



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Leishmaniose visceral no trato reprodutor masculino de cães: Caracterização *in situ* de aspectos imunopatológicos e parasitários.

Orientada: Hanna Gabriely Pinto Gonçalves

Orientadora: Profª Drª Alcina Vieira de Carvalho Neta

Co-orientador: Profº Drº Fernando Almeida de Souza

São Luís – MA

2020

HANNA GABRIELY PINTO GONÇALVES

**Leishmaniose visceral no trato reprodutor masculino de cães: Caracterização *in situ* de
aspectos imunopatológicos e parasitários.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Mestrado em Ciência
Animal como requisito para obtenção do
título de Mestre.

São Luís – MA

2020

HANNA GABRIELY PINTO GONÇALVES

Leishmaniose visceral no trato reprodutor masculino de cães: Caracterização *in situ* de aspectos imunopatológicos e parasitários.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr.^a Alcina Vieira de Carvalho Neta
Universidade Estadual do Maranhão
Orientadora

Prof^a. Dra. Andrea Pereira Gomes da Costa
Universidade Estadual do Maranhão
Membro interno

Prof^a. Dra. Larissa Sarmento dos Santos
Universidade Estadual do Maranhão
Membro externo

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose de distribuição mundial causada pelo protozoário *Leishmania infantum*. O principal reservatório é o cão doméstico e a transmissão, geralmente, se dá pela ação hematófaga do inseto vetor da espécie *Lutzomyia longipalpis*. No entanto, a transmissão vertical transplacentária e a transmissão venérea tem sido descritas ao longo dos últimos anos, de modo que estudos relatam que a transmissão ocorre de maneira unilateral. É extremamente importante que se realize estudos envolvendo o trato reprodutor de cães quanto a sua suscetibilidade e resistência à infecção, pois ainda não há relatos sobre sua caracterização imunológica. Desse modo, esta pesquisa teve como objetivo caracterizar a infecção do trato reprodutor masculino de cães com LV naturalmente infectados, com ênfase nos aspectos imunopatológicos e parasitários. Sendo assim, foram coletadas amostras de sangue e tecidos do trato genital de machos sintomáticos ($n=9$) e assintomáticos ($n=7$) naturalmente infectados com *L. Infantum* de animais eutanasiados do Hospital Veterinário “Francisco Uchoa Lopes” da Universidade Estadual do Maranhão e da Unidade de Vigilância em Zoonoses (UVZ) da Ilha de São Luís – MA. Os materiais coletados foram submetidos a métodos de diagnósticos sorológicos e moleculares, além de análises histopatológicas, imuno-histoquímicas e de qPCR para avaliação da carga parasitária e expressão de citocinas. Todos os animais analisados apresentaram diagnóstico positivo em pelo menos um dos testes realizados. Observou-se baixa frequência de lesões macroscópicas nos segmentos, entretanto as alterações histopatológicas foram caracterizadas sobretudo por infiltrado inflamatório com predomínio de macrófagos no prepúcio, epidídimos, próstata e glande, além de degeneração do epitélio germinativo nos testículos. Foram encontradas formas amastigotas de *Leishmania* sp. no prepúcio e próstata através da imuno-histoquímica. Houve diferenças estatísticas na quantificação de carga parasitária nos tecidos analisados em comparações entre os tecidos/grupos, tendo o prepúcio como o único tecido com divergência significativa entre seus grupos. Desse modo, presente trabalho demonstrou que o trato reprodutor masculino é um sítio frequente de parasitismo pela *Leishmania* e o mesmo deve ser incluso como diagnóstico diferencial durante avaliação de lesões infecciosas dessa região.

Palavras-chave: *Leishmania* sp. ; cães; trato reprodutor; histopatologia; qPCR

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a worldwide zoonosis caused by the protozoan *Leishmania infantum*. The main reservoir is the domestic dog and its transmission is usually due to the vector insect haematophagous action of the species *Lutzomyia longipalpis*. However, transplacental vertical transmission and venereal transmission have been described over the last years, so studies report that transmission occurs unilaterally. It is extremely important to conduct studies involving the reproductive tract of dogs regarding its susceptibility and resistance to infection, as there are no reports on its immunological characterization in these cases. This research aimed to characterize the male reproductive tract infection in dogs naturally infected VL, with emphasis on immunopathological and parasitic aspects. Blood and tissue samples from the genital tract of symptomatic ($n = 9$) and asymptomatic ($n = 7$) males naturally infected with *L. infantum* were collected from euthanized animals of the veterinary Hospital “Francisco Uchoa Lopes” on Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) and the Unidade de Vigilância em Zoonoses (UVZ) in São Luís Island – MA. The collected materials were submitted to serological and molecular diagnostic methods, as well as histopathological, immunohistochemical and qPCR analysis for parasite load evaluation and cytokine expression. All animals analyzed had a positive diagnosis in at least one of the tests performed. A little macroscopic lesions frequency was observed in the segments, however, histopathological changes were characterized mainly by inflammatory infiltrate with a macrophages predominance in the foreskin, epididymis, prostate and glans, in addition to the germinal epithelium degeneration in the testicles. *Leishmania* sp. amastigote forms in the foreskin and prostate through immunohistochemistry. There were statistical differences in the quantification of parasitic load on the tissues analyzed in comparisons between the tissues / groups, with the foreskin as the only tissue with significant divergence between its groups. Thus, the present study demonstrated that the male reproductive tract is a frequent site of parasitism by *Leishmania* and it must be included as a differential diagnosis during the evaluation of infectious lesions in that region.

Keywords: *Leishmania* sp.; dogs; reproductive tract; histopathology; qPCR

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Epidemiologia da Leishmaniose visceral.....	13
2.2 Leishmaniose Visceral Canina	14
2.2.1 Agente etiológico	14
2.2.2 Transmissão.....	15
2.2.3 Transmissão venerea	16
2.2.4 Ciclo da Leishmania.....	17
2.2.5 Reservatório	18
2.2.6 Prevenção, controle e tratamento	19
2.2.7 Aspectos clínicos e resposta imunológica	20
2.2.8 Resposta imune da LVC no trato reprodutor masculino de cães.	22
2.2.9 Diagnóstico.....	23
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Considerações Éticas	26
4.2 Animais e colheita de amostras	26
4.3 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	27
4.4 Processamento histológico	27
4.5 Imuno-histoquímica	28
4.6 Extração de DNA	28
4.7 PCR convencional.....	28
4.8 Quantificação da carga parasitária por qPCR	29
4.9 Extração de RNA	30
4.10 Síntese de cDNA.....	30
4.11 PCR Quantitativa em tempo real (qPCR).....	30
4.12 Análise Estatística.....	31

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Abordagem clínica.....	31
5.2 Dianóstico sorológico e molecular.....	34
5.3 Lesões macroscópicas	36
5.4 Análise microscópicas e imuno-histoquímicas	38
5.5 Quantificação da carga parasitária	46
6 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS	51
REFERÊNCIAS	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo da <i>Leishmania sp.</i> no vetor e no hospedeiro vertebrado.....	18
Figura 2. Imagem representativa dos sinais clínicos apresentados pelos cães com LVC.....	33
Figura 3. Fotografia demonstrativa da amplificação das amostras de sangue para diagnóstico de <i>Leishmania infantum</i>	36
Figura 4. Lesões no trato reprodutor de cães com LVC.....	37
Figura 5. Microscópia de luz , próstata, cães com LVC.....	40
Figura 6. Microscópia de luz , prepúcio, cães com LVC.....	41
Figura 7. Microscópia de luz , glande, cães com LVC.....	42
Figura 8. Microscópia de luz , epidídimo, cães com LVC.....	43
Figura 9 Microscópia de luz , testículo, cães com LVC.....	44
Figura 10. Imunomarcação de formas amastigotas presentes nos tecidos do trato reprodutivo dos cães com LVC.....	46
Figura 11. Determinação da carga parasitária nos tecidos do trato reprodutivo de cães com LVC.....	48
Figura 12. Determinação da carga parasitária de <i>Leishmania infantum</i> nos tecidos do trato reprodutivo de cães com LVC.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de iniciadores utilizados na PCR convencional.....	.29
Tabela 2. Lista de genes e iniciadores utilizados no RT-PCR em tempo real.....	31
Tabela 3: Frequênci a de sinais clinicos apresentados pelos cães sintomáticos para LV.....	32
Tabela 4: Resultados obtidos através do teste sorologico RIFI e da PCR convencional do sangue dos animais coletados.....	35
Tabela 5. Frequênci a de lesões no trato reprodutor de cães positivos para LVC.....	37
Tabela 6. Frequênci a e escore das lesões inflamatórias encontradas no trato reprodutor de cães naturalmente infectados por LVC.....	39
Tabela 7. Resultados obtidos através da detecçao molecular de <i>Leishmania infantum</i> nos tecidos do trato reprodutor dos cães com LVC.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CD4+	Cluster of Differentiation 4 – Grupamento de diferenciação tipo 4
CD8+	Cluster of Differentiation 8 – Grupamento de diferenciação tipo 8
CEEA	Conselho de Etica e Experimentação Animal
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPP	Dual Path Plataform
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
HE	Hematoxinina- Eosina
INF-γ	Interferon γ
IHQ	Imunohistoquímica
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
RNA	Ácido Ribonucleico
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
UVZ	Unidade de Vigilância em Zoonoses
WHO	World Organization Health

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica de distribuição mundial, que acomete o homem e diversas espécies de mamíferos silvestres e domésticos, acarretando em sérios impactos na saúde pública, especialmente pela alta incidência, letalidade e implicações econômicas, constituindo um sério problema sanitário e econômico-social (GRAMICCIA E GRADONI, 2005; MICHELETTI e BEATRIZ, 2012; SOUSA et al., 2018).

É uma das mais importantes doenças reemergentes do mundo com alta prevalência em países da América Latina, incluindo o Brasil (WHO, 2017). No Estado do Maranhão, em particular a Ilha de São Luís, a LV é endêmica com elevados índices de morbidade e mortalidade, tanto em humanos quanto nos animais, sobretudo cães (ABREU-SILVA et al., 2008; MARANHÃO, 2015; SALES et al., 2017).

A LV e a leishmaniose visceral canina (LVC) são causadas por um protozoário pertencente ao gênero *Leishmania* e a espécie *Leishmania infantum*, no Novo Mundo. São parasitas intracelulares obrigatórios de células do sistema fagocítico mononuclear, que se apresentam na forma amastigota nos tecidos do hospedeiro vertebrado e na forma promastigota no tubo digestivo do inseto vetor (MESSAOUD et al., 2017).

O cão é considerado o principal reservatório peridomiciliar do agente etiológico tanto em áreas urbanas quanto em áreas semiurbanas (BANETH & SOLANO-GALLEG, 2012), onde a transmissão ocorre por meio das fêmeas de insetos hematófagos pertencentes à subfamília Phlebotominae, principalmente pela espécie *Lutzomyia longipalpis* (BARATA et al., 2004).

No entanto, a alta prevalência da infecção, sobretudo entre a população canina, tem sugerido outras formas de transmissão do parasita, destacando-se a transmissão vertical transplacentária (NAUCKE & LOURENTZ, 2012) e a transmissão sexual, que tem sido descritas ao longo dos últimos anos, de modo que estudos relatam que a transmissão ocorre de maneira unilateral, de machos para fêmeas (SILVA et al., 2009).

Nesse contexto, é razoável pensar que, do ponto de vista epidemiológico, esta forma de transmissão ganha particular importância, devido, sobretudo, a grande população de cães não orquiectomizados em vias públicas, aliado ao alto índice de prevalência da LVC no ambiente urbano e semiurbano, o que dificulta sobremaneira as estratégias de controle e erradicação da doença (DINIZ et al., 2005; TURCHETTI et al., 2014).

Clinicamente, a LVC pode apresentar-se desde uma forma assintomática até uma doença sistêmica com o envolvimento de diversos órgãos, levando a um amplo espectro de sinais clínicos que incluem linfoadenomegalia, hepatoesplenomegalia, oftalmopatias,

dermatopatias caracterizadas por onicogrifose, alopecia, descamação, úlceras cutâneas, principalmente no focinho e orelha, e hiperceratose (ABREU-SILVA et al., 2008; SARIDOMICHELAKIS e KOUTINAS, 2014; SILVERA et al., 2018; CONTREIRAS et al., 2019).

No entanto, formas amastigotas de *Leishmania* sp. podem ter uma ampla distribuição em tecidos de cães, o que pode resultar em manifestações clínicas atípicas (TAFURI et al., 2004), como o envolvimento do sistema genital, onde cães naturalmente infectados demonstraram ter lesões no trato reprodutivo (DINIZ et al., 2005; AMARA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2016; DE BARROS et al., 2019).

Devido a dificuldade do diagnóstico efetivo de LVC, é válido realizar além dos testes sorológicos preconizados pelo Ministério da Saúde, métodos mais específicos e sensíveis, como os moleculares, que já são utilizados com frequência para a detecção da LVC (SELDER et al ., 2018; CARVALHAIS et al., 2019), evitando assim, resultados errôneos que possam por ventura gerar consequências graves tanto para o animal, quanto para as questões epidemiológicas da saúde humana (FERREIRA et al, 2007; PEREZ et al., 2016).

Além deste fator, estudos devem ser realizados em relação a progressão da doença e ao aparecimento dos sinais clínicos, em animais naturalmente infectados (LOPES-NETO et al., 2015). As diferenças na intensidade da resposta do sistema imunológico que se desenvolve em cada compartimento refletem a especificidade da relação estabelecida por *L. infantum* em diferentes sistemas no cão, regulando os efeitos destrutivos do parasitismo no reservatório natural e garantindo a possibilidade de múltiplos ciclos de transmissão (BARBOSA et al, 2011). Devido a estes fatores, é importante que se realize estudos envolvendo o trato reprodutor de cães quanto a sua suscetibilidade e resistência à infecção, pois ainda não existem relatos que caracterizem claramente a resposta imunológica a infecção por LVC, em tecidos do aparelho reprodutor do cão.

Embora LVC seja conhecida como uma doença sistêmica grave, poucos estudos descrevem em detalhes, as características imunopatológicas observadas durante a infecção em sistemas compartmentalizados distintos do hospedeiro. Portanto, para um melhor entendimento de eventos relacionados à imunopatologia da LVC, este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização dos aspectos histopatológicos, parasitológicos e imunológicos no aparelho reprodutor de cães com LVC. Adicionalmente, essa proposta buscou verificar a expressão de citocinas e quimiocinas pré e pró-inflamatórias, que possam fornecer informações importantes da patogênese da infecção no tecido reprodutor, para compreensão dos eventos

imunológicos/inflamatórios que ocorrem no trato reprodutivo masculino de cães naturalmente infectados pelo parasito.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia da Leishmaniose visceral

A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece as leishmanioses, como uma das principais antropozoonoses sendo considerada a doença parasitária que acomete algumas espécies de animais e seres humanos, além de ser uma das seis principais endemias do mundo, representando um grave problema de saúde pública no mundo (BRASIL, 2014; SILVA et al, 2016).

As leishmanioses são reconhecidas como uma das "Doenças Tropicais Negligenciadas" (DTN), estas são chamadas assim em função da escassez de medidas de controle, negligência da indústria farmacêutica e, principalmente, porque as principais zonas de transmissão são países pobres das regiões tropicais e subtropicais (WHO, 2017).

Esta enfermidade pode apresentar manifestações clínicas distintas, que varia de acordo com a espécie de *Leishmania* que infecta o hospedeiro podendo ser classificada como: cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e visceral (SOUSA et al., 2019). Dentre os tipos de leishmanioses existentes, a Leishmaniose visceral (LV) se destaca por ser a segunda principal doença causada por protozoários, no qual foi visto 300 mil casos novos por ano no mundo, e destes 16% evoluíram para óbito (WERNECK, 2016), caracterizada pela sua alta incidência, letalidade e distribuição, podendo apresentar um perfil de curso crônico, de caráter sistêmico e grave (MICHELETTI e BEATRIZ, 2012).

