (Tabela 1).

**Tabela 1.** Intensidade das reações inflamatórias e o comprometimento do órgão avaliado para a variável HE e para a determinação do número de formas amastigotas imunomarcadas através da IHQ.

“Score”	HE	IHQ
0	Nenhuma inflamação	Nenhuma forma amastigota detectada
1	Inflamação discreta	1 – 3 formas amastigotas por campo de maior amplificação microscópica
2	Inflamação moderada	4 – 10 formas amastigotas por campo de maior amplificação microscópica
3	Inflamação intensa	>10 formas amastigotas por campo de maior amplificação microscópica

### 2.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

#### 2.4.1 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico do material coletado foi extraído utilizando-se o DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen® Hilden-Germany), de acordo com as instruções do fabricante.

### 2.4.2 qPCR

A reação para detecção de DNA de *L. infantum* foi realizada utilizando-se os *primers* LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-ACCCCAGTTTCCCGCC-3') e a sonda TaqMan-MGB probe (FAM- 5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'- non-fluorescent quencher-MGB) descritos por Francino et al. (2006).

Cada reação (12,5µl) continha 6,25µl de Taqman® Universal PCR Master Mix, cada *primer* na concentração de 900nM, sonda na concentração de 200nM, e 50ng de DNA molde.

O protocolo de amplificação constituiu-se de uma desnaturação inicial de 95°C por 3 min seguidas de 42 ciclos de desnaturação (95°C por 10 seg) e anelamento-extensão (60°C por 30 seg). Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata contendo em cada bateria de reação controle negativo (DNA de cão proveniente de área não endêmica) e positivo (DNA proveniente de cultura *in vitro* de *L. infantum*).

Parasitas foram quantificados pelo método de quantificação absoluta. Uma curva padrão foi construída com diluições de DNA de *L. infantum* provenientes de cultura contendo aproximadamente  $5,6 \times 10^6$  parasitos/mL. Considerando-se uma eficiência de extração de 100%, oito diluições seriadas do estoque de DNA foram realizadas em água livre de nucleases. Cinco pontos foram utilizados para construção da curva (0,1, 1, 10, 1.000 e 1.000.000 parasitos/mL).

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A carga parasitária (qPCR), o número de formas amastigotas imunomarcadas (IHQ) e o “score” de inflamação (HE) foram comparadas pelo teste de Kuskal-Wallis. A análise de correlação entre esses “scores” foi realizada com o teste de correlação de Spearman e para diferenciação entre técnicas de diagnóstico, independente do tecido, foi utilizado o teste exato de Fisher. Todas estas análises foram realizadas com o software R versão 2.15.2 (R CORE TEAM, 2012).

Para realização do teste de Spearman os valores de qPCR (parasitos/mL) foram transformados em “scores” seguindo o seguinte critério: 0 = 0; 0.001-0.01 = 1; >0.01-0.1 = 2; >0.1-1 = 3; >1-2 = 4; >2-5 = 5; >5-6=6; >6-7=7; ...; >100 = 100.

### 3 RESULTADOS

Não foram observadas lesões macroscópicas na genitália tanto interna como externa de nenhuma das cadelas examinadas.

Em relação às lesões microscópicas, a principal alteração estrutural foi uma dermatite vulvar variando de moderada a intensa, caracterizada por um infiltrado linfohistioplasmocitário, predominantemente na camada papilar da derme observada em 83.3% (10/12) dos fragmentos de tecidos, além da presença de formas amastigotas de *L. infantum* em 41.6 % (5/12) destes (Figura 1) (Tabela 2).

Com relação ao tecido vaginal, foi observada reação inflamatória discreta em 8.3% (1/12), moderada em 41.6% (5/12) e intensa em 8.3% (1/12) das amostras, sendo esta reação caracterizada pela presença predominante de macrófagos, plasmócitos e linfócitos, principalmente na lâmina própria da mucosa. Contudo, formas amastigotas de *L. infantum* estavam presentes apenas em 16.6% (2/12) destes tecidos (Figura 2) (Tabela 2).

Na cérvix, infiltrados inflamatórios crônicos foram observados em 33.3% (4/12) das amostras, sendo metade discretos e metade intensos (Figura 3) (Tabela 2).

Por sua vez, ao longo do tecido uterino, infiltrados inflamatórios linfohistioplasmocitário predominantemente intensos foram observados em 33.3% (4/12) da porção do corpo uterino (Figura 4), enquanto na porção correspondente ao corno do útero, infiltrados inflamatórios linfohistioplasmocitário predominantemente moderados foram observados em 50% (6/12) destes tecidos (Tabela 2).

Por outro lado, não foram observadas alterações microscópicas, nem presença do parasito no tecido ovariano de nenhum dos animais.

No que concerne à imunomarcação, formas amastigotas de *L. infantum* foram observadas em 41.6% (5/12) da vulva (Figura 5) e 16.6% (2/12) da vagina (Figura 6) dos animais (Tabela 2).

Vale salientar que não foi observada marcação imunohistoquímica de formas amastigotas de *L. infantum* na cérvix, corpo do útero, corno do útero e ovários.

Com relação ao resultado da qPCR, a presença de DNA de *L. infantum* foi detectada em 75% (9/12) dos animais em pelo menos uma das amostras testadas (vulva,

vagina, cérvix, corpo do útero, cornos uterinos e/ou ovários). No corno uterino e vulva constatou-se positividade de 50% (6/12) nas amostras analisadas. Enquanto que na vagina 58.3% (7/12) das amostras avaliadas foram igualmente positivas. Da mesma forma, amostras de cérvix, corpo do útero e ovários tiveram positividade de 61.5% (8/12) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Valores absolutos e relativos das lesões histopatológicas (HE), imunomarcações teciduais e positividade via qPCR dos órgãos do sistema genital feminino de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

Órgão (n=12)	HE			IHQ	qPCR
	Discreto	Moderado	Intenso		
Cérvix	2 (16.6%)	0	2 (16.6%)	0	8 (61.5%)
Corno uterino	1 (8.3%)	4 (33.3%)	1 (8.3%)	0	6 (50.0%)
Corpo uterino	0	1 (8.3%)	3 (25.0%)	0	8 (61.5%)
Ovário	0	0	0	0	8 (61.5%)
Vagina	1 (8.3%)	5 (41.6%)	1 (8.3%)	2 (16.6%)	7 (58.3%)
Vulva	0	9 (75.0%)	1 (8.3%)	5 (41.6%)	6 (50.0%)

Pelo teste de Kruskal-Wallis foram detectadas diferenças entre os órgãos em relação às quantidades de parasitos na técnica IHQ ( $p = 0.0019$ ) e “score” de inflamação na HE ( $p = 0.0060$ ). Entretanto, não foram observadas diferenças entre órgãos em relação a qPCR ( $p = 0.9387$ ).

Quanto à IHQ, observa-se que os maiores valores foram encontrados no tecido da vulva. Nos demais tecidos a quantidade de parasitos não diferiu ( $p > 0.05$ ). Em relação a HE, destaca-se o tecido ovariano como aquele que apresentou os menores valores, embora não tenha diferido estatisticamente do tecido da cérvix, ao passo que, o tecido da vulva, seguidos pelos tecidos da vagina e do corno uterino apresentaram o maior “score” de inflamação (tabela 3).

O teste de correlação de Spearman detectou uma correlação significativa apenas entre qPCR (“score”) e HE para o tecido do corpo do útero ( $p = 0.001$ ) (tabela 4), sendo possível observar que esta correlação é inversa, ou seja, quanto maior a inflamação (HE) menor é a carga parasitária (qPCR), ou vice-versa (figura 7).

No presente trabalho foi possível constatar pelo teste exato de Fisher ( $p < 0.001$ ) que o método qPCR (0.28) foi mais eficiente na detecção de positividade de tecidos infectados por amastigotas quando comparado com IHQ (0.90).

**Tabela 3.** Teste de Kruskal-Wallis e comparações entre ranks médios de cada órgão para as variáveis qPCR, IHQ e HE.

	qPCR	IHQ	HE	
Kruskal-Wallis	1.26	18.99	16.30	
GL	5	5	5	
Valor p	0.9387	0.0019	0.0060	
Comparações de ranks médios				
Órgão	Cérvix	35.20 a	33.00 b	32.66 bc
	Corno uterino	26.80 a	33.00 b	38.16 ab
	Corpo uterino	30.90 a	33.00 b	35.70 b
	Ovário	30.40 a	33.00 b	21.00 c
	Vagina	30.50 a	39.25 b	41.00 ab
	Vulva	29.20 a	47.75 a	50.45 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente ( $p > 0.05$ ).