A LV afeta pessoas em todo o mundo, com 90% dos casos de doenças ocorrendo principalmente em alguns países em desenvolvimento, incluindo Índia, Etiópia, Nepal, Sudão, Brasil e Bangladesh , já nas Américas, casos humanos de LV estão presentes em 12 países (WHO, 2017). Os principais fatores da presença da LV nos grandes centros são: convívio muito próximo do homem com o principal reservatório (*Canis familiars*), aumento da densidade do vetor, desmatamento acentuado e o constante processo migratório (MONTEIRO et al, 2005).

O Brasil é considerado o país que possui o maior número de casos, que vem se agravando e ampliando sua dispersão geográfica (BRASIL, 2014), sendo o responsável por 96% dos casos de LV (WHO, 2017) , possuindo 21 estados considerados endêmicos, onde foram notificados 14.859 casos entre 2001 e 2014 em 25% dos municípios brasileiros (REIS, et al 2017). Os estados que apresentam os maiores indices de casos são Maranhão, Minas Gerais, Pará, Ceará e Tocantins (BRASIL, 2017), sendo a região nordeste considerada a mais

representativa (SOUZA et al., 2018). Destaca-se que essa região é responsável por 50,7% dos casos de LV do país(BRASIL,2018). Considerando que mais de 70% dos casos de LV ocorrem em 200 municípios que possui população em torno de 100.000 habitantes, indicando um processo de urbanização e expansão territorial (WERNECK, 2016).

Particularmente no estado do Maranhão, os municípios mais notificadores foram São Luís (1.702 casos), Imperatriz (475 casos), Caxias (323 casos), Barra do Corda (171 casos) e Açailândia (134 casos), conforme visualizado na Figura 01. Diante disso, São Luís tonou-se a quarta capital do país e a terceira do Nordeste com o maior número de notificações de casos de leishmaniose visceral, entre 2008 e 2017

O Maranhão encontra-se entre os estados da federação com maior número de casos de LV, de 2009-2012 foram notificados 2.755 casos de suspeita LV, desses 1.577 (57,24%) foram soropositivos e 59 (3,74%) vieram ao óbito (SALES et al., 2017). Diversos estudos revelaram índices de 20 a 60 mil casos por 100.000 habitantes principalmente da região metropolitana de São Luís (SILVA et al, 2008; BARBOSA, 2010; FELIPE et al, 2011), que fez com que São Luís seja considerada a quarta capital do país e a terceira do Nordeste com o maior número de notificações de casos de leishmaniose visceral, entre 2008 e 2017 (SOUSA et al., 2020). Nos anos de 2007 a 2014, 196 municípios maranhenses notificaram um total de 6.523 casos de LV em humanos (JÚNIOR et al, 2016). Furtado et al (2015) observou também um elevado número de ocorrências na área continental do estado, o que vem se agravando no decorrer dos anos, como foi visto no levantamento realizado por Lucena e Medeiros (2018), onde 34,73% dos casos notificados na região nordeste ocorreram no estado do Maranhão.

Devido a estes fatores, é considerada endêmica com elevados índices de morbidade e mortalidade, tanto em humanos quanto nos animais, sobretudo cães (ABREU-SILVA ET AL., 2008; SILVA et al., 2008).

2.2 Leishmaniose Visceral Canina

2.2.1 Agente etiológico

Os protozoários do gênero *Leishmania* pertencem ao Filo Euglenozoa, Classe Kinetoplastida, Ordem Trypanossomatida, Família Trypanossomatidae, sendo que atualmente existem mais de 20 espécies do gênero Leishmania distribuídas mundialmente (WHO,2017). No Brasil a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* é a espécie predominantemente associada à doença (KAUFER et al., 2017). Estes, são parasitas intracelulares obrigatórios de células do sistema fagocítico mononuclear, que se apresentam na forma amastigota nos tecidos

do hospedeiro vertebrado e na forma promastigota no tubo digestivo do inseto vetor (MESSAOUD et al., 2017).

2.2.2 Transmissão

Os vetores das Leishmaníoses são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia* no novo mundo e *Phlebotomus* no velho mundo (CHAGAS et al., 1938).

No Brasil a LVC e a LV é transmitida principalmente pela picada da fêmea do flebotomíneo, das espécies, *Lutzomyia longipalpis* ou *Lutzomyia cruzi*, popularmente conhecido como “mosquito palha” (BRASIL, 2017). Um estudo recente realizado por Guimarães et al. (2016), observaram a presença de promastigotas metacíclicas (formas infectantes) de *L. infantum* em *Lutzomyia migonei*, sugerindo mais uma espécie de vetor no Brasil. Em São Luís, a espécie mais abundante é o *Lu. Longipalpis*, possuindo maior frequência dos flebotomíneos na região peridomiciliar, sendo notificada tanto na zona rural, quanto em áreas periurbanas (PENHA et al., 2013).

A atividade dos flebotomíneos é crepuscular e noturna e há indícios de maior incidência no período chuvoso. No intra e peridomicílio, *Lu. longipalpis* é encontrada próxima a uma fonte de alimento. Durante o dia, estes insetos ficam em repouso, em lugares sombreados e úmidos, protegidos do vento e de predadores naturais (BRASIL, 2014).

O ciclo de *Lu. longipalpis* se subdivide em quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto. Após a cópula, as fêmeas colocam seus ovos sobre o substrato úmido no solo, com alto teor de matéria orgânica, para garantir a alimentação das larvas. O desenvolvimento do ovo ocorre em um período de aproximadamente 30 a 40 dias de acordo com a temperatura (BRASIL, 2014; SILVA et al., 2017).

A transmissão de LVC na ausência do hospedeiro vertebrado tem sido reportada, como a transmissão direta através de transfusão sanguínea em cães (OWENS et al., 2001; DE FREITAS et al., 2006). Similarmente, a transmissão entre usuários de drogas através de agulhas contaminadas já foi descrita (BOSCH ET AL., 2002).

Por sua vez, alguns relatos demonstraram infecção por *L. infantum* em natimortos ou recém-nascidos de cadelas naturalmente infectadas (GIBSON-CORLEY et al., 2008; FREEMAN et al., 2010; BOGGIATTO et al., 2011), sendo que o DNA do parasita já foi detectado em placenta de cadelas soropositivas (PANGRAZIO et al., 2009), além da presença do DNA de *L. infantum* no embrião de uma cadelas nos primeiros dias de gravidez (OLIVEIRA

et al, 2017), enfatizando a possibilidade de transmissão vertical transplacentária em cadelas (NAUCKE & LOURENTZ, 2012), bem como a transmissão venérea em cães naturalmente infectados (SILVA et al., 2009).

2.2.3 Transmissão venérea

Em cães, a primeira evidência da presença de *Leishmania* sp. no sêmen foi relatado por Riera e Valladares (1996). Nesse estudo, três cães Beagle machos foram inoculados experimentalmente com *L. infantum*. Após confirmação da infecção, o sêmen foi coletado e cultivado, com o isolamento do parasito do sêmen, comprovando assim o aumento da possibilidade de transmissão venérea.

A partir deste fato, foram realizados trabalhos envolvendo a análise de lesões genitais em cães experimentalmente e naturalmente infectados por *Leishmania* sp., e foi visto que, em uma parcela significativa dos casos, os cães desenvolvem lesões genitais, frequentemente epididimite e balanopostite, associadas a formas amastigotas intralesionais, principalmente no epidídimo, prepúcio e glande (DINIZ et al., 2005; SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2009; BENITES et al., 2011; MIR et al, 2012; BOECHAT et al., 2016; OLIVEIRA et al, 2016; DE BARROS et al., 2019), além de lesões específicas nos testículos (AMARA et al., 2009; BENITES et al., 2011; EVANGELISTA et al., 2019; DE BARROS et al, 2019), podendo diminuir os níveis séricos de testosterona (COSTA et al., 2015b, EVANGELISTA et al., 2019), com eliminação natural de formas amastigotas de *Leishmania* sp. no sêmen (SILVA et al., 2009), sendo relatado por MIR et al. (2012), a presença de infertilidade, hematospermia e teratozoospermia em um cão infectado pelo parasito.

Foram encontradas também formas amastigotas através de marcação com imuno-histoquímica nos testículos, epidídimos, escroto, glande, prepúcio e próstata (BENITES et al, 2011; OLIVEIRA et al, 2016; CARVALHO-JUNIOR et al, 2017). Além disso, foi observado a presença de amastigotas de *Leishmania* sp. na glande de cães associado a um tumor venéreo transmissível (CATONE et al, 2003; MARINO et al., 2012). Já foi visto alta presença de carga parasitária no testículo, epidídimos, prepúcio e escroto de cães naturalmente infectados (MANNA et al., 2012; OLIVEIRA et al, 2016b).

Um estudo sistemático envolvendo cadelas naturalmente infectadas, demonstrou não haver alterações patológicas significativas associadas à infecção por *Leishmania* sp.(SILVA et al., 2008). Em contrapartida, Oliveira (2016a) em sua pesquisa observou que todos os órgãos do sistema genital de cadelas naturalmente infectadas, com exceção dos ovários, apresentam lesões com altos níveis de carga parasitária em todos os órgãos.

Porém em uma pesquisa realizada por Silva et al. (2009), que em condições experimentais, doze cadelas livres de Leishmania copularam com vários cães naturalmente infectados que estavam eliminando *L. infantum* no sêmen. Todos os animais foram alojados na ausência do vetor de inseto. Seis meses após a última cópula, três (25%) cadelas foram soroconvertidas e seis (50%) foram positivas para PCR.

Todos esses achados suportam a ideia de que a LVC pode ter transmissão sexualmente transmitida, na ausência do inseto vetor, e que, provavelmente, se dê de modo unidirecional, com a transmissão mais eficiente de um macho infectado para uma fêmea suscetível, no caso de cães (SILVA et al., 2009).

Embora a transmissão da LVC através do vetor biológico seja a mais comum, nota-se a importância da transmissão venérea especialmente do ponto de vista epidemiológico, uma vez que a grande quantidade de cães errantes e não castrados nas áreas urbanas associada ao elevado número de animais infectados dificulta a implantação de estratégias para controle da doença (DINIZ et. al. 2005).

2.2.4 Ciclo da *Leishmania*

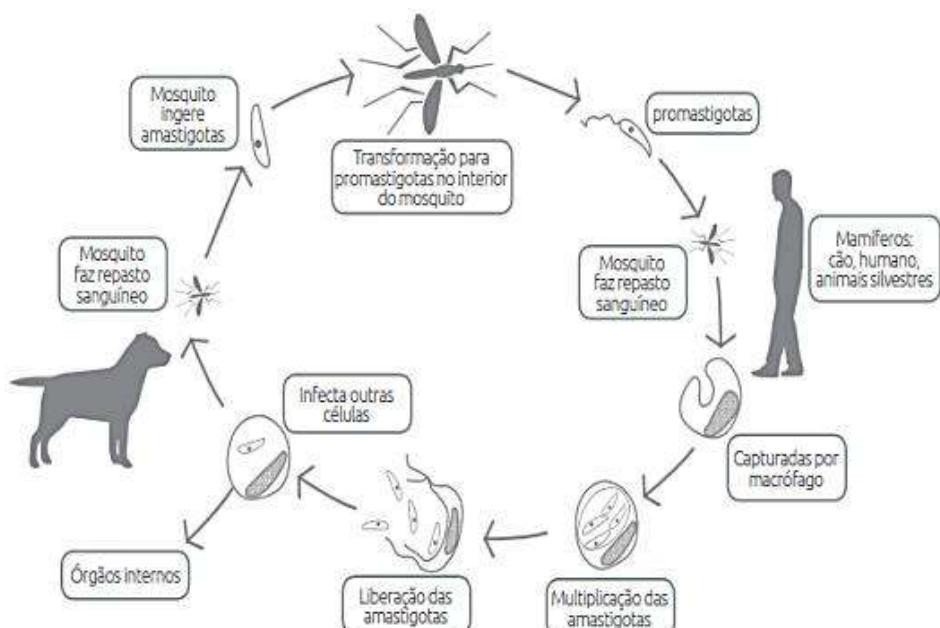
Na fase adulta a fêmea do *Lu. Longipalpis*, para a maturação do seu sistema reprodutor necessita se alimentar de sangue, e é durante este repasto sanguíneo que ocorre a transmissão da doença. Vale ressaltar que a infecção por *Leishmania* no inseto vetor ocorre em 72 horas após a sua ingestão (BRASIL, 2006; SILVA, 2009; BOSSLER, 2012; BRASIL, 2014).

No trato digestivo do vetor, os macrófagos se rompem e liberam as formas amastigotas (Figura 1), estas se reproduzem por divisão binária e se diferenciam para as formas promastigotas, que se transformam em paramastigotas, as quais se alojam no esôfago e na faringe do vetor, onde permanecem aderidas no epitélio pelo flagelo até se diferenciarem em promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado (BRASIL, 2006).

Estas quando são inoculadas na pele do hospedeiro, invadem os macrófagos e neles se diferenciam em amastigotas e se multiplicam, provocando o rompimento da célula, quando estas estão repletas de parasitos. As primeiras células a serem recrutadas para o local são os neutrófilos, essas células participam ativamente nos mecanismos de defesa contra a infecção, porém elas também podem participar como elementos de evasão do protozoário, possibilitando a entrada silenciosa e sobrevivência do parasito nos macrófagos (LASKAY et al., 2008; RITTER et al., 2009; CHARMOY et al., 2010).

Dependendo da resposta do hospedeiro, *Leishmania* pode se disseminar nos macrófagos e rompê-los e em seguida serem fagocitados por células mononucleares do sistema reticuloendotelial, para corrente sanguínea e outros órgãos, tais como baço, medula óssea, fígado, causando uma infecção crônica (PODINOVSKAIA e DESCOTEAUX, 2015).

Figura 1. Ciclo da *Leishmania* sp. no vetor e no hospedeiro vertebrado.



Fonte: <https://br.virbac.com>

2.2.5 Reservatório

O cão (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório peridomiciliar do agente etiológico tanto em áreas urbanas quanto em áreas semiurbanas (BANETH E SOLANO-GALLEGO, 2012), estes apresentam alto parasitismo cutâneo, facilitando a transmissão do vetor (MAGALHÃES et al., 2016), podendo estar presente também em equídeos e roedores, assim como, no gato doméstico, que em pesquisas recentes é apontado como reservatório doméstico adicional e/ou hospedeiros secundários, alternativos ou acidentais. (DA SILVA et al., 2010; MAIA, 2011; SCHIMMING e SILVA, 2012; NEMATI et al., 2015).

Já no ambiente silvestre, os principais reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris* e *Didelphis Marsupialis*)

(LAINSON,2010; ROQUE & JANSEN, 2014). No estado do Maranhão, um estudo realizado por da Costa et al. (2015) encontrou a presença do parasito em espécies de quirópteros. Enfatiza-se que o homem também pode atuar como hospedeiro reservatório (JÚNIOR et al., 2015).

No Brasil, uma das primeiras observações da infecção canina por *Leishmania* foi realizada por Evandro Chagas, quando este demonstrou a existência da doença no homem e no cão e que a fonte de infecção procedia do flebótomo *Lu. longipalpis* (Chagas, 1936; Chagas et al., 1938). Após esta descoberta o número de casos registrados no Brasil sofreu aumento no decorrer dos anos (BRASIL, 2014).