**Tabela 4.** Valores-p para correlação entre qPCR (carga parasitária) e HE (“score” de inflamação) por tecido.

	Tecidos					
	Vulva	Vagina	Cérvix	Corpo do útero	Corno do útero	Ovário
Valores-p	0.134	0.752	0.617	0.001	0.305	NPR

NPR = não possível realizar (uma coluna com todos os valores iguais a 0)

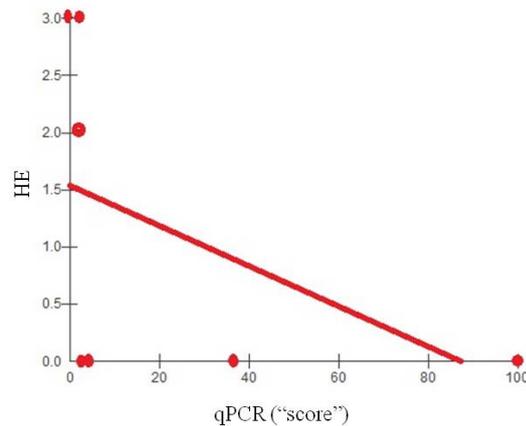
#### 4 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi demonstrado que a LV em cadelas está associada a lesões inflamatórias em órgãos genitais, notadamente na vulva, vagina e corno uterino.

As alterações estruturais na vulva e vagina aqui relatadas assemelham-se àquelas encontradas por Silva et al. (2008) que relataram processo inflamatório vulvar e vaginal caracterizada por infiltrado linfocitoplasmocitário, principalmente ao redor de folículos pilosos e de glândulas sebáceas e sudoríparas da vulva.

Por outro lado, os resultados aqui descritos reportam pela primeira vez, que os infiltrados inflamatórios e alterações estruturais na cérvix e tecido uterino de cadelas naturalmente infectadas por *L. infantum* não estão restritas ao segmento externo da genitália como descritos por Silva et al. (2008).

Os resultados de imunomarcção obtidos no presente trabalho estão de acordo com Silva et al. (2008) que demonstraram formas amastigotas de *L. infantum* somente na vulva e vagina, dentre os órgãos do sistema reprodutor, de cadelas com LV.



**Figura 7** – Correlação de Spearman entre qPCR (“score”) e HE para o tecido do corpo do útero.

A exposição constante da genitália externa ao ambiente torna esse segmento do trato genital altamente susceptível a inflamações e, portanto, macrófagos parasitados com *L. infantum* poderiam eventualmente ser atraídos para focos com inflamação prévia (SILVA et al., 2008).

Por outro lado, os resultados aqui descritos são discordantes daqueles obtidos por Rosypal et al. (2005), que observaram formas amastigotas de *L. infantum* no útero de uma cadela infectada.

Segundo Tafuri et al. (2004), formas amastigotas de *L. infantum*, detectadas via IHQ, podem ter uma ampla distribuição em tecidos de cães, porém, em se tratando de trato genital feminino, o parasito está restrito a genitália externa, onde encontramos uma carga parasitária maior, em comparação a observada na vagina. Tal afirmação corrobora com os achados descritos por Silva et al. (2008).

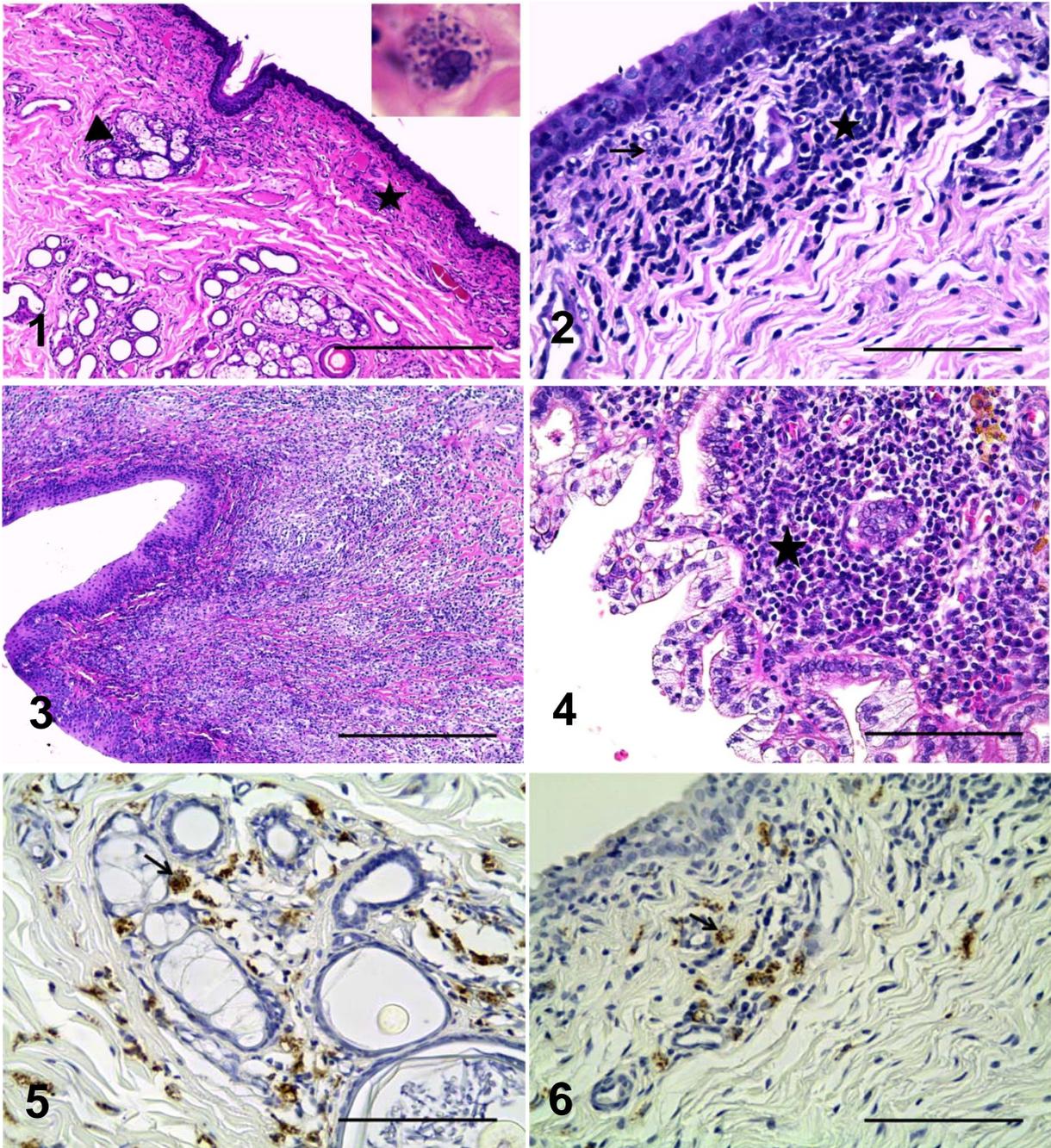
Com relação à ausência de formas amastigotas de *L. infantum* nos ovários, tubas uterinas, cornos uterinos, corpo do útero e cérvix, poucos autores têm descrito o parasito nestes órgãos. As formas amastigotas de *L. infantum* encontradas no útero (ROSYPAL et al., 2005) e na placenta (DUBEY et al., 2005) constituem achados raros, não se caracterizando desta forma, juntamente com os ovários, em local de predileção do parasito.

A presença de formas amastigotas de *L. infantum* na vagina e a ausência das mesmas ao longo do tecido uterino podem ser relacionadas à possível transmissão venérea. Por outro lado, relacionar a transmissão vertical via canal do parto (transvaginal) seria pouco provável, uma vez que, a transmissão via transplacentária foi

observada em fetos de fêmeas naturalmente infectadas por *L. infantum* (PANGRAZIO et al., 2009) e a transmissão vertical via vaginal ainda carece de comprovação científica.

A detecção de DNA de *L. infantum* na genitália tanto interna como externa e a ausência de correlação entre a carga parasitária por qPCR e alterações estruturais (HE) demonstrada pelo teste de correlação de Spearman indicam que a carga parasitária não está relacionada ao desencadeamento de reação inflamatória nesses tecidos, havendo inclusive uma correlação inversa no tecido do corpo do útero.

De acordo com os resultados, é possível concluir que os principais locais de desenvolvimento de lesões e imunomarcção de formas amastigotas de *L. infantum* no trato reprodutor de cadelas são a vulva e a vagina, não existindo, porém, correlação entre carga parasitária e lesão inflamatória nestes órgãos e ainda na cérvix, corpo e cornos uterinos.



**Figura 1** – Vulva. Infiltrado inflamatório mononuclear moderado difuso na derme papilar (estrela), periglandular e perifolicular (cabeça de seta). HE. Detalhe: macrófago contendo formas amastigotas de *L. infantum*. Barra = 400µm.

**Figura 2** – Processo inflamatório vaginal (estrela) com macrófago contendo formas amastigotas de *L. infantum* (seta). HE. Barra = 100µm.

**Figura 3** – Cérvix. Infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário intenso e difuso. HE. Barra = 400µm.

**Figura 4** – Corpo do útero. Infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário intenso no endométrio (estrela). HE. Barra = 100µm.

**Figura 5** – Formas amastigotas de *L. infantum* na vulva (seta). Complexo estreptavidina-peroxidase. Barra = 100µm.

**Figura 6** – Formas amastigotas de *L. infantum* na vagina (seta). Complexo estreptavidina-peroxidase. Barra = 100µm.

## REFERÊNCIAS

- BARATA, R.A. et al. Phlebotomine sandflies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 481-487, 2004.
- BARROUIN-MELO, S.M. et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **Veterinary Journal**, v. 171, n. 2, p. 331-339, 2006.
- BOGGIATTO, P.M. et al. Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, p. 1019, 2011.
- CATONE, G. et al. Canine transmissible venereal tumor parasitized by *Leishmania infantum*. **Veterinary Research Communications**, v. 27, n. 7, p. 549-553, 2003.
- DIAZ, M.P. et al. Lesiones testiculares y epididimarias en La leishmaniasis visceral canina, de presentacion natural. **Higia Pecoris**, v. 4, n. 10, p. 5-25, 1982.
- DUBEY, J.P. et al. Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n.8, p. 1266–1269, 2005.
- FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3-4, p. 214-221, 2006.
- LIMA, V.M.F. et al. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 4, p. 485-489. 2003.
- MASUCCI, M. et al. Canine leishmaniasis in the newborn puppy. **Veterinary Research Communications**, v. 27, suple. 1 p. 771–774, 2003.
- MICHALICK, M.S.M & GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. (Ed). **Parasitologia humana**. 11º ed., Ed. Atheneu, São Paulo, 2005. p. 56-72.
- MOREIRA, M. A. B. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of *Leishmaniasis* in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 245-252, 2007
- NAUCKE, T.J. & LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 67, p. 1-5, 2012.
- NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**, v. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.
- OLIVEIRA, V.V.G.; ALVES, L.C.; SILVA JUNIOR, V.A. Patologias genitais associadas à leishmaniose visceral canina. **Ciência Rural**, v.42, n. 9, p.1614-1620, 2012.

PANGRAZIO, K.K. et al. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 3-4, p. 327-331, 2009.

R CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2012. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 22 nov., 2012.

ROSYPAL, A.C. et al. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in a experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 970–972, 2005.

SILVA, F.L. et al. Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 151, n.1, p. 86–90, 2008.

SILVA, F.L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 55-59, 2009.

TAFURI, W.L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.

TOLOSA, E.M.C. et al. **Manual de técnicas histológicas normal e patológica**. São Paulo: Manole, 2003. 331p.

QUEIROZ, N.M.G.P. et al. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunohistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 34-40, 2010.

## **CAPITULO II**

### **ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA (qPCR) NO SISTEMA GENITAL DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum***

## **Análise histopatológica e quantificação da carga parasitária (qPCR) no sistema genital de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum***

*Histopathological analysis and parasite quantification (qPCR) in the male dog's genital system naturally infected by Leishmania (Leishmania) infantum*

### **RESUMO**

A Leishmaniose Visceral é uma importante zoonose parasitária endêmica no Brasil causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, sendo transmitida primariamente por flebotomíneos. A doença, no cão, está presente em diferentes órgãos e sistemas, inclusive no sistema genital. No entanto, o tropismo da *L. infantum* pelos órgãos genitais masculinos e sua associação com a carga parasitária e alterações estruturais nestes órgãos ainda é uma questão controversa. Desta forma, considerando a ausência de estudos sobre a relação entre carga parasitária e lesões no trato genital de cães, o objetivo deste trabalho foi de avaliar a associação entre as alterações estruturais, marcação imunohistoquímica e carga parasitária por meio da PCR em tempo real em órgãos do sistema reprodutor masculino de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Para tanto, foram coletados fragmentos de testículos, epidídimos, próstata, glândula, prepúcio e escroto de 19 cães adultos não senis positivos para Leishmaniose Visceral. Para os espécimes coletados realizaram-se avaliações estruturais, imunohistoquímica e molecular por meio da PCR em tempo real. Todas as amostras foram provenientes do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Petrolina, Pernambuco, Brasil. Lesões microscópicas associadas com imunomarcagem de formas amastigotas do parasito foram observadas no testículo, epidídimo, prepúcio e escroto enquanto alterações estruturais sem imunomarcagem foram observadas em todos os órgãos. Por outro lado, DNA do parasito foi encontrado em todos os órgãos, sendo encontrada maior carga parasitária nos testículos, epidídimos, glândula e próstata. Os testículos apresentaram a maior carga parasitária, porém foram os que apresentaram menor grau de lesões inflamatórias. Desta forma, pode-se concluir que os principais locais de desenvolvimento de lesões inflamatórias são epidídimo, próstata, glândula, prepúcio e escroto, além de processos degenerativos em nível testicular, não existindo, porém, correlação entre carga parasitária e lesão inflamatória nestes órgãos.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral Canina, alterações estruturais, patologias genitais, imunohistoquímica.

### **ABSTRACT**

The Visceral Leishmaniasis is an important parasitic zoonosis endemic in Brazil caused by *Leishmania infantum*, is primarily transmitted by sandflies. The disease, in dogs, is present in different organs and systems, including the genital system. Otherwise, *L. infantum* tropism by the male genital system, its association with the parasite load and structural changes in these organs is still remains a controversial issue. Therefore, the major aim of this study was to evaluate the association between structural changes,

labeling immunohistochemistry and parasite load by real time PCR in organs the male reproductive system of dogs naturally infected with *L. infantum*. Fragments of testes, epididymis, prostate, glans penis, prepuce and scrotum were collected from 19 adult dogs not senile positive for Visceral Leishmaniasis from the Zoonosis Control Center of the Municipality of Petrolina, Pernambuco, Brazil. All samples collected were evaluated by histopathology description, immunohistochemistry and molecular through real-time PCR. Microscopic lesions associated with immunostaining to amastigotes forms of *L. infantum* were observed in the testis, epididymis, prepuce and scrotum while structural changes were observed in all organs. On the other hand, parasite DNA was found in all organs but, testes, epididymis, and prostate gland showed higher parasite load. The testes showed greatest parasite load when compared with other organs, though with lowest degree of lympho-histio-plasmacytic inflammatory lesions. Otherwise, testicular degenerative processes were related with inflammatory lesions without correlation with parasite load. In conclusion, the lympho-histio-plasmacytic inflammatory lesions had no correlation with parasite load in testes, epididymis, prostate, glans penis, prepuce and scrotum in dog naturally infected by *L. infantum*.

Key words: Canine Visceral Leishmaniasis, structural changes, genital pathologies, immunohistochemistry.

## 1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma importante zoonose parasitária (COSTA, 2008) causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (SHAW, 1994) e tem os cães como os principais reservatórios do parasito no ambiente urbano no Brasil (DINIZ et al., 2008).

A transmissão da LV entre mamíferos é essencialmente vetorial (BARATA et al., 2004), embora existam hipóteses de transmissão direta de cão a cão, como a transmissão vertical transplacentária em cadelas (BOGGIATTO et al., 2011; DUBEY et al., 2005; MASUCCI et al., 2003; NAUCKE & LORENTZ, 2012; PANGRAZIO et al., 2009; ROSYPAL et al., 2005), bem como a transmissão venérea (NAUCKE & LORENTZ, 2012; SILVA et al., 2009).

Na esfera reprodutiva, cães machos naturalmente infectados podem desenvolver lesões específicas principalmente nos testículos, epidídimo, próstata, glande e prepúcio com presença de *L. infantum* em todos estes órgãos e no sêmen (AMARA et al., 2009; MANNA et al., 2012; MIR et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012). Estas lesões são caracterizadas por infiltrados inflamatórios linfocitoplasmocitários (DINIZ et al., 2005). Além da lesão classicamente descrita para *L. infantum* em glande,

pode-se observar tumor venéreo transmissível parasitados por formas amastigotas do parasito (CATONE et al., 2003).

No entanto, o tropismo da *L. infantum* pelos órgãos genitais masculinos e sua associação com a carga parasitária e alterações estruturais nestes órgãos ainda é uma questão controversa. Desta forma, considerando a ausência de estudos sobre a associação entre carga parasitária e lesões no trato genital de cães machos com LV, o objetivo deste trabalho foi de avaliar as alterações estruturais, marcação imunohistoquímica (IHQ) e carga parasitária por meio da PCR em tempo real (qPCR) em órgãos do sistema reprodutor de cães machos naturalmente infectados por *L. infantum*.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

Foram utilizados fragmentos de testículos, epidídimos, próstata, glândula, prepúcio e escroto de 19 cães adultos não senis, sem raça definida, soropositivos a anticorpos anti-*L. infantum* (RIFI  $\geq$  40) e/ou com presença de formas amastigotas de *L. infantum* na biopsia de medula óssea. As amostras teciduais foram provenientes do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Petrolina, Pernambuco, Brasil. Estas, por sua vez, foram submetidos a análises histopatológica, imunohistoquímica e molecular por meio da qPCR.

### **2.2 HISTOPATOLOGIA**

Após a coleta, o material foi fixado em solução de formalina tamponada a 10% por 24 a 48 horas. Após a fixação, as amostras foram submetidas a processamento histológico de rotina para inclusão em parafina. Cortes de 5  $\mu$ m foram montados em lâmina e corados por Hematoxilina e Eosina (HE) (TOLOSA et al., 2003). Na análise histopatológica, os cortes foram analisados e descritos quanto à presença de infiltrados inflamatórios, onde foi estipulado um “score” de acordo com a intensidade das reações inflamatórias e o comprometimento do órgão avaliado segundo a Tabela 1.

## 2.3 IMUNOHISTOQUÍMICA

O mesmo material coletado para análise histopatológica foi processado para imuno-deteção de formas amastigotas de acordo com a metodologia descrita por Tafuri et al. (2004), com a utilização de soro hiperimune de cão como anticorpo primário e sistema de deteção a base de estreptavidina-biotina-peroxidase disponível comercialmente (LSAB+ kit, Dako USA). A marcação foi revelada com diaminobenzidina (DAB).