No Maranhão, do total de 62 amostras sanguíneas analisadas para detecção da infecção por *L. (i.) chagasi* em cães, 32 (51,61%) foram reativos (ABREU-SILVA et al., 2008). No estudo realizado por Barbosa et al. (2010) na cidade de São Luís – MA, a análise sorológica para LVC demonstrou que, das 100 amostras analisadas 67% apresentaram resultados positivos para anticorpos IgG anti-Leishmania. Já um levantamento realizado com animais encaminhados para o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) no periodo de 2009-2012, revelou 564 de casos de cães soropositivos para LV na ilha de São Luis (SALES et al., 2017).

A distribuição da LVC, ou calazar, como é popularmente conhecida, não ocorre de maneira uniforme mesmo em áreas endêmicas, porém apresenta caráter focal e sua ocorrência está relacionada com a distribuição dos vetores infectados (COSTA, 2011). Evidenciando assim, a importância de pesquisas e controle da enfermidade no estado.

2.2.6 Prevenção, controle e tratamento

A prevenção da leishmaniose está relacionada com medidas de controle voltadas para proteção do meio ambiente, dos animais e humanos contra a propagação da ação do inseto vetor da doença. O uso de coleiras repelentes, vacinas, aplicação de inseticidas, proteção de canis com telas e a eliminação de focos do flebotomíneo são algumas das formas de precaução recomendadas (BRASIL,2006; SERENO et al.,2012).

De acordo com a Nota Técnica Conjunta n° 001/2016 MAPA/MS, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) deferiu o registro do fármaco MilteforanTM, liberando seu uso para o tratamento de cães infectados, porém é sabido que o mesmo não garante a cura, e sim a diminuição da carga parasitária do organismo do animal, visto que existem várias pesquisas que ainda buscam encontrar a cura para esta enfermidade. A portaria ainda destaca que, o tratamento de cães com LVC não se configura como uma medida de saúde pública para controle da doença e, se tratando unicamente de uma escolha do proprietário do

animal (BRASIL, 2016). Considerando esse relato, e que a infecção do cão geralmente precede a infecção humana, o governo brasileiro instituiu a eutanásia de cães infectados como uma das principais políticas de controle em áreas endêmicas (BRASIL, 2018).

2.2.7 Aspectos clínicos e resposta imunológica

A LVC pode se apresentar de forma assintomática ou sintomática, podendo levar o animal a óbito. Estes diferentes quadros clínicos dependem da resposta imunológica do cão e da cepa do parasito inoculado pela picada do inseto vetor (SILVA, 2007; FREITAS et al., 2012). Os animais sintomáticos, podem apresentar diversos sinais clínicos tais como: febre, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia, úlceras de pele, onicogriose, oftalmopatias, dermatite granulosa e ulcerativa, blefarite e alopecia (PALTRINIERI et al., 2010; DE FREITAS, et al., 2012; LIMA et al., 2014). Podendo apresentar sinais clínicos atípicos, tais como lesões no trato reprodutivo de cães (DINIZ et al., 2005; MIR et al., 2012).

Pesquisas realizadas com cães infectados com LV, demonstram que cães assintomáticos podem representar fonte de infecção para os flebotomíneos (GUARGA et al., 2000), embora as taxas de infecção sejam mais consistentes em cães infectados e sintomáticos (TRAVI et al., 2001), ressaltando a importância de se estudar os grupos de maneira detalhada quanto a resposta do sistema imunológico frente a infecção.

A infecção por *Leishmania* pode desencadear dois tipos de imunidade adaptativa associada à atividade dos linfócitos: a resposta celular que preferencialmente promove a resistência à infecção, tipo T *helper* 1 (Th1), que está relacionada a ativação de células T CD4+ e com a produção do INF- γ , IL-2 e IL-12, e fator de necrose tumoral (TNF). A presença de INF- γ , aumenta a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) nos macrófagos, gerando espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, tais como o superóxido e o óxido nítrico, que agem de forma microbicida sobre os parasitos presentes nos macrófagos (MACHADO, 2008; GORIELY et al. 2009; ROSA & MACHADO, 2011).

O outro tipo de resposta adaptativa é resposta humoral (anticorpos) do tipo T *helper* 2 (Th2), associada à susceptibilidade à doença. Esta produz IL-4 e fatores que desativam macrófagos como a IL-10, TGF- β e prostaglandina E2 que induzem as células do tipo B para a produção dos anticorpos IgG1 e IgE (MACHADO, 2008; ROSA e MACHADO, 2011), caracterizando assim uma infecção com resposta polarizada (ROGERS et al., 2002).

A LVC, assim, exibe polarização, visto que cães com infecção crônica, tanto natural quanto experimental, podem apresentar sintomatologia específica, com doença progressiva e

fatal (susceptíveis) ou serem assintomáticos, apresentando resistência à infecção (PINELLI et al., 1994).

A interleucina IL-12, que é a primeira citocina a ser liberada em um tecido infectado e é essencial para a iniciação e polarização da resposta imunológica e também para a inibição da apoptose das células Th1, desempenhando um papel importante na fase inicial da inflamação, porém por um curto período de tempo (BANETH, 2006).

A resposta imune Th2 está relacionada com a manifestação e desenvolvimento dos sinais clínicos nos cães, com alterações nos órgãos linfoides, principalmente com uma diminuição das regiões ricas em células T e uma proliferação nas áreas com predominância de células B (PINELLI et al., 1994; LEANDRO et al., 2001; RODRIGUES, et al., 2009). Estas alterações têm como consequência o aumento e/ou mudança conformacional de órgãos como fígado, baço e linfonodo (SANTANA et al., 2007; STRAUSS-AYALI; et al., 2007; LIMA et al., 2014).

Em cães assintomáticos, a infecção normalmente promove a doença sistêmica crônica, associada a uma resposta proliferativa específica de células mononucleares no sangue, possuindo抗ígenos específicos, com produção de INF- γ , IL-2 e TNF- β e baixas concentrações de anticorpos anti-*Leishmania*. Já os animais sintomáticos apresentam supressão de células T com produção de IL-10 e TGF- β e altos níveis de anticorpos específicos (QUINNELL et al., 2001; SANTOS-GOMES et al., 2002; CORRÊA et al., 2007).

A produção de IL-10 na LVC está presente em todos os grupos estudados, nos animais assintomáticos e nos sintomáticos (CORRÊA, et al., 2006; DOSSI, 2006; QUINNELL et al., 2001). Esta citocina pode promover o incremento de uma resposta Th2, bloqueando a proliferação de células Th1 (VARELLA & FORTE, 2001). Esta teoria também foi vista em estudos com humanos com LV (KARP, et al 1993). Porém, ela se apresenta em dosagens diferentes, em um estudo realizado por De Rosário et al. (2018) observaram um aumento dos níveis de IL-10 no soro dos cães portadores de sinais clínicos para LVC, e a presença dessa elevação pode estar relacionada com a susceptibilidade à doença, o estudo ainda enfatiza que o aumento dos níveis de INF- γ apresentado em cães que não possuem sintomatologia clínica, pode estar associado à cronicidade da infecção.

Barbosa et al. (2011), demonstraram que diferentes órgãos/tecidos que abrigam parasitas provocam respostas imunológicas celulares específicas, ressaltando a importância da

avaliação da associação da carga parasitária com a resposta imune na LV, uma vez que se considera que os moduladores imunológicos desempenham um papel importante na patogênese da doença (ALVES, et al., 2009). Em pesquisas experimentais com roedores também foram observadas diferenças, onde Gomes-Pereira et al. (2004) observaram diferenças na dinâmica das subpopulações de células T CD4+ e CD8+ de memória no baço e no fígado de camundongos infectados.

2.2.8 Resposta imune da LVC no trato reprodutor masculino de cães.

A frequência e a intensidade das lesões inflamatórias no trato genital correlacionam com a manifestação clínica da doença e a carga parasitária, onde o número de amastigotas no testículo aparentemente atua como fator desencadeante da resposta inflamatória (DINIZ et al., 2005).

Benites et al. (2011), ao estudar o perfil leucocitário do trato reprodutor de cães naturalmente infectados, demonstraram haver uma maior quantidade de amastigotas em cães sintomáticos quando comparados ao assintomáticos, além de um perfil leucocitário distinto entre eles, com maior quantidade de neutrófilos, macrófagos e linfócitos no testículo e epidídimos de cães sintomáticos. Notadamente, o testículo é imunologicamente privilegiado, baseado no fato das células de Sertoli separarem mecanicamente todas as células germinativas autoimunogênicas do sistema imunológico por meio da barreira hematotesticular (DE CESARIS et al., 1992), sugerindo que a atividade imunocelular do trato reprodutor pode estar relacionada a susceptibilidade à infecção (BENITES et al., 2011). No entanto, tal hipótese carece de investigação.

Foi relatado também que a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. no epidídimos de cães altera o perfil leucocitário desse órgão, ocasionando maior migração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos para o lúmen (BENITES et al., 2011), o que indica uma resposta imunológica mais demorada, característica de casos crônicos com alta parasitemia (REIS et al. 2009).

O papel da imunidade humoral e celular durante a resposta imunológica sistêmica e compartimentalizada relacionada à susceptibilidade/resistência à infecção por *Leishmania* sp. em cães tem sido estudada (PINELLI et al., 1994, 1995; BOURDOISEAU et al., 1997; SOLANO-GALLEGO et al., 2001, 2005; REIS et al., 2006; GIUNCHETTI et al., 2008; LAGE et al., 2007), no entanto, no cão, o trato genital ainda não foi estudado.

Um estudo experimental usando hamsters como modelo de infecção com o objetivo de estudar a cinética de infecção da *L. chagasi* no trato genital, demonstrou que o testículo possuía uma alta carga parasitária, associada ao aumento de citocinas pró-inflamatórias tais como IL1 β , TNF- α e IFN- γ (T helper 1 – Th1), favorecendo ao controle da infecção. Por outro lado, a produção de testosterona e IL-4 conduziram à infecção persistente por estabelecerem uma resposta imunológica do tipo Th2 local (QUINTAL et al., 2016).

Todos juntos, esses dados suportam a hipótese que o trato reprodutor dos cães é envolvido durante a LVC e que o perfil de resposta imunológica local é diretamente relacionado à carga parasitária.

2.2.9 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da leishmaniose visceral canina é complexo, pois os sinais clínicos da doença são variáveis e inespecíficos, comuns a outras enfermidades que acometem o cão. A imunossupressão causada por *Leishmania* pode gerar infecções oportunistas, dificultando do mesmo modo o diagnóstico da LV (FEITOSA, et al., 2000; TAFURI, et al., 2004).

Devido à alta prevalência de animais assintomáticos, o diagnóstico da LVC consiste na avaliação conjunta de parâmetros clínicos, bioquímicos, epidemiológicos e parasitológicos (ALVAR et al., 2004). A sorologia é o principal método empregado para os diagnósticos de rotina e levantamentos epidemiológicos da doença, uma vez que a maioria dos animais infectados apresentam elevados títulos de anticorpos específicos na circulação (DE LIMA, 2010).

Dentre as principais técnicas sorológicas, podemos destacar a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio imunoenzimático (ELISA) (SILVA et al, 2011). Atualmente, o Ministério da Saúde substituiu o protocolo de diagnóstico da LVC, sendo utilizado atualmente o Teste Imunocromatográfico DPP (Dual Path Platform, Biomanguinhos) como teste de triagem e o ELISA® – (Kit EIE Leishmaniose Visceral Canina - Biomanguinhos) como teste confirmatório (BRASIL, 2011). O DPP utiliza o antígeno recombinante K39 (rK39) representando um avanço importante no diagnóstico da LV (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2012). Porém, falhas nesses resultados podem causar a eliminação de animais não infectados, e, por outro lado, não detectar casos positivos, favorecendo a disseminação da doença (SILVA et al., 2016; LOPES, et al, 2017).

Nos testes sorológicos, os altos níveis de anticorpos confirmam a positividade da doença, no entanto, os níveis negativos e baixos níveis de anticorpos não descartam a possibilidade da positividade do diagnóstico para LVC, nem sempre resultados fracamente positivos correlacionam-se com a gravidade da doença clínica pois estas podem se manifestar de forma assintomática. Porém, sua baixa sensibilidade para detectar casos com pouca ou ausência níveis de anticorpos específicos para *Leishmania* e sua reatividade cruzada com outras doenças, incluindo a doença de Chagas, a babesiose e a erliquiose representam importantes limitações (DE CASTRO et al, 2007; PEREZ et al., 2016).

No protocolo proposto pelo MS, apenas amostras positivas no primeiro teste devem ser analisadas no segundo (BRASIL, 2011). Considerando que em alguns países, como Brasil, o resultado falso positivo pode levar um cão não infectado a morte e resultados falsos negativos podem causar a manutenção de cães infectados na população, os testes de diagnóstico devem ser altamente preciso. Na ausência de um protocolo adequado, uma combinação de métodos diferentes podem ser uma maneira racional de obter um diagnóstico mais confiável (COSTA et al., 2015; LOPES, et al., 2017; LAURENTI, 2014).

Dessa forma, o advento de métodos mais acurados com a capacidade de avaliação molecular e imunológica como: a Reação em Cadeia da Polimerase e suas variações (RT-PCR, qPCR), a Citometria de Fluxo e outras metodologias *in situ* ou *in vitro* podem incrementar o diagnóstico da doença clínica e/ou subclínica, dando o suporte às investigações da infecção e patogênese da leishmaniose na espécie canina (CARVALHO NETA et al, 2006; RAMOS et al. 2012).

Na técnica de imuno-histoquímica (IHQ) o diagnóstico depende do achado de estruturas coradas pelo cromógeno, de forma e de tamanho compatíveis com amastigotas(RAMOS-VARA, et al., 2008; XAVIER, et al 2006). A IHQ é considerada complementar à histopatologia, pois apresenta boa especificidade e sensibilidade, de cerca de 60 a 70 %(TAFURI et al, 2004; ORDEIX et al., 2005). O MS inclui a técnica como exame de referência para o diagnóstico de casos autóctones de LVC, sendo parte do fluxograma de ações de controle e vigilância da enfermidade (BRASIL, 2013).

A PCR está sendo utilizada com sucesso para detecção de *Leishmania* spp. (PEREIRA et al, 2016; LOPES et al., 2017; SELDER et al ., 2018, FERNANDES et al., 2019).

Estas são mais sensíveis do que os métodos sorológicos usuais, permitindo o diagnóstico precoce antes da soroconversão (COURA-VITAL et al., 2013).

Com o advento da PCR em tempo real (qPCR), os resultados mostraram que a técnica oferece resultado mais rápido e risco reduzido de contaminação (MOHAMMADIHA et al. 2013; DE CARVALHO et al., 2018). Através de sua utilização, pode-se medir quantitativamente os parasitas presentes no fragmento analisado, demonstrando especificidade e sensibilidade suficiente para detectar baixa carga parasitária, ou seja, até mesmo quando o parasita está presente em densidades muito baixas (LACHAUD et al. 2002; MOHAMMADIHA et al. 2013b). Quaresma et al. (2009) encontraram índices de detecção de 0,1 fg de DNA do parasita/ μ L, que corresponde a 1/3000 do conteúdo total de DNA de um único parasita (300 fg).

Recentemente, de Carvalho et al. (2018) mostrou que qPCR pode contribuir principalmente para o diagnóstico de cães assintomáticos, evitando a eutanásia indesejada. Um estudo realizado por Hossain et al. (2017) demonstrou que a ferramenta obteve sucesso para determinar a carga parasitária da pele em cães durante um tratamento esquema para impedir a transmissão de LV. Embora o qPCR seja um método promissor para análises qualitativa e quantitativa no monitoramento do tratamento da LV canina, ainda não há o consenso na melhor combinação de genes e/ou tecido para a detecção do DNA dos parasitas.