O número de formas amastigotas imunomarcadas foi pontuado de 0 a 3 segundo número de formas amastigotas por campo de maior ampliação microscópica (Tabela 1).

**Tabela 1.** Intensidade das reações inflamatórias e o comprometimento do órgão avaliado para a variável HE e para a determinação do número de formas amastigotas imunomarcadas através da IHQ.

“Score”	HE	IHQ
0	Nenhuma inflamação	Nenhuma forma amastigota detectada
1	Inflamação discreta	1 – 3 formas amastigotas por campo de maior amplificação microscópica
2	Inflamação moderada	4 – 10 formas amastigotas por campo de maior amplificação microscópica
3	Inflamação intensa	>10 formas amastigotas por campo de maior amplificação microscópica

## 2.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

### 2.4.1 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico do material coletado foi extraído utilizando-se o DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen® Hilden-Germany), de acordo com as instruções do fabricante.

### 2.4.2 qPCR

A reação para deteção de DNA de *L. infantum* foi realizada utilizando-se os *primers* LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-

ACCCCCAGTTTCCCGCC-3') e a sonda TaqMan-MGB probe (FAM- 5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'- non-fluorescent quencher-MGB) descritos por Francino et al. (2006).

Cada reação (12,5µl) continha 6,25µl de Taqman® Universal PCR Master Mix, cada *primer* na concentração de 900nM, sonda na concentração de 200nM, e 50ng de DNA molde.

O protocolo de amplificação constituiu-se de uma desnaturação inicial de 95°C por 3 min seguidas de 42 ciclos de desnaturação (95°C por 10 seg) e anelamento-extensão (60°C por 30 seg). Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata contendo em cada bateria de reação controle negativo (DNA de cão proveniente de área não endêmica) e positivo (DNA proveniente de cultura *in vitro* de *L. infantum*).

Parasitas foram quantificados pelo método de quantificação absoluta. Uma curva padrão foi construída com diluições de DNA de *L. infantum* provenientes de cultura contendo aproximadamente  $5,6 \times 10^6$  parasitos/mL. Considerando-se uma eficiência de extração de 100%, oito diluições seriadas do estoque de DNA foram realizadas em água livre de nucleases. Cinco pontos foram utilizados para construção da curva (0,1, 1, 10, 1.000 e 1.000.000 parasitos/mL).

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A carga parasitária (qPCR), o número de formas amastigotas imunomarcadas (IHQ) e o “score” de inflamação (HE) foram comparadas pelo teste de Kuskal-Wallis. A análise de correlação entre esses “scores” foi realizada com o teste de correlação de Spearman e para diferenciação entre técnicas de diagnóstico, independente do tecido, foi utilizado o teste exato de Fisher. Todas estas análises foram realizadas com o software R versão 2.15.2 (R CORE TEAM, 2012).

Para realização do teste de Spearman os valores de qPCR (parasitos/mL) foram transformados em “scores” seguindo o seguinte critério: 0 = 0; 0.001-0.01 = 1; >0.01-0.1 = 2; >0.1-1 = 3; >1-2 = 4; >2-5 = 5; >5-6=6; >6-7=7; ...; >100 = 100.

## 7 RESULTADOS

Foram observados abscesso e edema de prepúcio e escroto e flacidez testicular em um cão. Outro cão apresentou monorquidia unilateral direita, com o testículo sendo encontrado intra-abdominalmente. Por outro lado, não foram observadas lesões macroscópicas na genitália tanto interna como externa de nenhum dos outros cães examinados.

Em relação às lesões microscópicas nos testículos, 26.3% (10/38) apresentaram infiltrados inflamatórios linfohistioplasmocitários intensos no interstício (Tabela 2), enquanto 68.4% (26/38) apresentaram algum grau de degeneração testicular. Por outro lado, 80 % (8/10) dos cães que possuíam infiltrado inflamatório intersticial também apresentavam variado grau de degeneração tubular (Figura 1).

Com relação ao tecido intersticial epididimário, foi observada reação inflamatória mononuclear linfohistioplasmocitária discreta em 36.8% (14/38), moderada em 15.8% (6/38) e intensa em 15.8% (6/38) (Figura 2) (Tabela 2). Além disso, constatou-se redução de 21% (8/38) no conteúdo espermático na cauda ducto epididimário e invasão linfocitária do epitélio de revestimento em 5.2% (2/38) dos animais avaliados.

Na próstata, os infiltrados inflamatórios do tipo crônico foram observados em 84.2% (16/19) dos animais analisados (Figura 3) (Tabela 2). Outros achados como adenocarcinoma (31.6%; 6/19) (Figura 4), hiperplasia prostática (15.8%; 3/19), cistos (15.8%; 3/19) e metaplasia (5.2% /1/19) foram descritos nos animais avaliados neste trabalho.

Por sua vez, na lâmina própria-submucosa do epitélio de revestimento da glândula e lâmina própria da uretra peniana, discretos infiltrados inflamatórios linfohistioplasmocitários foram observados em 42.1% (8/19). Por outro lado, 36.8% (7/19) dos infiltrados inflamatórios nestas mesmas regiões foram classificados como moderado (Tabela 2).

Em 89.5% (17/19) dos cães analisados encontrou-se infiltrado inflamatório crônico de grau moderado no prepúcio composto por macrófagos, linfócitos e plasmócitos (Tabela 2).

Com relação ao tecido escrotal foi observada reação inflamatória variando de discreta a moderada composta por macrófagos, plasmócitos e linfócitos em 84.2% (16/19) (Tabela 2). Além deste achado, notou-se presença de grande número de macrófagos preenchidos com pigmento de melanina em 47.3% (9/19) do tecido escrotal avaliado. Estes macrófagos estavam adjacentes a áreas de epitélio de revestimento escrotal com hiperpigmentação de estrato basal e espinhoso (Figura 5).

No que concerne à imunomarcção, formas amastigotas de *L. infantum* foram observadas em 5.2% (2/38) do testículo (Figura 6), 2.6% (1/38) do epidídimo, 5.2% (1/19) do prepúcio e 5.2% (1/19) do escroto. Por outro lado, não foi observada marcação imunohistoquímica de formas amastigotas de *L. infantum* na próstata e glândula (Tabela 2).

Com relação ao resultado da qPCR, a presença de DNA de *L. infantum* foi detectada em 94.7% (18/19) dos animais em pelo menos uma das amostras testadas (testículos, epidídimos, próstata, glândula, prepúcio e/ou escroto). Nos testículos, epidídimos e próstata se constatou positividade das amostras na ordem de 89.5% (17/19), 84.2% (16/19), 78.9% (15/19), respectivamente. Da mesma forma, as amostras provenientes da glândula, prepúcio e escroto foram positivas na ordem de 78.9% (15/19), 47.4% (9/19) e 36.8 % (7/19), respectivamente, como descrito na tabela 2.

**Tabela 2.** Valores absolutos e relativos das lesões histopatológicas (HE), imunomarcções teciduais e positividade via qPCR dos órgãos do sistema genital masculino de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

Órgão	HE			IHQ	qPCR
	Discreto	Moderado	Intenso		
Epidídimo (n=38)	14 (36.8%)	6 (15.8%)	6 (15.8%)	1 (2.6%)	16 (84.2%)*
Escroto (n=19)	8 (42.1%)	7 (36.8%)	1 (5.2%)	1 (5.2%)	7 (36.8%)
Glândula (n=19)	8 (42.1%)	7 (36.8%)	0	0	15 (78.9%)
Prepúcio (n=19)	5 (26.3%)	9 (47.3%)	3 (15.8%)	1 (5.2%)	9 (47.4%)
Próstata (n=19)	4 (21.0%)	10 (52.6%)	2 (10.5%)	0	15 (78.9%)
Testículo (n=38)	2 (5.2%)	2 (5.2%)	6 (15.8%)	2 (5.2%)	17 (89.5%)*

\* Nestes casos, a amostra foi composta por 19 fragmentos (n=19).

Pelo teste de Kruskal-Wallis foram detectadas diferenças significativas entre os órgãos em relação às quantidades de parasitos na qPCR ( $p = 0.0197$ ) e em relação ao “score” de inflamação na HE ( $p = 0.0100$ ). Entretanto, não foram observadas diferenças entre órgãos utilizando a técnica IHQ ( $p = 0.8414$ ).

Quanto à qPCR, observa-se que os maiores valores foram encontrados nos tecidos dos epidídimos e testiculares, embora estes não tenham apresentado diferença significativa em relação aos tecidos da glândula e da próstata. Em relação a HE, destaca-se o tecido do testículo como aquele que apresentou os menores valores, embora diferença significativa não tenha sido observada com relação aos tecidos do epidídimo e da glândula. Com base nos resultados do teste IHQ não foi possível detectar diferença significativa entre os tecidos analisados (Tabela 3).

O teste de correlação de Spearman não detectou correlação significativa entre qPCR (“score”) e HE para os tecidos analisados (tabela 4).

No presente trabalho foi possível constatar pelo teste exato de Fisher ( $p < 0.001$ ) que o método qPCR (0.31) foi mais eficiente na detecção de positividade de tecidos infectados por amastigotas quando comparado com IHQ (0.96).

## 8 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi demonstrado que a LV em cães está associada a uma alta frequência de lesões inflamatórias em órgãos genitais, notadamente no epidídimo, próstata, glândula, prepúcio e escroto.

Nos testículos, interrupção do processo espermatogênico pode estar relacionado a diversos fatores tais como: endócrinos, farmacológicos, térmicos, quimioterápicos, radioterápicos, nutricionais e microbiológicos (Nascimento & Santos, 2003).

**Tabela 3.** Teste de Kruskal-Wallis e comparações entre ranks médios de cada órgão para as variáveis qPCR, IHQ e HE.

	qPCR	IHQ	HE	
Kruskal-Wallis	13.41	2.05	15.07	
GL	5	5	5	
Valor p	0.0197	0.8414	0.0100	
Comparações de ranks médios				
Órgão	Epidídimo	67.03 a	58.47 a	53.66 ab
	Escroto	38.95 c	58.58 a	59.89 a
	Glândula	64.37 ab	55.50 a	55.05 ab
	Prepúcio	45.71 bc	58.47 a	71.55 a
	Próstata	60.55 ab	55.50 a	68.55 a
	Testículo	68.39 a	58.47 a	36.29 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente ( $p > 0.05$ ).

**Tabela 4.** Valores-p para correlação entre qPCR (carga parasitária) e HE (nível de inflamação) por tecido.

Valores-p	Tecidos					
	Testículo	Epidídimo	Próstata	Glande	Prepúcio	Escroto
	0.346	0.259	0.799	0.260	0.234	0.166

Na LV canina, lesões inflamatórias crônicas têm sido observadas na região intertubular do testículo (DINIZ et al., 2005). No presente trabalho foram observadas lesões inflamatórias testiculares em somente 26.3% (10/38) dos animais avaliados. Entretanto, demonstrou-se que a degeneração tubular foi frequente em animais positivos e que 80 % (8/10) dos cães que possuíam infiltrados inflamatórios também apresentavam degeneração testicular. De acordo com Nascimento & Santos (2003), o processo degenerativo do epitélio germinativo pode ser desencadeado como consequência de reação inflamatória e aumento de temperatura testicular.

Segundo Manna et al., (2012), a forma amastigota da *L. infantum* no testículo aparentemente atua como agente desencadeador da resposta inflamatória. Infecções experimentais em hamster com *L. donovani* resultou em amiloidose testicular, degeneração, atrofia progressiva, e azoospermia. Neste mesmo modelo experimental, as alterações degenerativas também foram associadas com infiltração de linfócitos e macrófagos contendo formas amastigotas do parasito no testículo (GONZALEZ et al., 1983).

Vale ressaltar que formas amastigotas de *L. infantum* não foram detectadas no lume e epitélio germinativo dos túbulos seminíferos, e embora tenham sido observadas alterações degenerativas, eles permaneceram morfológicamente intactos em todos os cães assim como descrito por Diniz et al. (2005).

Com relação ao resultado da qPCR, pode-se observar pelo teste de Kruskal-Wallis que o tecido testicular apresentou a maior carga parasitária, sendo que Manna et al. (2012) observou também pelo mesmo método diagnóstico carga parasitária elevada neste tecido. Apesar de o testículo apresentar maior carga parasitária via qPCR, isto não se refletiu na intensidade das alterações inflamatórias. Neste órgão constatou-se menor intensidade das alterações inflamatórias em comparação com os demais tecidos genitais masculinos, contudo nenhuma correlação foi observada pelo teste de Spearman. Desta maneira pode-se inferir que a alta carga parasitária no tecido testicular, ao contrário do que foi descrito por Manna et al. (2012), não tem relação com a reação inflamatória e lesões degenerativas testiculares. Por outro lado, a alta carga parasitária e infiltrado

linfocitoplasmocitário não garante a presença de imunomarcagem de formas amastigotas em macrófagos como descrito por Xavier et al. (2006).

Com relação às alterações inflamatórias do tecido epididimário, os resultados do presente estudo são semelhantes aos obtidos por Diniz et al. (2005), os quais descreveram infiltrados inflamatórios linfocitoplasmocitários no epidídimo de cães. Da mesma forma, foi descrito no presente estudo diminuição da massa espermática concordando assim com Diaz et al. (1982), que descreveram azoospermia, sendo este um estágio mais avançado do grau de alteração epididimária.

Por outro lado, a presença de linfócitos invadindo o epitélio do ducto epididimário descritos aqui, pode aumentar a possibilidade de presença de formas amastigotas de *L. infantum* no sêmen de cães, uma vez que a epididimite é frequentemente associada com a presença de células inflamatórias no sêmen destes animais (NELSON & COUTO, 1994), favorecendo a transmissão venérea da doença (NAUCKE & LORENTZ, 2012; SILVA et al., 2009).

Na próstata, os resultados aqui descritos são discordantes dos obtidos por Diniz et al. (2005), os quais descreveram frequência muito baixa de alterações inflamatórias na próstata. Por outro lado, outros autores descreveram prostatite como sendo um achado em cão infectado (MIR et al., 2012), concordando assim com os resultados aqui relatados. Todavia, os resultados aqui obtidos descrevem pela primeira vez a ocorrência de adenocarcinoma, hiperplasia, cistos e metaplasia em próstata de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

As doenças prostáticas são comuns em cães, desenvolvendo-se após a maturidade sexual. Entre as afecções que acometem a próstata desses animais, a mais frequente é a hiperplasia prostática benigna (SMITH, 2008). Por outro lado, a prostatite aqui relatada em cães naturalmente infectados por *L. infantum* pode estar associada às demais alterações encontradas, notadamente ao adenocarcinoma, uma vez que, em humanos, associações de prostatite com câncer de próstata sugerem que as infecções podem representar um mecanismo através do qual o câncer de próstata pode se desenvolver (LESLIE et al., 2002).

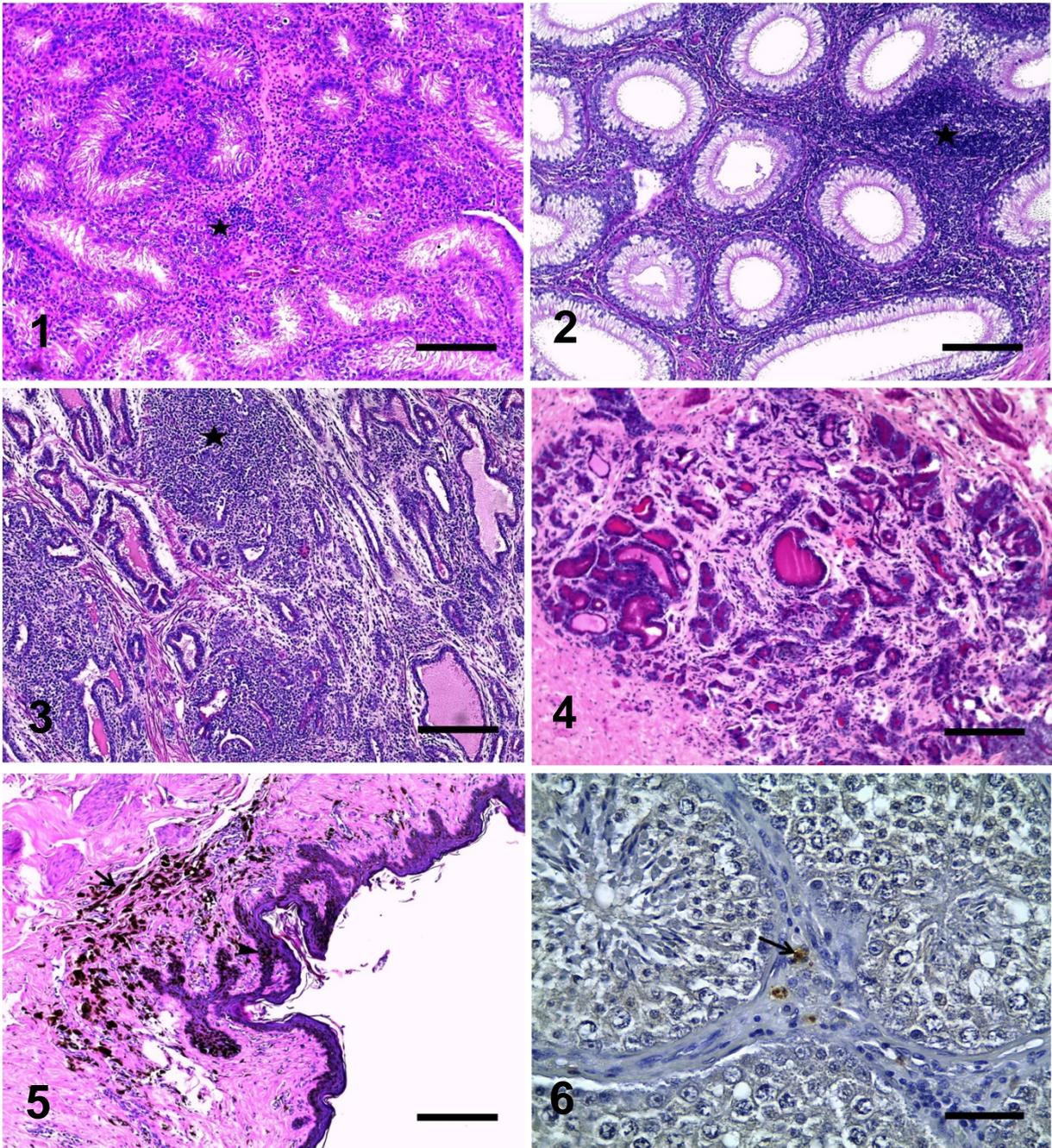
Na glândula e prepúcio, os achados histopatológicos são semelhantes aos obtidos por Diniz et al. (2005), os quais descreveram reação inflamatória linfocitoplasmocitária. A alta frequência de inflamação associada com a presença de formas amastigotas de *L. infantum* na glândula e prepúcio, pode também contribuir para o aparecimento do parasito no sêmen (DINIZ et al., 2005) favorecendo a transmissão

venérea da doença (NAUCKE & LORENTZ, 2012; SILVA et al., 2009). Contudo, nestas estruturas a carga parasitária e a intensidade de imunomarcção para amastigotas não estão diretamente correlacionadas com o infiltrado inflamatório crônico observado no tecido conjuntivo.