Enfatizando que este método fornece maior sensibilidade em detecção de parasitas em vários tecidos e em diferentes grupos clínicos, em comparação com métodos convencionais de PCR (REIS et al. 2013). Além desta avaliação, essa metodologia permite quantificar a expressão de genes específicos, como as das citocinas pré e pró-inflamatórias relacionadas com a infecção do parasito, mostrando comparações efetivas entre animais sintomáticos e assintomáticos, como já foi realizado por Sudarshan e Sundar. (2014); De Rosario et al. (2018).

Sendo assim, cães que apresentam leishmaniose manifestam uma variedade de respostas inflamatórias dependendo da carga parasitária e os sinais clínicos da doença, tipicamente relacionados com a imunologia características de um indivíduo (REIS et al., 2006). Porém, com relação ao trato reprodutivo de cães essa caracterização imunológica ainda não foi realizada, enfatizando assim a relevância do presente estudo.

Embora a transmissão da LVC através do vetor biológico seja a mais comum, nota-se a importância da transmissão venérea especialmente do ponto de vista epidemiológico, uma

vez que a grande quantidade de cães errantes e não castrados nas áreas urbanas associada ao elevado número de animais infectados dificulta a implantação de estratégias para controle da doença (DINIZ et. al. 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a infecção do trato reprodutor masculino de cães na leishmaniose visceral, com ênfase nos aspectos imunopatológicos e parasitários.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as lesões macroscópicas e microscópicas associadas à LVC no trato reprodutivo através de histopatologia e imuno-histoquímica;
- Estimar a carga parasitária de Leishmania no trato reprodutor por qPCR e correlacionar com os dados de expressão gênica de citocinas;
- Avaliar a expressão das citocinas IL- 4, IL- 10, IL- 12, iNOS, TNF- α e IFN- γ no trato reprodutor de cães com LV através do qPCR;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações Éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, sob o número de protocolo 09/2017.

4.2 Animais e colheita de amostras

As coletas foram realizadas de janeiro de 2018 a maio de 2019, onde obteve-se 16 cães machos adultos, sexualmente maduros com idade variando entre 7 meses a 12 anos, sem raça definida aleatoriamente selecionados provenientes do Hospital Veterinário “Francisco Uchoa Lopes” da Universidade Estadual do Maranhão(UEMA) e da Unidade de Vigilância em Zoonoses (UVZ) da Ilha de São Luís – MA, encaminhados para eutanásia com diagnóstico positivo para leishmaniose. Primeiramente foi realizada a colheita do sangue dos animais, estes foram acondicionados em tubos com e sem EDTA, para a realização dos testes de diagnóstico sorológico e molecular respectivamente.

Os animais foram eutanaziados, obedecendo às normas estabelecidas pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), Resolução nº. 1000, de 11 de maio de 2012, assim como pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual do

Maranhão – UEMA. Sendo que, a eutanásia foi realizada pelos médicos veterinários dos locais de coleta.

Durante a necropsia, fragmentos do trato genital interno: ambos os testículos, ambos os epidídimos e glândula prostática, e trato genital externo, a saber: prepúcio e glande, foram colhidos e seccionados e imediatamente imersos em formalina tamponada a 10% ou Bouin (fragmentos de testículo) e fixados 24 horas e 18 horas, respectivamente. Após a fixação, os tecidos foram imersos em álcool 70% até o processamento histológico. Fragmentos dos mesmos tecidos foram coletados e armazenados em criotubos estéreis livres de nucleases acondicionados a -20°C para extração de DNA, e em microtubos estéries contendo a solução de estabilização RNAlater® (Life Technologies), para extração de RNA, ambos mantidos sob refrigeração por no mínimo 24 horas e, posteriormente, acondicionados a -20°C até a realização da qPCR. Todo material coletado foi acondicionado no Laboratório de Patologia Molecular (LPMol) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA).

4.3 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizado por meio do kit EIE-Leishmaniose Visceral Canina, Bio-Manguinhos de acordo com as instruções do fabricante. Para realização da RIFI, os soros dos animais foram diluídos em Tampão fosfato salino (PBS, pH 8) na proporção de 1:40, como preconizado pelo Ministério da Saúde. Posteriormente, foram dispostos em lâminas de vidro previamente sensibilizadas com a cepa CBT 153 de formas amastigotas de *L.infantum* durante 30 minutos a 37°C na estufa, seguido de 3 lavagens de 5 minutos cada em PBS. Em seguida as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário (conjugado com fluoresceína, que foi diluído utilizando 398µl de PBS+ Azul de Evans para 2µl de conjugado) anti-cão oriundo de coelhos, em temperatura de 37°C durante 30 minutos, em câmara úmida. Em seguida as lâminas foram novamente lavadas em PBS durante 5 minutos, secadas à temperatura ambiente, montadas com lamínula e observadas em microscópio de fluorescência. Soro de cão sabidamente infectado com *Leishmania* spp. foi utilizado como controle positivo.

4.4 Processamento histológico

Os tecidos fixados foram submetidos as técnicas histológicas de rotina. Após a inclusão, o material foi cortado na espessura de cinco micrômetros (5 µm) com micrótomo rotativo HM 360 MICROM e corados pela técnica de Hematoxilina & Eosina (HE). Por fim, as lâminas foram analisadas em microscopia de luz. Foi atribuído escore para as lesões

inflamatórias nos diferentes tecidos, de acordo com a intensidade das lesões: 0 para ausência de lesões, 1 para discreta, 2 para moderada e 3 para intensa.

4.5 Imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada segundo Tafuri et al. (2004) com adaptações, utilizando-se cortes histológicos de 5 µm e aplicação de anticorpo primário soro hiperimune de cão naturalmente infectado com *L. chagasi*, diluído 1:50 em PBS por uma hora em câmara úmida. O bloqueio da peroxidase endógena foi feita utilizando peróxido de hidrogênio a 3% em PBS durante 30 minutos e o bloqueio de sítios inespecíficos de ligação do anticorpo com leite desnatado a 3% em PBS por 45 minutos. Após lavagem em PBS as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário (kit Dako EnVision™+ Dual Link System-HRP) por 45 minutos em câmara úmida e, em seguida, lavadas novamente com PBS. A reação foi revelada pela diaminobenzidina (DAB) e as lâminas contracoradas com hematoxilina de Mayer. Uma amostra de prepúcio de cão sabidamente infectado por *Leishmania* foi utilizada como controle positivo. No controle negativo substituiu-se o anticorpo primário por PBS.

4.6 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue e dos tecidos do trato reprodutor dos cães foram realizadas utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), conforme instrução do fabricante. As amostras de tecido do testículo direito e esquerdo, e epidídimos direito e esquerdo foram feitas em pools. A concentração e qualidade do DNA extraído foi avaliada em Nanodrop e após a avaliação as amostras foram diluídas e padronizadas.

4.7 PCR convencional

O DNA extraído das amostras de sangue foi amplificado em termociclador utilizando os iniciadores específicos de *Leishmania chagasi*, como descritos na tabela 1. As amostras irão, ainda, serem submetidas à PCR convencional para diagnóstico diferencial de *Trypanossoma* sp. e *Toxoplasma gondii* (tabela 1).

As amplificações foram realizadas em um termociclador e dimensionadas para atingir um volume final de 12,5 µL contendo: 6,25 µL de PCR Master Mix Promega; 0,5 µL de cada primer (10 pmol); 4,25 µL de água DNase e RNase free e 1 µL de DNA extraído. Foram utilizados controles positivo (cão sorologicamente e parasitologicamente positivo para *Leishmania chagasi*) e negativo em cada reação. Os parâmetros utilizados para PCR foram os mesmos descritos por Lachaud et al, (2002). Os produtos de PCR foram avaliados em gel de agarose a 1,5%, utilizando marcador de peso molecular de 100 pb (1Kb DNA ladder

Promega®), programação na cuba de eletroferese de 100V, 100 mA, por 40 minutos de corrida. Após, os amplificados foram visualizados e fotografados em fotodocumentador.

Tabela 1 Lista de iniciadores utilizados na PCR convencional.

Sequência Alvo	Iniciadores (5'-3')	Tamanho do produto	Referência
<i>Leishmania</i> <i>chagasi</i>	CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAG CCACCTGGCCTATTTACACCA	145 pb	Lachaud et al., 2002.
<i>Toxoplasma</i> <i>gondii</i>	CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG CGCTGCAGACACGTGCATCTGGATT	529 pb	Homan et al., 2000
<i>Trypanossoma</i> sp	CCCAGTGCCTCCAATCCTGTAAC CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT	337 pb	Muller et al., 1996

4.8 Quantificação da carga parasitária por qPCR

Os procedimentos para a quantificação da carga parasitária e diagnóstico de LVC nos fragmentos do trato reprodutor, foram realizados por meio da técnica de PCR quantitativa em tempo real, na qual utilizou-se triplicatas de reações de 20 µL com amostras na concentração de 5ng/µL de DNA e amplificado em termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando os iniciadores KDNA3 F (senso: 5'-GGGTAGGGCGTTCTGC-3') e KDNA3 R (anti-senso: 3'-TACACCAACCCCCAGTTGC- 5') previamente descritos por Weirather et al. (2011), cujo alvo é uma região conservada do cinetopasto do parasito e o GAPDH FW (senso: 5'-TTCCACGGCACAGTCAAG -3') e GAPDH REV (anti-senso: 3'-ACTCAGCACCAGCATCAC- 5') referência genebank nº AB038240.1 usado como gene endógeno da reação.

A curva padrão foi construída a partir de diluições seriadas ao décimo de concentração conhecida de DNA de *Leishmania* extraído de cultura in vitro de formas promastigota de *L. infantum*, previamente caracterizada pelo Laboratório de Referência Nacional para tipagem de *Leishmania* (CLIOC) do Instituto Oswaldo Cruz. As reações foram preparadas com a adição de 1,0 µL de cada iniciador a uma concentração de 2,5pmoles/µL,

10 μ L de Sybr Green PCR master mix (Applied Biosystems), 4 μ L de DNA 3,0 μ L de água DPEC para completar o volume final da reação de 20 μ L. A reação ocorreu nas seguintes condições: uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos; seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os resultados foram analisados utilizando o programa 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) onde foi avaliado: a curva de dissociação formada e a quantificação do número de cópias de DNA conforme a curva padrão.

4.9 Extração de RNA

Para a extração de RNA, primeiramente o tecido coletado foi macerado e adicionado 1 mL de Trizol (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA), em seguida as amostras foram extraídas seguindo o protocolo preconizado pela Invitrogen; Carlsbad, CA, USA.

4.10 Síntese de cDNA

O RNA (1,5 μ g) foi retrotranscrito em cDNA utilizando-se o kit comercial Super Script III First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguindo o protocolo do fabricante. Para uma reação de volume final de 20 μ L. Para a síntese serão utilizados 3,0 μ L de água DEPC, 1,0 μ L de Random Hexâmero (50 μ g/ μ L), 1,0 μ L de Anneling Buffer, 2,0 μ L de RNase OUTTM Enzime Mix, 10,0 μ L de 2x First-Strand Reaction Mix. Os parâmetros utilizados para a síntese do cDNA foram: 65°C por 5 minutos, incubado em gelo por 1 minuto, 25°C por 10 minutos, 50°C por 50 minutos. Posteriormente o cDNA será armazenado a -20°C.

4.11 PCR Quantitativa em tempo real (qPCR)

A expressão gênica será realizada utilizando-se 2,5 μ l de cDNA, 10 μ M do par de primers específico para cada gene (Tabela 2) e 12,5 μ l de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix – UDG with ROX, Invitrogen) em um volume final de 25 μ l por reação. Seguindo os mesmos parâmetros utilizados para a quantificação da carga parasitária. Será utilizado o método comparativo de Ct (*cycle threshold*) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para análise dos dados de expressão gênica, como descrito por (Livak e Schmittgen, 2001).

Tabela 2. Lista de genes e iniciadores utilizados no RT-PCR em tempo real.

Sequência Alvo	Iniciadores (5'-3')
Inos	AAGATCCCCATTCCGGATAC AGCCTGAAGATCCGACTCAA
IL-4	CATCGGCATTTGAACGAGGTCA CTTATCGATGAATCAGGCATCG
IL-10	GCCTAACATGCTTCGAGATC TGATGTCTGGGTCTGGTTC
IL-12	ACCTGCAGCTGAAGCCATTG GTCTTGTCACGCAGAGTCT
IFN- γ	GGAAGACATGCTTGGCAAGTTC GGTGAGAGATCATTCATCACTTG
TNF- α	GCCGCAGTACAGTAGCAGCTCT GTTGACCTTGTCTGGTAGGAGACGG
GAPDH	GAGAAGGCTGGGGCTCACTTG GCTGACAATCTTGAGGGTGTG
β -actina	GGCATCCTGACCCTGAAGTA CGCAGCTCGTTGTAGAAGGT

4.12 Análise Estatística

Os resultados da carga parasitária foram submetidos a análise estatística não paramétrica pelo teste Mann Whitney (Graphpad Prism 8.0, USA). Os dados de expressão gênica serão normalizados com base na expressão de β -actina e GAPDH. Todos os valores de Ct normalizados sofrerão transformação logarítmica e os dados obtidos serão submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias vão ser comparadas pelo teste t de Student (Graphpad Prism 8.0, USA). Diferenças serão consideradas significativas quando $p < 0,05$. Correlação de Spearman será utilizada para correlacionar os dados de expressão gênica e carga parasitária.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Abordagem clínica

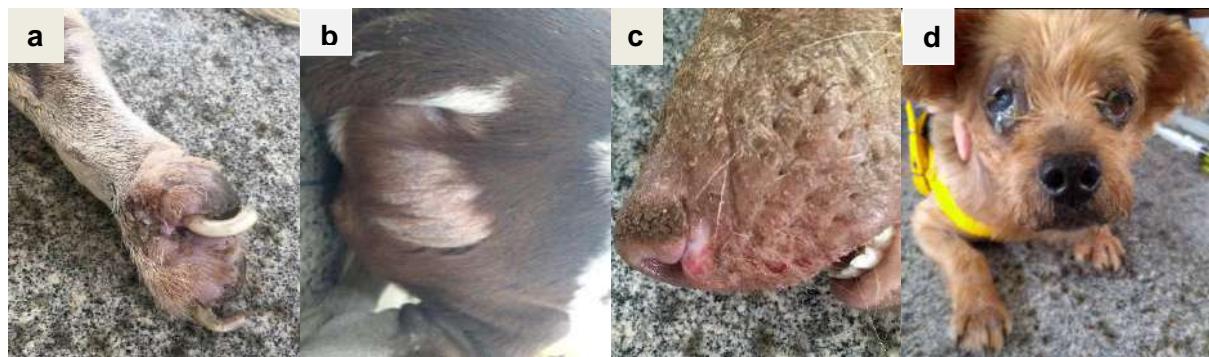
Os 16 animais coletados foram subdivididos em grupos de animais sintomáticos e assintomáticos de acordo com os sinais clínicos apresentados. Os animais considerados sintomáticos foram aqueles que manifestaram sintomatologia típica de LVC e os assintomáticos aqueles que não apresentaram.

Foi possível observar grande ocorrência de dermopatias, oftalmopatias e onicogrifose (Tabela 3; Figura 2). A maioria dos animais sintomáticos apresentaram emagrecimento, corroborando com os resultados obtidos por Contreras et al. (2019), que em seu trabalho observou uma frequência de 50% de presença desse sinal clínico nos cães analisados, assim como, Silveira et al. (2018), que relataram a anemia em 68% dos animais, a existência dessa manifestação clínica pode ser explicada pela albuminúria desencadeada pelo desequilíbrio protéico e envolvimento da mucosa gástrica, que pode estar relacionado ao envolvimento sistémico da doença e ao acometimento do sistema imunológico do animal, sendo causada geralmente por doença renal crônica ou pela redução da eritropoiese em doenças crônicas, que é agravada pela perda de sangue, imunossupressão ou destruição de células sanguíneas(FEITOSA et al.,2000).