No escroto, a reação inflamatória encontrada é semelhante às dermatopatias encontradas nesta espécie (SOLANO-GALLEGO et al., 2009), contudo a presença de macrófagos ingurgitados com pigmento de melanina é uma questão ainda controversa, pois não existem fatores pró ou inflamatórios relacionados com melanogênese em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Além disso, a hiperpigmentação é um sinal clínico comumente descrito em humanos (NEGHINA et al., 2009), mas não em cães.

A detecção de DNA de *L. infantum* na genitália tanto interna como externa e a ausência de correlação entre a carga parasitária por qPCR e alterações estruturais (HE) demonstrada pelo teste de correlação de Spearman indicam que a carga parasitária não está relacionada ao desencadeamento de reação inflamatória nesses tecidos

De acordo com os resultados, é possível concluir que os principais locais de desenvolvimento de lesões inflamatórias no trato reprodutor de cães naturalmente infectados por *L. infantum* são epidídimo, próstata, glândula, prepúcio e escroto, além de processos degenerativos em nível testicular, não existindo, porém, correlação entre carga parasitária e lesão inflamatória nestes órgãos.



**Figura 1** – Testículo. Infiltrado inflamatório crônico e difuso (estrela). Observar degeneração testicular e atrofia de túbulos seminíferos. HE. Barra = 200 $\mu$ m.

**Figura 2** – Epidídimo. Processo inflamatório difuso e intenso ao longo do interducto (estrela). HE. Barra = 200 $\mu$ m.

**Figura 3** – Próstata. Infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário difuso (estrela). HE. Barra = 200 $\mu$ m.

**Figura 4** – Próstata. Adenocarcinoma moderadamente diferenciado. HE. Barra = 200 $\mu$ m.

**Figura 5** – Escroto. Infiltrado inflamatório discreto ao longo da derme papilar. Observar macrófagos ingurgitados com melanina (seta) e hiperpigmentação de estrato basal e espinhoso no epitélio (cabeça de seta). HE. Barra = 200 $\mu$ m.

**Figura 6** – Formas amastigotas de *L. infantum* no interstício testicular (seta). Complexo estreptavidina-peroxidase. Barra = 50 $\mu$ m.

## REFERÊNCIAS

- AMARA, A. et al. Etude histologique des lésions testiculaires chez les chiens leishmaniens. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 160, n. 1, p. 54-60, 2009.
- BARATA, R.A. et al. Phlebotomine sandflies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 481-487, 2004.
- BOGGIATTO, P.M. et al. Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, p.1019, 2011.
- CATONE, G. et al. Canine transmissible venereal tumor parasitized by *Leishmania infantum*. **Veterinary Research Communications**, v. 27, n. 7, p. 549-553, 2003.
- COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2959- 2963, 2008.
- DIAZ, M.P. et al. Lesiones testiculares y epididimarias en La leishmaniasis visceral canina, de presentacion natural. **Higia Pecoris**, v. 4, n. 10, p. 5-25, 1982.
- DINIZ, S.A. et al. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 5, p. 650-658, 2005.
- DINIZ, S.A. et al. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 1, p. 24-33, 2008.
- DUBEY, J.P. et al. Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 8, p.1266-1269, 2005.
- FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3-4, p. 214-221, 2006.
- GONZALEZ, J.L. et al. Testicular amyloidosis in hamsters experimentally infected with *Leishmania donovani*. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 64, n. 5, p. 518-523, 1983.
- LESLIE, K. et al. Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. **Urology**, v. 60, n. 1, p. 78-83, 2002.
- MANNA, L. et al. Detection of *Leishmania* parasites in the testis of a dog affected by orchitis: case report. **Parasites & Vectors**, v. 216, n. 5, p. 1-4, 2012.
- MASUCCI, M. et al. Canine leishmaniasis in the newborn puppy. **Veterinary Research Communications**, v. 27, suple. 1, p. 771-774, 2003.
- MIR, F. et al. Subclinical leishmaniasis associated with infertility and chronic prostatitis in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 53, n. 7, p. 419-422, 2012.

- NASCIMENTO, E.F. & SANTOS, R.L. **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003. 156p.
- NAUCKE, T.J. & LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 67, p. 1-5, 2012.
- NEGHINA, R. et al. Importation of visceral leishmaniasis in returning Romanian workers from Spain. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 1, p. 35-39, 2009.
- NELSON, R.W. & COUTO, C.G. **Fundamentos de Medicina Interna de Pequenos Animais**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brazil, 1994. 737p.
- OLIVEIRA, V.V.G.; ALVES, L.C.; SILVA JUNIOR, V.A. Patologias genitais associadas à leishmaniose visceral canina. **Ciência Rural**, v.42, n. 9, p.1614-1620, 2012.
- PANGRAZIO, K.K. et al. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 3-4, p. 327–331, 2009.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2012. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 22 nov., 2012.
- ROSYPAL, A.C. et al. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in a experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 970-972, 2005.
- SHAW, J.J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 471-478, 1994.
- SILVA, F.L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 55-59, 2009.
- SMITH, J. Canine prostatic disease: a review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 375-383, 2008.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1, p. 1-18, 2009.
- TAFURI, W.L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.
- TOLOSA, E.M.C. et al. **Manual de técnicas histológicas normal e patológica**. São Paulo: Manole, 2003. 331p.

XAVIER, S.C. et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Veterinary Research**, v. 2, n. 17, p. 1-7, 2006.

**CAPITULO III**

**PATOLOGIAS GENITAIS ASSOCIADAS À LEISHMANIOSE VISCERAL  
CANINA**

**(Artigo publicado na Ciência Rural, v.42, n. 9, p.1614-1620, 2012)**

## Patologias genitais associadas à leishmaniose visceral canina

### Genital pathologies associated with canine visceral leishmaniasis

#### -REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-

#### RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença parasitária crônica causada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. No Brasil, a transmissão se dá, principalmente, pela ação hematófaga de insetos vetores pertencentes à subfamília Phlebotominae, particularmente, a espécie *Lutzomyia longipalpis*. Todavia, a transmissão vertical e venérea da LVC está presente. Os principais sinais clínicos observados nos animais acometidos pela LVC são linfadenomegalia, dermatopatias, hepatoesplenomegalia, onicogribose e oftalmopatias, contudo quadros atípicos podem ser observados, inclusive com o envolvimento do sistema genital. Dessa forma, o objetivo deste artigo é realizar revisão sobre as principais patologias genitais em cães machos e fêmeas com leishmaniose visceral (LV).

Palavras-chave: *Leishmania* sp, cães, alterações estruturais, sistema genital.

#### ABSTRACT

The canine visceral leishmaniasis (CanL) is a chronic parasitic disease caused by protozoa belonging to the genus *Leishmania*. In Brazil, the transmission occurs mainly by the action of blood-sucking insects belonging to the subfamily *Phlebotominae*, particularly the *Lutzomyia longipalpis* species. However, the venereal and vertical transmission of the CanL is present. The main clinical signs observed in animals affected by the CanL are lymphadenopathy, skin diseases, hepatosplenomegaly, onychogryphosis and ophthalmopathy, however atypical manifestations can be observed, including the involvement of the genital system. Thus, the aim of this paper is to review on the major pathologies in genital male and female dogs with visceral leishmaniasis (VL).

Key words: *Leishmania* sp, dogs, structural changes, genital system.

## 1 INTRODUÇÃO

A LV é uma zoonose parasitária relatada em mais de 88 países (TOZ et al., 2009), acometendo o homem e diversas espécies de mamíferos silvestres e domésticos,

provocando variadas manifestações clínicas (FIGUEIREDO et al., 2009). Ela é ocasionada por protozoários da família Trypanosomatidae, os quais, uma vez dentro do organismo dos mamíferos, apresentam tropismo pelo sistema mononuclear fagocitário (NEVES, 2005).