Tabela 3. Frequência de sinais clínicos apresentados pelos cães sintomáticos para LVC

Sinais clínicos	%
Anemia	12,5%
Emagrecimento	75%
Esplenomegalia	37,5%
Hepatomegalia	50%
Linfoadenomegalia	75%
Dermopatias	87,5%
Oftalmopatias	87,5%
Onicogrifose	87,5%

Figura 2. Imagem representativa dos sinais clínicos apresentados pelos cães com LVC.



2a: Onicogrifose; 2b:Abdomên do cão apresentando perda de pêlo; 2c: Lesão ulcerativa no focinho; 2d: Cão apresentando ocular secreção puerolenta.

Entre as dermopatias observadas nesse estudo destacaram-se: descamação e lesões ulcerativas no focinho, ponta de orelhas, pescoço, face, cauda e nos membros posteriores e anteriores (patas), perda de pelos e seborreia generalizada, além da grande frequência de onicogrifose (87,5%). Os sinais clínicos aqui descritos são semelhantes aos obtidos por Wilson et al. (2012); Saridomichelakis e Koutinas (2014), que estudaram sobre as principais dermopatias que acometiam cães infectados com *Leishmania infantum*, destacando as lesões ulcerativas, crostosas, foliculite, dermatite seborreica, alopecia, onicogrifose e hiperqueratose, podendo-se observar uma ligeira repetição em determinados sinais clínicos, assim como no presente estudo. A onicogrifose se destacou como uma das sintomatologias mais marcantes da LVC, conforme descrito por Silveira et al. (2018), que isso ocorre devido a capacidade do parasita em estimular a matriz ungueal a crescer além da apatia comum nos animais acometidos, diminuindo portanto seus movimentos, e consequentemente reduzindo o desgaste natural das unhas.

As dermatopatias observadas neste trabalho foram mais frequentes na ponta da orelha, focinho, face e ouvidos, pois são locais mais expostos do animal, sendo estas regiões já previamente descritas por Madeira et al. (2003) e Silveira et al. (2018) como as mais frequentes no cão.

Quanto as oftalmopatias observadas, foram registradas: blefarite, opacidade da córnea e alopecia periocular, secreção purolenta. Estas alterações oftálmicas são comumente descritas entre as manifestações clínicas da LVC, com destaque a: uveíte, edema uveal, corneano e miose segundo Feitosa et al. (2000) e Koutinas e Koutinas. (2014). As oftalmopatias também foram observadas por Contreiras et al. (2019), além da presença de mucosas normocoradas. Estes sinais clínicos podem ocorrer devido à deposição de imunocomplexos e anti-anticorpos contra *Leishmania* nos tecidos oculares (SILVEIRA et al, 2018).

A ocorrência de hepatomegalia, esplenomegalia e linfoadenomegalia descritas, coincidem com achados nos estudos de Wilson et al. (2012) e Koutinas e Koutinas (2014), os quais relatam que estes sinais ocorrem nas fases adiantadas da doença (FEITOSA et al., 2000; SILVA et al., 2001). Silveira et al. (2018) afirmam que a linfadenopatia pode ocorrer devido ao aumento do número de células do sistema mononuclear fagocítico quando o infecção está instalada, já a hepatoesplenomegalia, pode acontecer em consequência da produção de células B e macrófagos e proliferação de amastigotas .

Além disso, Abreu-Silva et al. (2008) encontraram as mesmas lesões descritas em cães soropositivos no estado do Maranhão, enfatizando que os sinais aqui apresentados são

característicos da enfermidade, sendo que essa doença possuiria alta variação em relação a manifestação dos sinais clínicos, por possuir diferença quanto à resposta imunológica individual expressada (SAPORITO et al., 2013).

5.2 Dianóstico sorológico e molecular.

Com relação ao teste de Reação de Imunofluorescência Indireta RIFI, dois animais apresentaram resultado negativo, os demais foram sororeagentes. Vale ressaltar que o teste de imunofluorescência- ELISA, ainda está sendo realizado.

Das amostras de sangue dos animais coletados submetidas a PCR convencional, 15 apresentaram diagnóstico positivo para *Leishmania infantum* apresentando uma única amostra negativa (Figura 3). Evidenciando que, todas as amostras foram positivas em pelo menos um dos testes de diagnóstico realizado (Tabela 4).

Tabela 4: Resultados obtidos através do teste sorológico RIFI e da PCR convencional do sangue dos animais coletados.

Animais	RIFI	PCR
A 1	+*	-*
A 2	+	+
A 3	+	+
A 4	+	+
A 5	+	+

A 6	+	+
A 7	-	+
A 8	+	+
A 9	+	+
A 10	+	+
A 11	+	+
A 12	+	+
A 13	+	+
A 14	+	+
A 15	+	+
A 16	-	+

*Amostras que apresentaram diagnóstico positivo para LVC; ** Amostras que apresentaram diagnóstico negativo para LVC.

Figura 3. Fotografia demonstrativa da amplificação do DNA de *Leishmania infantum* nas amostras de sangue dos cães.



Ladder: Marcador de peso molecular; CN: Controle negativo; CP: Controle positivo; 1-9 amostras positivas para *Leishmania infantum*, evidenciando a amplificação do fragmento de 145 pb.

Os resultados demostraram que os animais que não foram sororeagentes na RIFI, e apresentaram diagnóstico positivo na PCR, podem ser explicados através dos resultados obtidos por Coura – Vital et al. (2013), que mostraram pela primeira vez a importância de um

teste positivo na PCR como fator associado à soroconversão para *L. infantum*, visto que o teste molecular pode detectar a infecção antes da soroconversão, sugerindo que os cães positivos na PCR devem ser monitorados durante todo o teste sorológico.

Esta pesquisa demonstrou que mesmo com baixa variação as amostras que se apresentaram negativas na RIFI foram positivas na PCR, assim como o descrito por Assis et al. (2010), onde observaram que a positividade pela PCR, realizada com o sangue dos 34 cães, elevou o percentual de positivos para 91,0%, quando comparado aos animais soropositivos na RIFI.

Somente um animal apresentou resultado positivo na sorologia e negativo na melecular, este fato pode ser eassociado a problemas com a qualidade do DNA (SILVA et al., 2001), além de que, a carga parasitária no sangue tende a diminuir ao longo do curso de infecção (LEITE et al., 2010). Mesmo com este ponto negativo quanto a utilização de amostras sanguíneas para a detecção do parasito, há estudos que demostram que estas são adequadas para o diagnóstico de LVC (REALE, et al., 1999; PEREIRA et al., 2016; LOPES et al., 2017).

Resultados semelhantes ao deste trabalho foram encontrados por Pereira et al. (2016) e Lopes et al., (2017), onde foram observadas diferenças entre o diagnóstico sorológico por RIFI e PCR convencional de sangue, estes concluíram que a PCR se mostrou mais sensível e específica quando comparada a RIFI.

5.3 Lesões macroscópicas

Foi realizada a avaliação das lesões nos tecidos do trato genital interno (testículos, epidídimos e próstata) e externo (prepúcio, glande) dos animais. Dos 16 animais coletados, cinco (31,25%) apresentaram lesões macroscópicas nos tecidos avaliados do trato genital (Tabela 5) tanto aqueles que apresentaram sinais clínicos clássicos para LVC 60% (3/5), quanto os que não apresentaram 40% (2/5).

Os dois animais (2/16) que apresentaram lesões no prepúcio também apresentaram lesão no saco escrotal (Figura 4), sendo que em um deles houve presença de lesão na glande. Foi possível observar em dois diferentes animais a ocorrência de hiperplasia prostática (12,5%), somente um animal (6.25%) apresentou aumento do testículo e epidídimos unilateral, assim como, hiperplasia testicular (6,25%).

Tabela 5. Frequência de lesões no trato reprodutor de cães com LVC.

Lesões no trato reprodutor	%
Lesões no prepúcio	12,5%
Lesões saco escrotal	12,5%
Hiperplasia prostática	12,5%
Lesão na glande	6,25%
Hiperplasia testicular	6,25%
Orquite e epididimite	6,25%

Figura 4. Lesões no trato reprodutor de cães com LVC.



3.a: Cão apresentando lesão no prepúcio; 3.b: Lesão no saco escrotal; 3.c: Presença de lesão ulcerativa na glande.

Contrariamente Amara et al. (2009), em sua pesquisa utilizando também cães machos naturalmente infectados por *L. infantum* não revelam alterações macroscópicas nos órgãos genitais, mesmo existindo lesões histológicas. Porém, resultados concordantes com os aqui descritos foram vistos por Madeira et al. (2003), que encontraram lesões no saco escrotal em cães positivos para LVC, assim como, Contreiras et al. (2019) que verificaram lesões na glande do pênis de cães com diagnóstico positivo.

A presença de hiperplasia prostática observada, pode ocorrer em resposta a mudanças na produção de androgênios ou devido à presença de inflamação que afeta diretamente a epitélio glandular (FOSTER, 2012). Destaca-se também, que é considerada uma alteração comum em cães com mais de três anos devido a alterações na relação andrógeno e estrogênio na secreção da testículos (SMITH, 2008).

Com relação aos achados no testículo e epidídimos, estes são consideradas manifestações comuns em cães e podem estar relacionadas a uma variedade de causas e fatores (JONES et al., 2000; THOMÉ et al., 2007). A orquite geralmente que pode vir acompanhada da epididimite (FOSTER, 2012; ZACHARY, 2017), que podem ser resultantes de traumas,

agentes infecciosos, granulomas espermáticos (FELDMAN e NELSON, 1987; NASCIMENTO e SANTOS, 2011), onde epidídimos ou o testículo acometido fica aumentado e firme, assim como o que foi observado neste estudo (NELSON e COUTO, 2006), confirmando, que esta sintomatologia pode estar relacionada com a LVC, assim como foi demonstrado por Manna et al. (2012), que descreveram está associação.

5.4 Análise microscópicas e imuno-histoquímicas

As frequências e escore das alterações inflamatórias encontradas estão resumidas na Tabela 6. Somente 8 animais dos 16 coletados, foram analisados até o presente momento nas técnicas de histopatologia e imuno-histoquímica, considerando que estes foram subdivididos em sintomáticos ($n=4$) e assintomáticos ($n=4$). Destacando, que não foram encontradas formas amastigotas do parasita nos tecidos avaliados por meio da técnica histológica.

Tabela 6. Frequência e escore das lesões inflamatórias encontradas no trato reprodutor de cães naturalmente infectados por LVC.

Tecido	Frequência	Escore*
Próstata	5/8 (62,5%)	3
Prepúcio	7/8 (87,5%)	3
Glande	4/8 (50%)	2
Epidídimos	7/8 (87,5%)	1
Testículos	1/8 (12,5%)	1

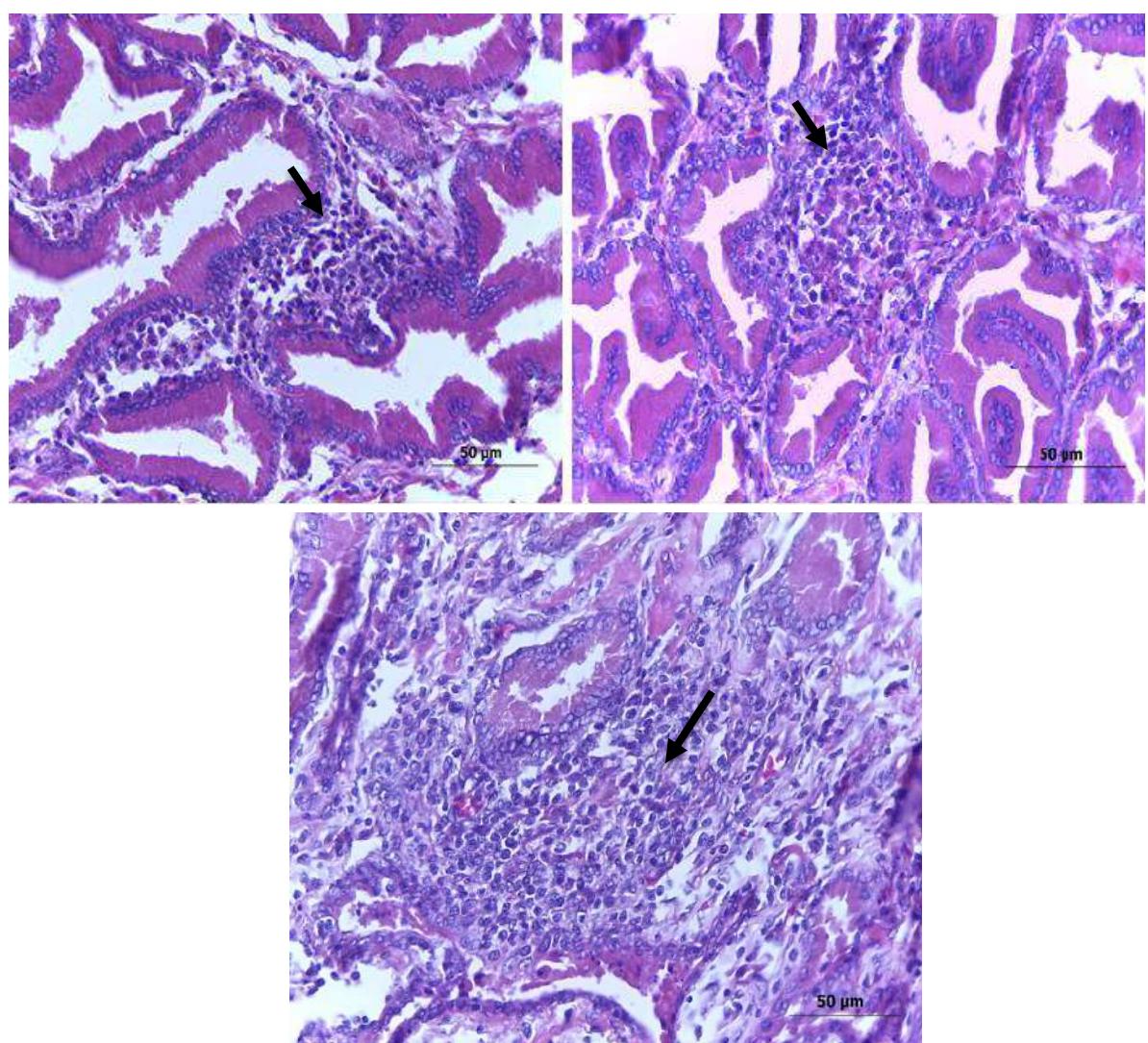
* Escore da intensidade das lesões inflamatórias do trato reprodutor de cães com LVC (0: ausência de lesões; 1: discreta; 2: moderada; 3: intensa).

Na próstata, observou-se infiltrado inflamatório multifocal, variando de moderado a intenso em 62,5% (5/8) dos animais, com predomínio de macrófagos, notando-se também a presença alguns linfócitos e plasmócitos (Figura 5). Além disso, alguns animais também apresentaram hiperplasia prostática. Em contrapartida, Diniz et al. (2005) e Boechat (2015) demonstraram uma frequência baixa de lesões inflamatórias na próstata de animais positivos, onde concluíram que não há associação entre LVC e prostatite.

Porém os resultados aqui apresentados corroboram com De Barros et al. (2019), que notaram que o achado mais predominantemente encontrado nas avaliações histopatológicas da próstata é o infiltrado inflamatório linfomononuclear. Toledo et al. (2010), ainda enfatiza que as inflamações, particularmente do tipo mononuclear (linfócitos, macrófagos plasmáticos ocasionais), na região intersticial dos segmentos túbulo-alveolares influencia na ocorrência de atrofia do epitélio glandular, concordando com os dados obtidos por Mir et al. (2012), que descreveram a prostatite como um achado frequente em cães infectados.