O protozoário causador da LV pertence ao gênero *Leishmania*, agrupado no complexo donovani, incluindo *Leishmania donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo e *L. chagasi* no Novo Mundo (SHAW, 1994). Entretanto, estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram a *L. chagasi* e a *L. infantum* uma única espécie (MAURICIO et al., 2000). Dessa forma, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, o nome *L. infantum* prevalece por ter sido primeiramente descrito.

A doença acomete mais de 350 milhões de pessoas em diversos países (HOSSAIN & JAMIL, 2011), sendo que, no Brasil, a LV tem se expandido e encontra-se urbanizada em decorrência de alterações ambientais antropogênicas e da rápida e intensa migração de populações rurais às periferias urbanas (MAIA-ELKHOURY et al., 2008; LAURENTI, 2009; COLOMBO et al., 2011). A falta de saneamento e infraestrutura adequados, associada à simultânea interação e mobilização de reservatórios silvestres e cães infectados, vem acarretando no aumento do número de casos humanos e num elevado número de cães positivos em vários estados do país (GONTIJO & MELO, 2004).

A doença é considerada endêmica em 21 estados da federação brasileira, destacando-se aqueles da região Nordeste, responsáveis por 50% dos casos anuais do país (DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006; AGUIAR, et al., 2007), sendo os estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí os mais acometidos (MENDES et al., 2002; COSTA, 2008; ALBUQUERQUE, et al., 2009).

Embora várias espécies selvagens possam ser potencialmente infectadas (LUPPI et al., 2008), o cão doméstico é o principal reservatório da LV no novo mundo, particularmente em áreas urbanas (DINIZ et al., 2008), onde a transmissão se dá pela ação hematófaga de insetos vetores pertencentes à subfamília Phlebotominae (MARZOCHI et al., 1985), particularmente, a espécie *Lutzomyia longipalpis* (BARATA et al., 2004). Todavia, a transmissão vertical transplacentária em cadelas (MASUCCI et al., 2003; DUBEY et al., 2005; ROSYPAL et al., 2005), bem como transmissão venérea (SILVA et al., 2009), têm sido relatadas.

As vias alternativas de infecção colocam em prova as estratégias de controle e erradicação da LV baseadas na eliminação do vetor, atestando que estas não seriam eficientes, pois a *L. infantum* manteria seu ciclo, assumindo potencial importância no acasalamento de cães errantes positivos (SILVA et al., 2009).

Do ponto de vista epidemiológico, a infecção canina é mais importante que a infecção no homem, além de ser mais prevalente e apresentar grande contingente de animais assintomáticos que albergam parasitos na derme (BONATES, 2003).

No cão, a infecção por *L. infantum* é considerada uma enfermidade crônica, presente em vários continentes (TRAVI et al., 2002; LIMA et al., 2003; CARDOSO et al., 2007), representando um grande problema de saúde pública, particularmente pela presença de animais assintomáticos (COSTA, 2008).

Os principais sinais clínicos observados nos animais acometidos pela LVC são linfadenomegalia, dermatopatias (SOLANO-GALLEGO et al., 2009), hepatoesplenomegalia, onicogribose (ALBUQUERQUE et al., 2007) e oftalmopatias (BRITO et al., 2006). No entanto, formas amastigotas de *Leishmania* sp podem ter uma ampla distribuição em tecidos de cães (TAFURI et al., 2004), o que pode resultar em manifestações clínicas atípicas (SOUZA et al., 2005).

Dentre os quadros atípicos, incluem-se desordens neurológicas (BLAVIER et al., 2001), nefropatias (COSTA et al., 2003), cardiopatias e pneumopatias (TORRENT et al., 2005), bem como envolvimento do sistema genital (DINIZ et al., 2005; AMARA et al., 2009).

Cães machos naturalmente infectados, muitas vezes, desenvolvem lesões genitais associadas com a presença de formas amastigotas, principalmente no epidídimo, prepúcio, e glândula (DINIZ et al., 2005), além de lesões específicas nos testículos (AMARA et al., 2009).

Atualmente, diversas metodologias estão disponíveis para o diagnóstico da LVC. Sendo assim, o diagnóstico laboratorial pode ser realizado através do exame parasitológico direto, testes imunológicos, como imunofluorescência indireta (RIFI) ou ensaio de imunoadsorção enzimático (ELISA), métodos imunohistoquímicos e, mais recentemente, através de métodos moleculares de amplificação do ácido nucleico, como a Reação da Cadeia em Polimerase (PCR) e PCR quantitativo (Real Time PCR) (MOREIRA et al., 2007; QUEIROZ et al., 2010; SOLCÁ et al., 2012).

Diante do exposto e considerando a possibilidade de manifestações patológicas atípicas da LVC, serão abordadas nesta revisão as principais alterações estruturais nos órgãos do sistema reprodutor masculino e feminino de cães infectados com LV.

## **2 ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO**

Cães naturalmente infectados por *L. infantum* apresentam ausência de alterações macroscópicas a nível testicular, porém histologicamente possuem lesões (AMARA et al., 2009) caracterizadas por processos inflamatórios intersticiais subagudos com atrofia degenerativa do epitélio seminífero (PIZARRO et al., 1989; DINIZ et al., 2005; AMARA et al., 2009).

A frequência e a intensidade das alterações inflamatórias estão associadas com a manifestação clínica da doença, bem como a carga parasitária presente no testículo (DINIZ et al., 2005). O número de formas amastigotas de *Leishmania* sp nos testículos atua como fator desencadeador da resposta inflamatória, enquanto que a degeneração testicular é provavelmente uma consequência do processo inflamatório (DINIZ et al., 2005), uma vez que o processo degenerativo pode ser desencadeado em resposta a uma inflamação testicular (NASCIMENTO & SANTOS, 2003).

A imunomarcagem de formas amastigotas de *Leishmania* sp dentro de macrófagos testiculares de cão sorologicamente positivo apresentando sinais clínicos foi evidenciada em infiltrado inflamatório linfohistiocitário (DINIZ et al., 2005), caracterizando, dessa maneira, uma resposta imune local (BENITES et al., 2011). Contudo, formas amastigotas dentro do lúmen do túbulo seminífero e ducto epididimário não têm sido observadas (DINIZ et al., 2005).

Por outro lado, infiltrado inflamatório linfohistiocítico no epidídimo de cães (DINIZ et al., 2005), além de fibrose com adelgaçamento do epitélio (AMARA et al., 2009) e azoospermia (DIAZ et al., 1982), ressaltando um maior parasitismo de formas amastigotas de *Leishmania* sp neste órgão (DINIZ et al., 2005) tem sido demonstrado.

Na cabeça, corpo e cauda do epidídimo, há notadamente migração de células imunocompetentes, que, normalmente, situam-se na base do epitélio e deslocam-se para o lúmen (SERRE & ROBAIRE, 2002). Contudo, fatores que levam ao aumento

da concentração dessas células e a resposta imunocelular local neste órgão, frente à complexidade da resposta imune sistêmica a LV em cães, não são totalmente conhecidos (HEDGER & HALES, 2006).

A presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp no epidídimo de cães altera o perfil leucocitário desse órgão, ocorrendo maior transmigração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos para o lúmen (BENITES et al., 2011), indicando uma resposta imune mais demorada, característica de casos crônicos com alta parasitemia (REIS et al. 2009).

Diferentemente dos órgãos até aqui revisados, não foi evidenciada relação entre prostatite e LV em cães, uma vez que a frequência de infiltrado inflamatório e a intensidade de inflamação na próstata não foram significativamente diferentes entre cães sorologicamente positivos e soronegativos pelo método de ELISA (DINIZ et al., 2005).

Na próstata, à semelhança do lúmen do túbulo seminífero e ducto epididimário, não foram observadas formas amastigotas de *Leishmania* sp em secções coradas com Hematoxilina - Eosina (HE), porém, quando realizada imunomarcação, formas amastigotas de *Leishmania* sp foram observadas em 55% das secções de cães, independente da presença ou ausência de sinais clínicos (DINIZ et al. 2005). Por outro lado, não foi observada maior transmigração epitelial de neutrófilos, macrófagos e linfócitos neste órgão de cães com LV (BENITES et al., 2011).

Formas amastigotas de *L. infantum* na glândula de cão com tumor venéreo transmissível tem sido relatada (CATONE et al., 2003) com presença de reação inflamatória com predomínio de macrófagos, com maior frequência e intensidade nos animais com sinais clínicos.

Do mesmo modo, em animais naturalmente infectados, reação inflamatória histioplasmocitária associada com dermatite granulomatosa, erosões e ulcerações e elevado número de macrófagos parasitados têm sido observados no prepúcio (DINIZ et al., 2005).

Da mesma forma que doenças sistêmicas podem alterar a qualidade do sêmen canino (JOHNSTON et al., 2001), cães com LV apresentam pobre qualidade do sêmen, caracterizada por hiperproteinemia seminal e baixa motilidade progressiva (LABAT et al., 2010; ASSIS et al., 2010).

À semelhança do que ocorre no homem (SYMMERS, 1960), a transmissão venérea de *Leishmania* sp tem sido aventada em cães machos sexualmente maduros com infecção natural pela detecção do parasito no sêmen através da PCR (DINIZ et al., 2005).