Ambos os grupos apresentaram resultados semelhantes, assim como De Barros et al. (2019), que viram que a frequência de infiltrado inflamatório e deposição de fibras tecido conjuntivo indicativo de processo inflamatório, não foram diferentes entre os grupos para o tecido prostático, porém Barros et al. (2013) observou maior frequência de alterações inflamatórias na próstata em cães sintomáticos.

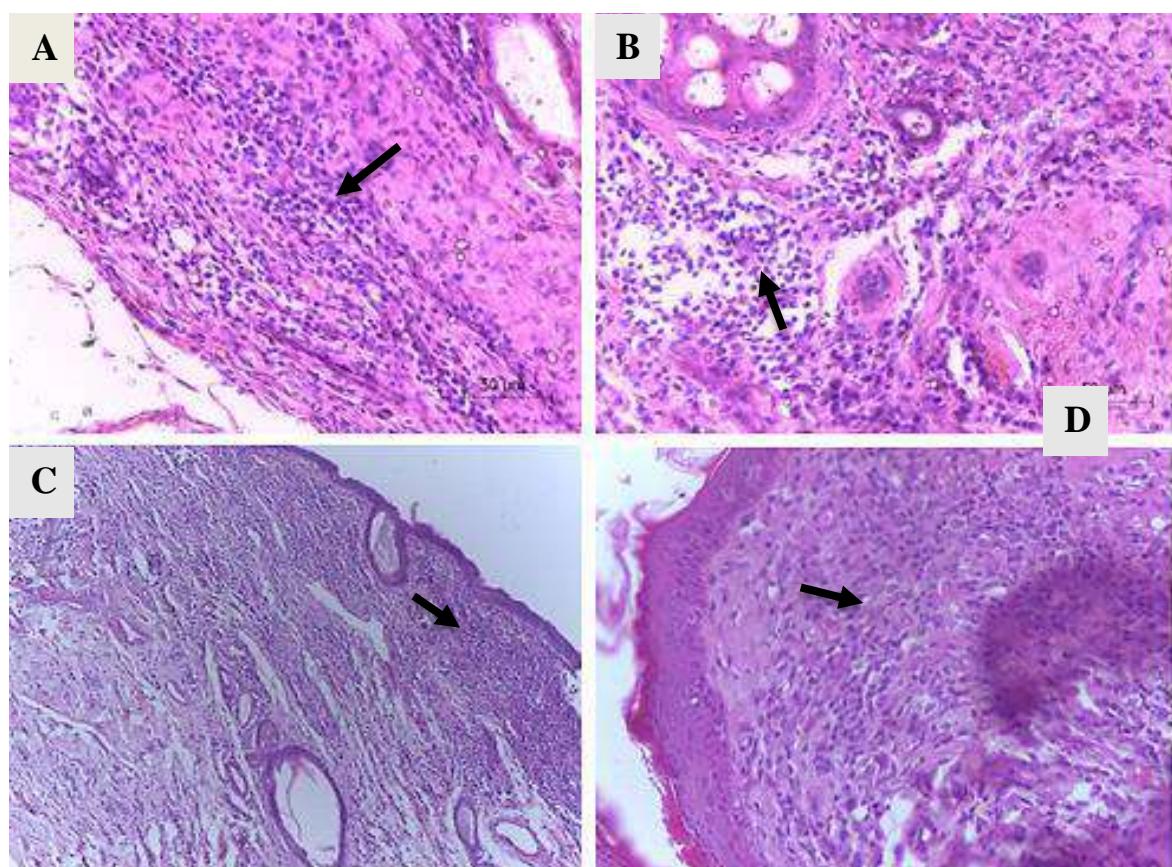
Figura 5. Microscopia de luz, próstata, cão com LVC



Prostatite linfohistiocitária multifocal intensa. Notar presença de células inflamatórias na região intersticial tubuloalveolar (figura 6A) (seta). (40X, HE).

As alterações microscópicas observadas no prepúcio de 87,5% (7/8) dos animais caracterizaram-se por infiltrado inflamatório histiocítico multifocal intenso (Figura 6). Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Diniz et al. (2005) e por Oliveira et al. (2016b), que em um estudo acerca de lesões genitais associadas à LVC demonstram que no prepúcio de cães naturalmente infectados é possível encontrar dermatite granulomatosa com um grande número de histiócitos distribuídos de forma difusa, além de reação inflamatória histioplasmocitária associada com erosões e ulcerações.

Figura 6. Microscopia de luz, prepúcio, cão com LVC.



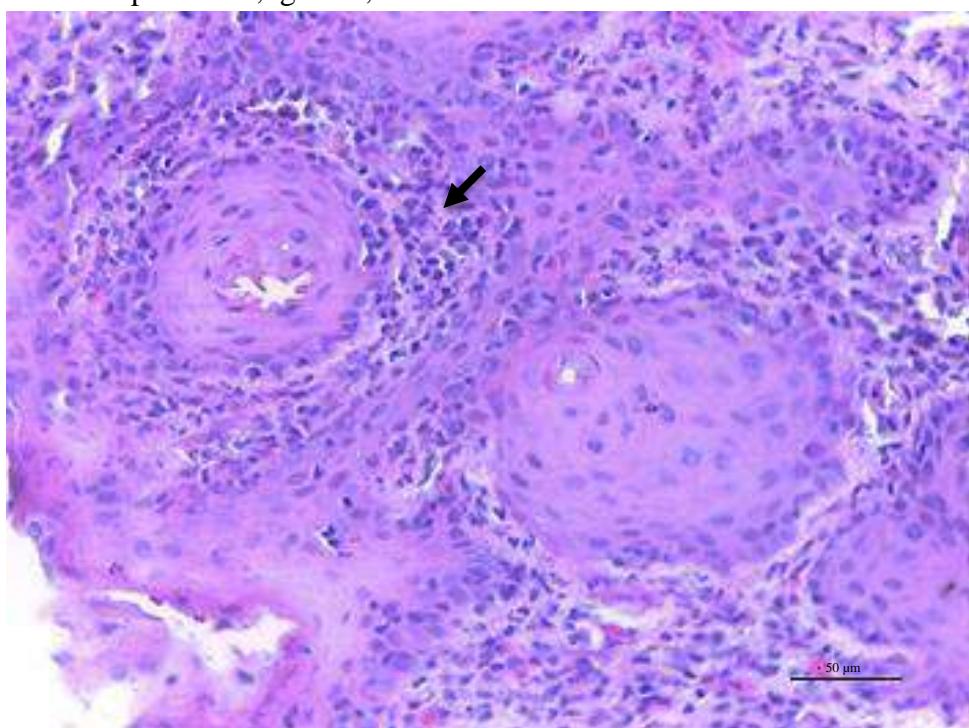
Postite histiocitária multifocal severa, caracterizada pela intensa infiltração de histiócitos na derme profunda e perifolicular (setas). (2 A, 2B, 2D, 40x HE); (2C, 10x, HE).

Na glande, as lesões inflamatórias foram predominantemente histiocíticas em 50% (4/8) dos animais (Figura 7), porém também foi possível observar a presença de linfócitos e plasmócitos. Diniz et al. (2005) também descrevem as alterações histopatológicas na glande de

animais sintomáticos com predomínio de macrófagos, tendo características de reação granulomatosa. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira et al. (2013), que também verificou a presença desse tipo infiltrado inflamatório na glande de cães naturalmente infectados.

Essa elevada frequência de alterações inflamatórias associada à presença de amastigotas na glande e prepúcio pode contribuir para o aparecimento destas no sêmen, favorecendo assim a transmissão venérea da doença (DINIZ et al., 2005; SILVA et al., 2009; NAUCKE e LORENTZ, 2012).

Figura 7 Microscopia de luz, glande, cão com LVC.



Balanite histiocitária multifocal intensa. Notar infiltrado inflamatório com predomínio de histiócitos (seta). (40x, HE)

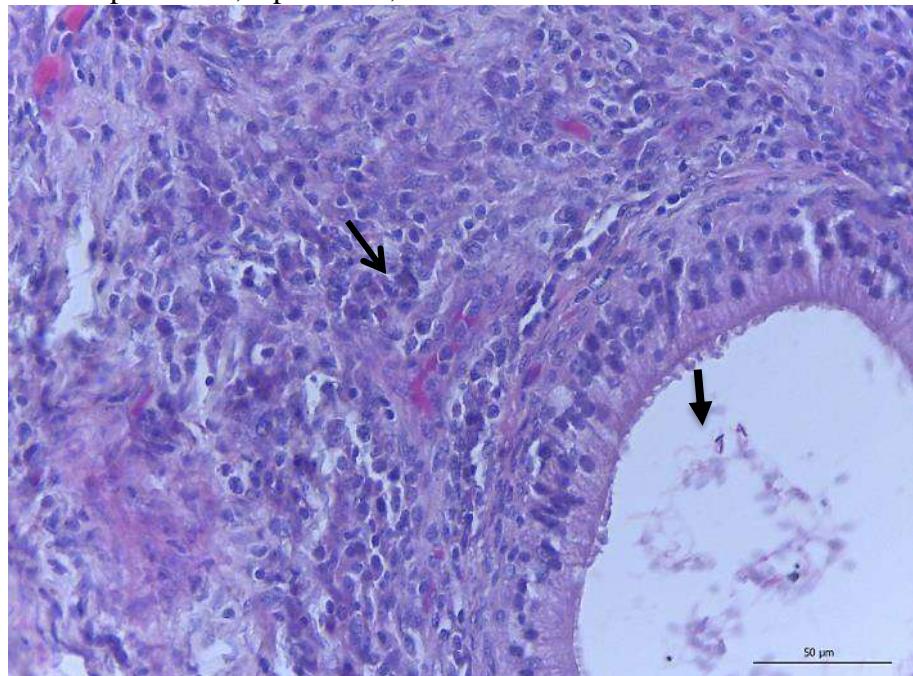
Em relação às alterações inflamatórias no epidídimos, 87,5% (7/8) dos animais apresentaram infiltrado inflamatório multifocal leve, onde observou-se principalmente macrófagos e também a presença de linfócitos (Figura 8). Estudos semelhantes demonstram a ocorrência de infiltrado inflamatório linfohistiocitário no epidídimos de cães naturalmente infectados (DINIZ et al., 2005; DE BARROS et al., 2019). Não houveram diferenças entre os grupos estudados, concordando com os resultados obtidos por De Barros et al. (2019).

A frequência de lesões inflamatórias observadas no epidídimo, pode ocorrer devido ao aumento da infecção secundária pelo canal deferente através dos vasos linfáticos do cordão

espermático, por propagação hematogênica ou em combinação com um infecção primária do trato urinário (FOSTER et al. 2012).

Existem outros achados no epidídimo de cães com LVC, porém aqui não foram descritos, como: a diminuição da massa espermática, assim como, a azoospermia, sendo este um estágio mais avançado de alteração epididimária (DIAZ et al., 1982; OLIVEIRA et al., 2013).

Figura 8. Microscopia de luz, epidídimo, cão com LVC.



Epididimite histiocítica multifocal moderada. Notar presença de histiócitos no interstício do parênquima epididimário (seta). Espерматозоиды no interior do ducto epididimário (cabeça de seta). (40x, HE).

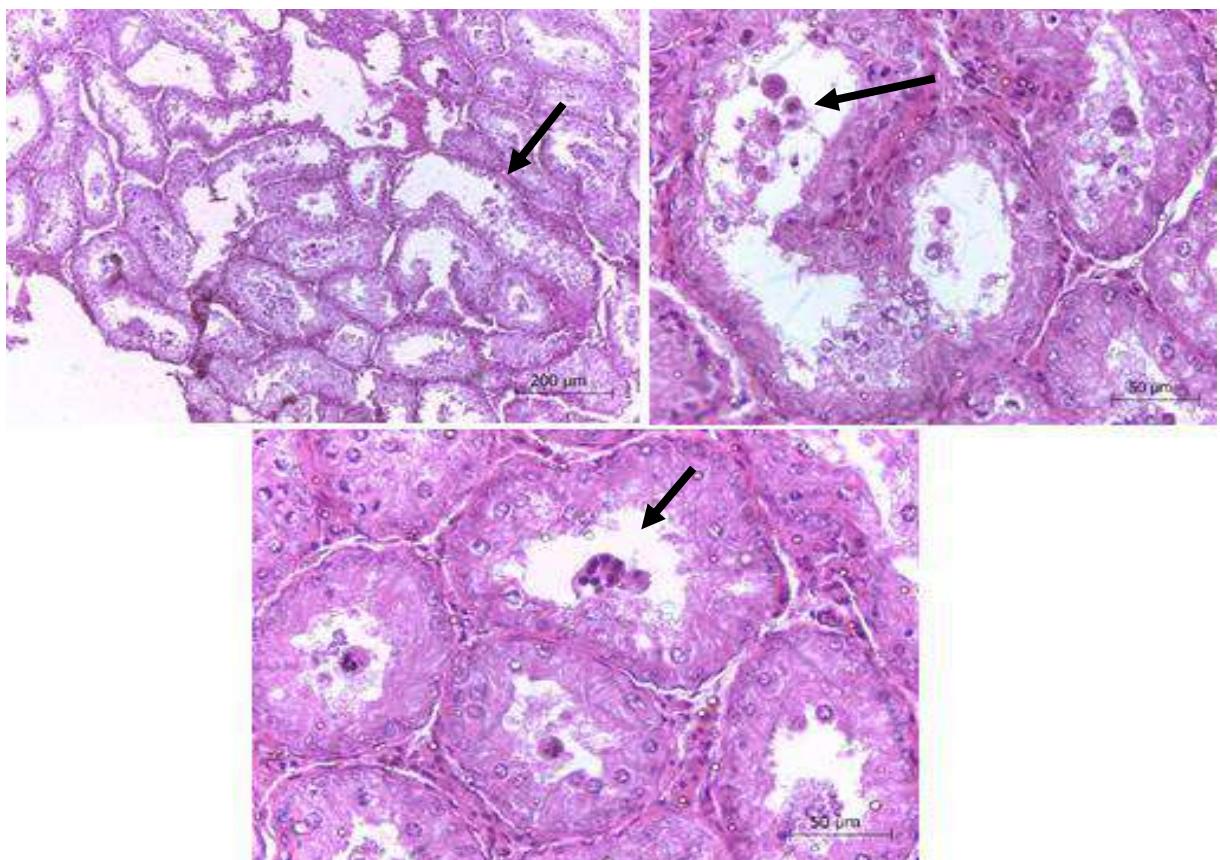
Um cão, que corresponde a 12,5% (1/8) dos animais apresentou lesão inflamatória nos testículos, que se caracterizou como infiltrado inflamatório intratubular discreto com predomínio de macrófagos, não sendo observados linfócitos ou plasmócitos, ressaltando que o animal que apresentou a alteração era sintomático. No entanto, 100% (8/8) dos animais apresentaram processo degenerativo nos túbulos seminíferos (Figura 9) destacando que não houve diferença entre os grupos estudados. Esses resultados são semelhantes aos de Oliveira (2013), que, em um estudo sobre lesões inflamatórias nos órgãos genitais de cães naturalmente infectados, observou que a maioria dos animais positivos apresentou degeneração tubular. De acordo com Nascimento e Santos (2003), esse processo degenerativo do epitélio germinativo pode ser desencadeado como consequência de reação inflamatória e aumento de temperatura testicular.

Segundo Amara et al. (2009), as lesões encontradas nos testículos se caracterizam por lesões inflamatórias intersticiais subagudas e lesões degenerativas atróficas do epitélio seminífero. Já Evangelista et al. (2019), observaram resultados diferentes com a presença de lesões, como a oligospermia grave, degeneração testicular difusa e focal, atrofia epitelial seminífera e reações inflamatórias discretas, com presença de histiocitos

Estudos realizados por Diniz et.al. (2005) demonstram que a leishmaniose visceral está relacionada à elevada frequência de alterações inflamatórias nos órgãos genitais de cães e que o número de formas amastigotas presentes nos testículos pode atuar como um fator causador da resposta inflamatória, sendo a degeneração testicular uma consequência dessa reação e não de efeitos diretos do parasita sobre o epitélio seminífero.

No presente trabalho não foram detectadas formas amastigotas de *L. infantum* no epitélio germinativo e lúmen dos túbulos seminíferos. Gonzalez et al. (1983) por sua vez, em seu trabalho com hamsters infectados experimentalmente com *L. donovani*, também não observou parasitas em cortes histológicos nos túbulos seminíferos, o que pode ser explicado pela presença da barreira hematotesticular, onde as células de Sertoli separam as células germinativas do sistema imunológico (DE CESARIS et al., 1992), sendo o testículo portanto considerado imunologicamente privilegiado (BENITES et. al, 2011).]

Figura 9. Microscopia de luz, testículo, cão com LVC.



Degeneração testicular, caracterizada pela moderada vacuolização do epitélio seminífero (cabeça de seta) e desprendimento de células no lúmen dos túbulos seminíferos. Notar presença de células multinucleadas no lúmen dos túbulos seminíferos (setas pretas). (4A, 10x, HE), (4B e 4C, 40x, HE).

Com relação a técnica de imuno-histoquímica, somente um animal não obteve tecido marcado por抗ígenos específicos de *Leishmania*, enfatizando que os tecidos selecionados previamente para a realização da IHQ, foram aqueles que apresentaram alterações na análise histopatológica, que, embora moderadas, não permitiram a detecção de formas amastigotas no tecido.

As formas amastigotas localizaram-se no interior de macrófagos (Figura 10). Não foram observadas amastigotas imunomarcadas nos tubulos seminíferos, ductos epididimários e glânde. Houve marcação positiva no prepúcio de 5 animais (62,5%), o que pode ser correlacionado com a intensidade das alterações inflamatórias observadas na histopatologia. No entanto, 3/8 animais (37,5%) apresentaram um discreto número de amastigotas imunomarcadas na próstata. Não houveram diferenças significativas entre os grupos estudados, diferente do De Barros et al.,(2019), que observou maior frequência de amastigotas através de marcação por IHQ nos tecidos de animais sintomáticos.

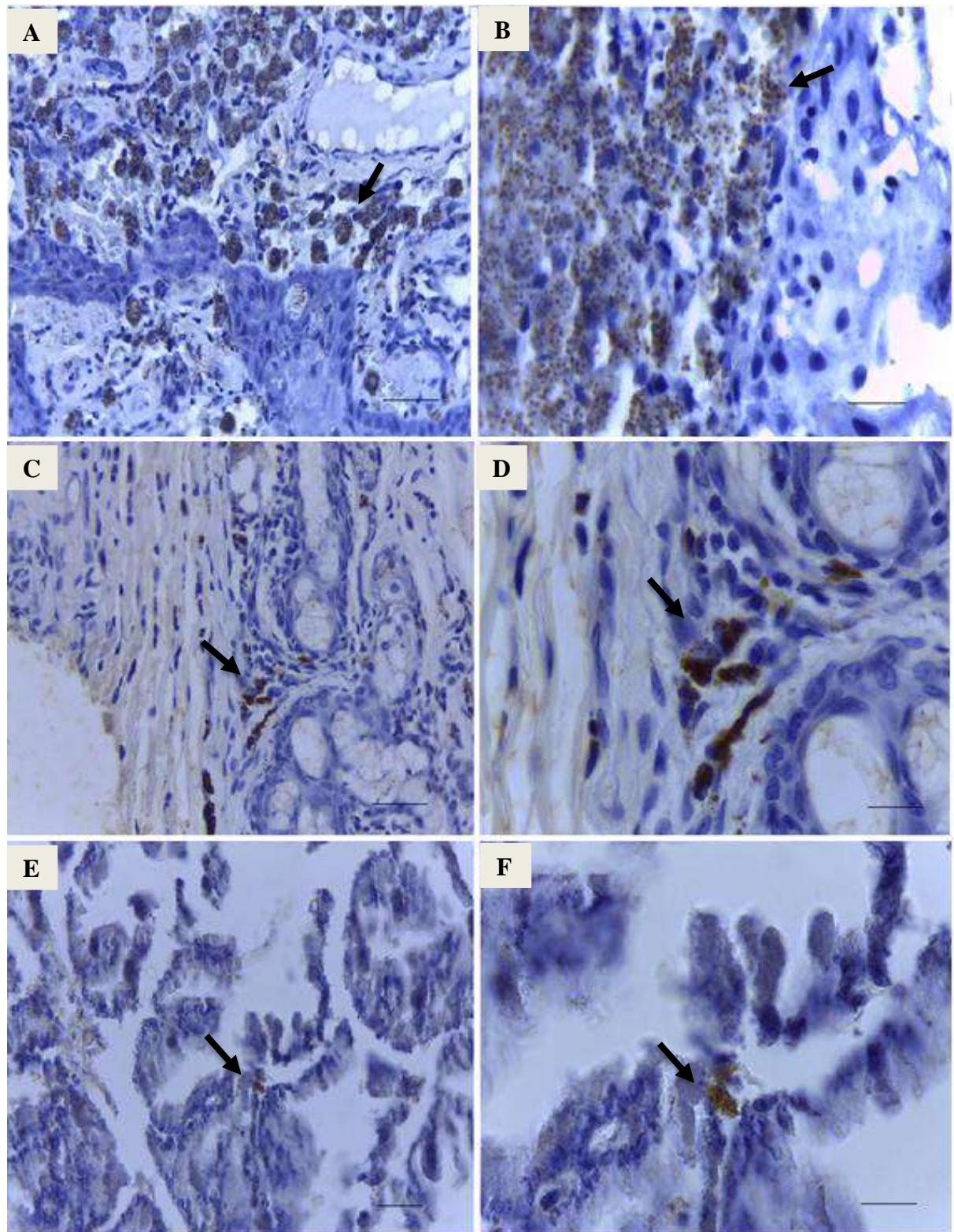
Em contrapartida, no mesmo estudo foi observado que o prepúcio possui altos níveis de amastigotas nos animais analisados, concordando com esta pesquisa. Resultados concordantes também obtidos por Diniz et al (2005), que observaram número maior de amastigotas no prepúcio de cães . A intensidade de imunomarcação de amastigotas descrita no prepúcio pode estar relacionada ao tecido cutâneo que é frequentemente parasitado nas infecções por LVC (VERÇOSA et al., 2012). Segundo Boechat (2015) isso também está relacionado à exposição dessa região às picadas de flebotomíneos infectados.

A presença de formas amastigotas na próstata de cães naturalmente infectados com LVC, também foram descritas por Boechat (2015), por Junior et al. (2017), evidenciando que a quantidade de parasitos marcados nesse tecido é inferior quando comparado aos demais

Até o presente momento, não foram observadas imunomarcação de amastigotas em outros tecidos porém, existe relatos no epidídimo, testículo, glânde e saco escrotal (DINIZ et al., 2005; BENITES et al., 2011; CARVALHO-JUNIOR et al., 2017; LOPES et al., 2017).

Foi possível observar formas amastigotas de *Leishmania* apenas através da técnica de imuno-histoquímica, mostrando-se mais específica e sensível em relação à HE.

Figura 10. Imunomarcação de formas amastigotas presentes nos tecidos do trato reprodutivo dos cães com LVC.



Amastigotas marcadas por técnica de IHQ (setas). Controle positivo (7 A e 7 B). Prepúcio de cão (7 C e 7 D). Notar macrófago com formas amastigotas (Figura 7D) (seta). Próstata de cão (7 E e 7 F). Imunomarcação de amastigotas de *Leishmania sp.* no interior de macrófago (Figura 7 E) (seta). (40 X e 100 X, HE).

5.5 Quantificação da carga parasitária

Três animais obtiveram resultado negativo quanto a presença de *Leishmania infantum* nos tecidos do trato reprodutor (Tabela 7), sendo que um destes obteve diagnóstico negativo em três tecidos. Boechat et al. (2016) revelou que a próstata e o testículo tiveram menor índice de positividade quando comparado aos outros tecidos. Outras pesquisas observaram a presença do DNA de *Leishmania infantum* em todos os segmentos analisados (DINIZ et al., 2005; OLIVERA et al, 2016a; CARVALHO-JUNIOR et al. 2017), corroborando com o observado neste estudo.

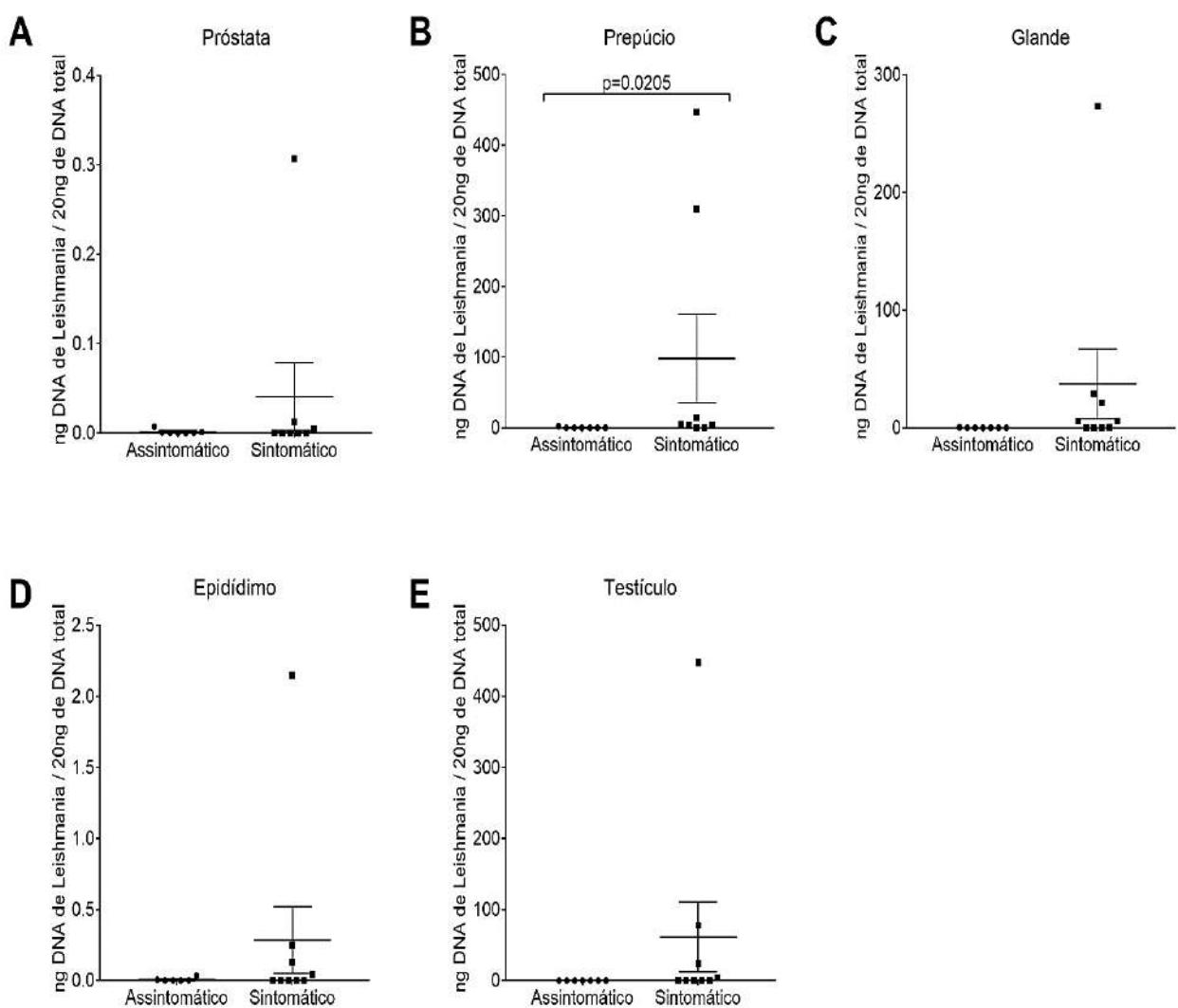
Tabela 7. Resultados obtidos através da detecção molecular de *Leishmania infantum* nos tecidos do trato reprodutor dos cães com LVC.

	Amostras															
	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A 8	A 9	A 10	A 11	A 12	A 13	A 14	A 15	A 16
Próstata	+*	**_	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prepúcio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glande	+	+	+	+	+	+	_	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Testículo	+	_	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Epididímo	+	_	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*+ : Animais com diagnóstico positivo para *Leishmania infantum*, **_ : Animais com diagnóstico negativo para *Leishmania infantum*.

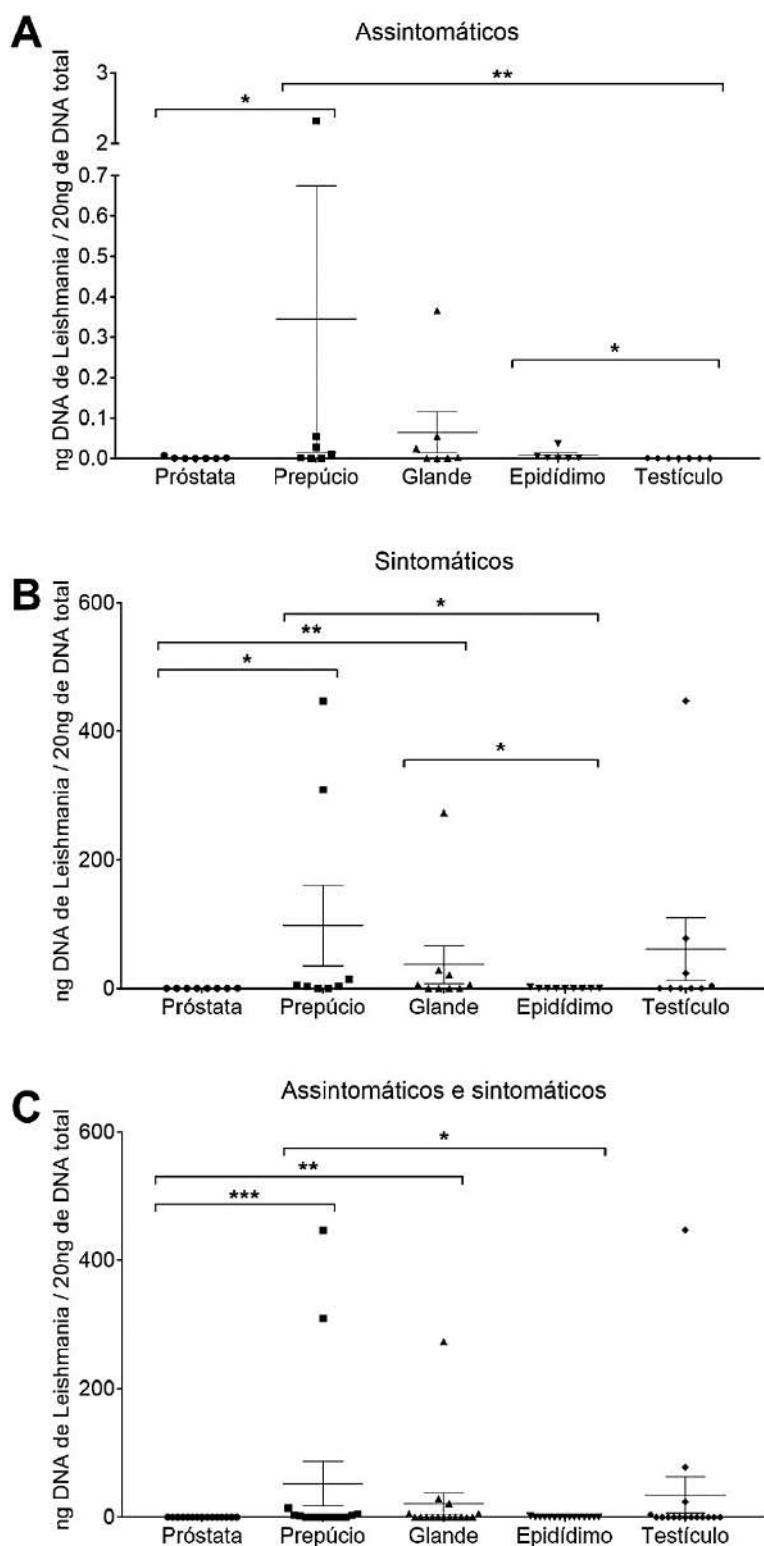
O presente estudo revelou elevada frequência de *Leishmania infantum* nos segmentos analisados, destacando-se o prepúcio, a glande e o epididímo, os que obtiveram os maiores níveis (Figura 12).