### **3 ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO**

Cadelas naturalmente infectados por *L. infantum* apresentam processo inflamatório vulvar e vaginal caracterizado por infiltrado histio-plasmo-linfocitário, principalmente ao redor de folículos pilosos e de glândulas sebáceas e sudoríparas (SILVA et al., 2008). Por outro lado, Silva et al. (2008) demonstraram que imunomarcção de formas amastigotas de *Leishmania* sp na mucosa vaginal foram evidenciadas em infiltrado inflamatório multifocal discreto, composto por macrófagos, plasmócitos e alguns linfócitos.

Formas amastigotas de *Leishmania* sp foram descritas no útero de uma cadela infectada (ROSYPAL et al., 2005). Contudo, lesões e formas amastigotas de *Leishmania* sp na cérvix, corpo do útero, cornos uterinos, tubas uterinas e ovários não foram observadas através da técnica de imunohistoquímica (SILVA et al., 2008).

Apesar de lesões microscópicas e de presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp na cérvix, corpo do útero, cornos uterinos, tubas uterinas e ovários não terem sido observadas em cadelas naturalmente infectadas por *L. chagasi* através da técnica de imunohistoquímica (SILVA et al., 2008), a PCR tem se mostrado sensível na detecção de formas amastigotas de *Leishmania* sp em amostras de tecido do sistema genital (SILVA et al., 2008).

Os segmentos da genitália externa apresentaram uma maior frequência de detecção por PCR (SILVA et al., 2008), uma vez que a vulva é coberta por tecido cutâneo ricamente suprido de glândulas apócrinas e sebáceas (DELLMANN & BROWN, 1982) e a pele está entre as amostras de escolha para extração de DNA e PCR nos casos de LVC (QUEIROZ et al., 2010). Dessa forma, a sensibilidade e especificidade atingem patamares próximos a 100% (FERRER, 1999; LUVIZOTTO, 2005).

A detecção de DNA de *Leishmania* sp na genitália interna e a ausência de alterações microscópicas evidentes nesses segmentos indicam que a presença do parasito não está relacionada ao desencadeamento de reação inflamatória nesses tecidos (SILVA et al., 2008).

Estima-se que o limite de detecção desse protocolo de PCR seja de 0,0001 formas amastigotas (equivalente parasitário) por reação (LACHAUD et al., 2002). Esse nível de sensibilidade pode resultar na detecção de DNA de *Leishmania* sp mesmo se o parasito estiver restrito ao sangue circulante nesses segmentos da genitália interna, o que é uma hipótese válida, já que os leucócitos do sangue periférico estão dentre as amostras de escolha para extração de DNA e PCR nos casos de LVC (LACHAUD et al., 2002).

Estudo realizado em placenta de fetos abortados de cadela soropositiva para LV demonstrou a placentite como lesão predominante, caracterizada por necrose e infiltração mista de leucócitos. Ao mesmo tempo, numerosas formas amastigotas de *Leishmania* sp foram identificados em trofoblasto placentário (DUBEY et al., 2005), indicando que a transmissão vertical pode ser uma potencial rota de infecção do parasito.

#### **4 CONCLUSÃO**

A LV em cães pode desencadear o aparecimento de alterações estruturais no sistema reprodutor, notadamente o masculino, com lesões específicas principalmente nos testículos, epidídimo, glândula e prepúcio, além da presença de *Leishmania* sp no sêmen. Os principais locais de desenvolvimento de lesões e imunomarcagem de formas amastigotas de *L. infantum* no trato reprodutor de cadelas são a vulva e vagina.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, P.H.P. et al. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 4, p. 283-294, 2007.

AMARA, A. et al. Etude histologique des lésions testiculaires chez les chiens leishmaniens. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 160, n. 1, p. 54-60, 2009.

ALBUQUERQUE, A.R. et al. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na Região Metropolitana do Recife. **Clínica Veterinária**, v.71, p.78-80, 2007.

ALBUQUERQUE, P. L. M. M. et al. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 26, n. 4, p. 330-333, 2009.

ASSIS, J. et al. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 17-25, 2010.

BARATA, R.A. et al. Phlebotomine sandflies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 481-487, 2004.

BENITES, A.P. et al. Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 72-77, 2011.

BLAVIER, A., et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, v. 162, n. 2, p. 108-120, 2001.

BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar). **Veterinary News**, v. 10, n. 61, p. 04-05, 2003.

BRITO, F.L.C. et al. Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n. 5, p.768-775, 2006.

CARDOSO, L. et al. Anti-*Leishmania* humoral and cellular response in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Immunopathology**, v.117, p. 35-41, 2007.

CATONE, G. et al. Canine transmissible venereal tumor parasitized by *Leishmania infantum*. **Veterinary Research Communications**, v.27, n.7, p.549-553, 2003.

COLOMBO, F.A. et al. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitology Research**, v. 109, n. 2, p.267-274, 2011.

COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral Leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n.12, p.2959- 2963, 2008.

COSTA, F. A. L. et al. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 6, p.677-684, 2003.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral do Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n.4, p. 352-356, 2006.

DELLMANN, H. D. & BROWN, E. M. **Histologia Veterinária**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1982. 397 p.

DIAZ, M.P. et al. Lesiones testiculares y epididimarias en La leishmaniasis visceral canina, de presentacion natural. **Higia Pecoris**, v.4, n. 10, p. 5-25, 1982.

DINIZ, S.A. et al. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 5, p. 650–658, 2005.

DINIZ, S.A. et al. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 1, p. 24–33, 2008.

DUBEY, J.P. et al. Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 8, p. 1266–1269, 2005.

FERRER, L. Clinical aspects of canine Leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona, Catalunha. **Anais...** Hoechst Roussel Vet., 1999. p. 6-10.

FIGUEIREDO, F.B. et al. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p.141-145, 2009.

HEDGER, M.P. & HALES D.B. Immunophysiology of the male reproductive tract,. In: NEILL, J. (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3ª ed. Elsevier, New York, 2006, p. 1195-1286.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafio e novas perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

HOSSAIN, M.; JAMIL, K. M. Geographical Distribution of Kala-Azar in South Asia. **Kala Azar in South Asia**, v. 1, n.1, p. 3-9, 2011.

JOHNSTON, S.D. et al. Disorders of canine testes and epididymes. In: JOHNSTON, S. D. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: Saunders, 2001. Cap.18, p.312-332.

LABAT, É. et al. Qualidade espermática de sêmen de cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p.609-614, 2010.

LACHAUD, L. et al. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, n. 67, p. 13-23, 2009.

LIMA, V.M.F. et al. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral Leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n.4, p. 485-489, 2003.

LUPPI, M.M. et al. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.155, n. 1-2, p. 146–151, 2008.

LUVIZOTTO, M.C.R. **Leishmune Manual Técnico Leishmaniose Visceral Canina**. Campinas: Fort Dodge Saúde Animal Ltda., 2005, seção 3, p. 28-29. (Boletim Técnico).

MAIA-ELKHOURY, A.N. et al. Visceral Leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, n.12, p. 2941–2947, 2008. Disponível em: < <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102->

MARZOCHI, M.C.A. et al. Canine visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutic and epidemiological findings (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 3, p. 349-357, 1985.

MASUCCI, M. et al. Canine leishmaniasis in the newborn puppy. **Veterinary Research Communications**, v. 27, suple. 1 p. 771–774, 2003.

MAURICIO I.L. et al. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, p 188-189, 2000.

MENDES, W. S. et al. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luis, Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 3, p. 227-231, 2002.

MOREIRA, M. A. B. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of *Leishmaniasis* in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v.145, n.3-4, p.245-252, 2007.

NASCIMENTO, E.F. & SANTOS, R.L. **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003. 156 p.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11 ed . São Paulo: Ed. Atheneu, 2005. 494 p.

PIZARRO, M. et al. Lésions testiculaires et épидидymaires chez les chiens leishmaniens. **Recueil de Medecine Veterinaire**, v. 165, p. 441-447, 1989.

QUEIROZ, N.M.G.P. et al. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunohistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n.1, p. 34-40, 2010.

REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 87-95, 2009.

ROSYPAL, A. C. et al. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in a experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 970–972, 2005.

SERRE, V. & ROBAIRE, B. Interactions of the immune system and the epididymis. In: ROBAIRE, B. & HINTON, B.T. (Eds). **The Epididymis: From molecules to clinical practice**. Ed. Kluwer Academic, New York, 2002. p. 219-231.

SHAW, J.J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 471–478, 1994.

SILVA, F.L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 55-59, 2009.

SILVA, F.L. et al. Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 151, n.1, p. 86–90, 2008.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1, p. 1–18, 2009.

SOLCÁ, M.D.S. et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n.2-4, p. 133-140, 2012.

SOUZA, A.I. et al. Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 1-2, p. 51–54, 2005.

SYMMERS, W. S. C. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. **Lancet**, v. 16, n. 1, p. 127- 132, 1960.

TAFURI, W.L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, n.1-2, p. 17–23, 2004.

TORRENT, E. et al. Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, New York, v. 46, n.11, p. 549–552, 2005.

TOZ, S.O. et al. Leishmaniasis in Turkey: molecular characterization of *Leishmania* from human and canine clinical samples. **Tropical Medicine and International Health**, v. 14, n. 11, p. 1401–1406, 2009.

TRAVI, B.L. et al. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from nonendemic áreas. **Research in Veterinary Science**, v. 72, n. 1, p. 83-86, 2002.