Figura 11. Determinação da carga parasitária de *Leishmania infantum* nos tecidos do trato reprodutivo de cães com LVC.



11 A,C,D,E: Presença do DNA de *Leishmania infantum* nos grupos com e sem sintomatologia na prostáta, glande, epididímo e testículo respectivamente; 11B: Presença do DNA de *Leishmania infantum* no prepúcio, enfatizando o valor de $p = 0,205$ entre os grupos com e sem sintomatologia

Figura 12. Quantificação de DNA de *Leishmania infantum* nos grupos de animais sintomáticos e assintomáticos do trato reprodutivo de cães com LVC.



12A: Quantificação de DNA de *Leishmania infantum* entre os tecidos de animais com sinais clínicos, apresentando diferenças significativas entre próstata/prepúcio, prepúcio/testículo e epidídimos/testículo; 12B: Gráfico representando o grupo assintomático destacando diferença entre próstata/glande, próstata/prepúcio/epidídimos, teste.

glande/epidídimos; 12C Valores da carga parasitária presente em ambos os grupos evidênciando as divergências entre prostática /prepúcio, próstata/glande, prepúcio/epidídimos, onde * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

A prostática foi o segmento que apresentou menor quantidade de amastigotas quando comparado aos outros tecidos, porém é possível observar uma amostra que se destaca em relação as outras (Figura 11A), a presença deste destaque pode estar relacionado com os achados que possam vir a ser encontrados nas outras metodologias deste estudo. O tecido não apresentou contraste entre seus grupamentos, esse resultado também foi observado por Carvalho-Junior et al. (2017) utilizando o quantificação por meio da imuno-histoquímica.

Quanto a glande, esta não mostrou desigualdade estatística entre os grupos, porém observou-se uma certa tendência de acordo com o valor de $p= 0,0549$. Destaca-se que a comparação realizada entre a parasitemia existente entre os segmentos nos animais de ambos os grupos, observou-se diferença entre a glande/prostática ($p=0,0020$) (Figura 12C), assim como foi apresentada divergência entre glande/epidídimos ($p=0,0244$) nos sintomáticos (Figura 12B), a alta carga parasitária na glande pode estar relacionada à infecção hematogênica devido ao grande influxo de sangue que preenche o espaço cavernoso, mantendo o pênis alongado e dilatado durante a cópula (BRINSKO, 2004).

O prepúcio foi o único que obteve diferença significativa entre os grupos ($p=0,0205$) (Figura 11B), visto que os animais sintomáticos apresentaram níveis maiores quando comparados aos sem sinais clínicos, assim como o que foi descrito por Diniz et al (2005). Além disso, obteve diferença quanto ao valor de p quando confrontado com a prostática em ambos os grupos ($p=0,0006$), assim como com o epidídimos ($p=0,0209$). Também foi observada diferença no grupo com ausência de sintomatologia com o testículo ($p = 0,0070$). Essa ocorrência elevada de parasitos no prepúcio pode ser devido ao fato de que este órgão é constituído por pele, possuindo maior propensão a exposição ao parasita devido a ação flebotomínica (MADEIRA et al. 2009; VERÇOSA et al. 2012), considerando o epidídimo, o testículo e a prostática são tecidos do trato genital interno, estando, desse modo, protegidos da ação do vetor.

Foi visto que a glande e o prepúcio são os tecidos mais propensos a apresentarem elevado parasitismo, o que também foi relatado por Boechat et al (2016), destacando que a presença de amastigotas nesses fragmentos, bem como como a presença de macrófagos contendo estas formas parasitárias migrando através do epitélio uretral, pode contribuir para a presença *Leishmania* no sêmen (MANNA et al, 2012), enfatizando a possibilidade de transmissão venérea (NAUCKE e LOURENTZ, 2012).

Assim como na maioria dos outros tecidos, o epididímo não obteve diferença relevante entre os grupos, porém é possível verificar amostras de animais sintomáticos com altos índices de DNA de *L. infantum* (Figura 11E), assim como foi discorrido por Carvalho-Junior et al (2017). Porém este quando equiparado com o testículo no grupo com ausência de sintomatologia, obteve diferença significativa $p=0,0350$ (Figura 12A). De acordo com Diniz et al. (2005), a presença de amastigotas no epididímo pode ser resultado de uma inflamação preexistente na qual os monócitos recrutaram macrófagos contendo Leishmania, essa intensa transmigração para a lúmen do epididímo poderia explicar o grande número de amastigotas nesse ducto (BENITES et al., 2011). Esta observação é relevante para a hipótese de transmissão venérea de LVC, uma vez que sua presença no epididímo poderiam atingir a fêmea através do sêmen. É importante enfatizar que amastigotas podem permanecer viáveis no sêmen, pois resistem a ambientes com pH baixo e neutro (ANTOINE et al. 1990, CARDOSO et al. 2010).

A baixa presença de amastigotas no testículo quando verificado com os demais, pode ser explicada pela barreira hematotesticular (DE CESARIS et al., 1992), essa pequena frequência também foi relatada por Carvalho-Junior et al. (2017). Não houve diferença significativa entre grupos, assim como foi encontrado por Carvalho-Junior et al, (2017), porém foi possível observar que os cães com sintomatologia tiveram amostras pontuais com maior quantidade de parasitos (Figura 12D), como foi visto por Diniz et al. (2005); Manna et al. (2012), Carvalho-junior et al. (2017).

No geral os animais que estão inseridos no grupo dos sintomáticos apresentaram carga parasitária maior do que os assintomáticos, que se explica devido a progressão clínica de LVC que em cães assintomáticos tendem a apresentarem graus de parasitismo menor do que naqueles expressam sinais clínicos (CARVALHO-JUNIOR et al., 2017).

Verificou-se a escassez de trabalhos utilizando esta metodologia em fragmentos do trato reprodutor de cães machos com LVC, enfatizando a importância desta pesquisa.

6 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

- Os testes sorológicos e moleculares obtiveram a maioria de seus resultados semelhantes.
- Observou-se lesões macroscópicas em todos os segmentos analisados do trato reprodutor dos cães com LVC.
- As alterações histopatológicas foram identificadas principalmente no prepúcio, epidídimos, próstata e glande, caracterizando-se por infiltrado inflamatório, com predomínio de macrófagos, assim como processos degenerativos nos túbulos seminíferos, além da detecção de formas amastigotas de *Leishmania* sp. no prepúcio e próstata através da imuno-histoquímica, demonstrando o acometimento do trato reprodutor.
- A maioria das amostras do trato reprodutor foram positivas na qPCR. Com relação a carga parasitária, obteve-se algumas diferenças significativas entre os tecidos/grupos, tendo o prepúcio como o único tecido com divergência relevante entre seus grupos.

REFERÊNCIAS

- ABREU-SILVA, A.L.; LIMA, T.B.; MACEDO, A.; MORAES-JÚNIOR, F.J.; DIAS, E.L.; BATISTA, Z.S., CALABRESE, K.S., MORAES, J.L., REBÉLO, J.M.M., GUERRA, R.M.S.N. Soroprevalência, aspectos clínicos e bioquímicos da infecção por Leishmania em cães naturalmente infectados e fauna de flebotomíneos em uma área endêmica na ilha de São Luis, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, supl. 1, p.197-203, 2008.
- ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 57, p. 1-87, 2004.
- ALVES, C. F., DE AMORIM, I. F., MOURA, E. P., RIBEIRO, R.R., et al. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol**, v.128, p. 349–358, 2009.
- AMARA, A.; MRAD, I.; MELKI, M.K.; MRAD, M.B; REJEB, A. Estude histologique dês lésions testiculaires chez leschiens leishmaniens. **Rev Med Vet**. v. 160 p. 54–60, 2009.
- ANTOINE, J. C., PRINA, E., JOUANNE, C., BONGRAND, P. Parasitophorous vacuoles of Leishmania amazonensis-infected macrophages maintain an acidic pH. **Infect Immunology**, v. 58, n. 3, p. 779–787, 1990.
- ASSIS, J. D., QUEIROZ, N. M. G. P. D., SILVEIRA, R. D. C. V. D., NUNES, C. M., OLIVEIRA, T. M. F. D. S., NORONHA JUNIOR, A. C. F. D., ... & BUZETTI, W. A. S. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, p. 17-25, 2010.
- BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmaniases. **Infectious diseases of the dog and cat**, v. 3, p. 685-695, 2006.
- BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmaniases. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. cap.73, p.735-748, 2012.
- BARATA, R. A., SILVA, J. C. F. D., COSTA, R. T. D., FORTES-DIAS, C. L., SILVA, J. C. D., PAULA, E. V. D., ... & DIAS, E. S. BARATA, RICARDO ANDRADE et al. Phlebotomine sand flies 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.
- BARBOSA, D. S., ROCHA, A. L., SANTANA, A. A., SOUZA, C. D. S. F. D., DIAS, R. A., COSTA JUNIOR, L. M., & SILVA, A. L. A. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à Leishmaniose visceral canina em área endêmica no Município de São Luis, Maranhão, Brasil. **Ci. Anim. Bras.**, v. 11, n.3, p. 653-659, jul./set. 2010.
- BARBOSA, D. S. **Distribuição espacial e definição de áreas prioritárias para Vigilância da Leishmaniose Visceral no município de São Luís, Maranhão, Brasil**. 103 f.(Dissertação de mestrado em Epidemiologia em Saúde Pública). Rio de Janeiro, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, 2011.

BENITES, A. P., FERNANDES, C. E., BRUM, K. B., & ABDO, M. A. G. S. 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.

BOECHAT, V. C., JUNIOR, A. A. V. M., DE FÁTIMA MADEIRA, M., FERREIRA, L. C., FIGUEIREDO, F. B., DE CARVALHO RODRIGUES, F. D. C., ... & MENEZES, R. C. Occurrence of Leishmania infantum and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. **Parasitology research**, v. 115, n. 6, p. 2371-2379, 2016.

BOSCH, R. J.; RODRIGO, A. B.; SÁNCHEZ, P.; GÁLVEZ, M.V.; HERRERA, E. Presence of Leishmania organisms in specific and non-specific skin lesions in HIV- Infected individuals with visceral leishmaniasis. **Int. J. Dermatol.**, v.41, p.670–675, 2002.

BOSSLER, R. S. **Leishmaniose Visceral Canina** [monografia]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária; 2012.

BOURDOISEAU, G. et al. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally Leishmania infantum-infected treated and untreated dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 59, n. 1-2, p. 21-30, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de bolso: Doenças infecciosas e parasitárias**. Brasília. 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Nota Técnica Conjunta nº 1/2011 CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS**. Brasília: Ministério da Saúde do Brasil, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Algoritmo para confirmação de primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral**. Brasília, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose Visceral: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção** [online]. Brasília: Ministério da Saúde; 2018. Disponível em: <http://portalsms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-viscera>, aceeso em: 10. Out 2019.

BRINSKO, S. P. **Fisiologia reprodutiva do macho**. In: Cunningham JG (ed) Tratado de Fisiologia Veterinária, 3rd edn. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 432–434, 2004.

CARDOSO, J. F. S., PAULA, N. R. O., UCHOA, D. C., SILVA, L. D. M. Diferentes concentrações de gema de ovo na qualidade do sêmen canino diluído em ACP®-106 e resfriado a 4 °C. **Communicata Scientiae** v. 2, p. 146–152, 2010.

CARVALHO - JUNIOR, C. C., NETO, R. T., LOPES, V. V., BELO, V. S., ALVES, N. R., DE PAULA, T. B., ... & SILVA, E. S. Parasitism and inflammation in ear skin and in genital tissues of symptomatic and asymptomatic male dogs with visceral leishmaniasis. **Parasitology research**, v. 116, n. 3, p. 987-995, 2017.

CARVALHO NETA, A.V., ROCHA, R.D.R., GONTIJO, C.M.F., REIS, A.B., & MARTINS-FILHO, O.A.. Citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte , v. 58, n. 4, p. 480-488, Aug. 2006 .

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

CATONE, G., MARINO, G., POGLAYEN, G., GRAMICCIA, M., LUDOVISI, A., & ZANGHI, A. Canine transmissible venereal tumor parasitized by *Leishmania infantum*. **Veterinary Research Communications**, v.27, n.7, p.549-553, 2003.

CHIARELLI, I. M., LIMA, W. G., MICHALICK, M. S. M. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of Leishmania infection in dog using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Vet Res**.v. 2, n.17, p.1-7, 2006.

COSTA, L. N. G., BORBA, A. S., CASTAGNA, C. L., CARVALHO FILHO, E. B., MARSON, F. A. L., JUNIOR, F. S..Evaluation of PCR in the diagnosis of canine leishmaniasis in two different epidemiological regions: Campinas (SP) and Teresina (PI), Brazil. **Epidemiology & Infection**, v.143, p.1088–1095. 15, 2015.

CONTRERAS, I. K., MACHADO, M. A., DA ROCHA, C. O. J. M., & DE CARVALHO, F. C. G.Sinais clínicos apresentados por cães positivos para leishmaniose visceral no município de Vassouras, Rio de Janeiro. **PUBVET**, v. 13, p. 152, 2019.

CORRÊA, A.P.F.L.; DOSSI, A.C.S.; VASCONCELOS, R.O.; LIMA, V.M.F. **Avaliação de citocinas imunoregulatórias em cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral**. In: 1º FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal. Anais do Fórum de Leishmaniose Visceral canina, p.64, 2006.

CORRÊA, A.P., DOSSI, A.C., DE OLIVEIRA VASCONCELOS, R., MUNARI, D.P., DE LIMA, V.M. Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Parasitol**.v. 143,p. 267–274, 2007.

COURA-VITAL, W., REIS, A. B., REIS, L. E. S., BRAGA, S. L., ROATT, B. M., DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R. D., ... & CARNEIRO, M. Canine visceral leishmaniasis:

incidence and risk factors for infection in a cohort study in Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 197, n. 3-4, p. 411-417, 2013.

DA COSTA, A. P., COSTA, F. B., SOARES, H. S., RAMIREZ, D. G., DE CARVALHO MESQUITA, E. T. K., GENNARI, S. M., e MARCILIA, A. Trypanosoma cruzi and Leishmania infantum chagasi infection in wild mammals from Maranhão state, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 11, p. 656-666, 2015.

DA SILVA, S. M., RABELO, P. F. B., GONTIJO, N. D., RIBEIRO, R. R., MELO, M. N., RIBEIRO, V. M. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.174, p.150-154,2010.

DANNEMANN, E. T. **Leishmaniose Visceral Canina**, 2016. Disponivel em: <<https://www.efecadepeatos.com.br/?p=19773>> Acesso em: 20 agos. 2019.

DE BARROS, A. L. C., BENITES, A. P., MATEUS, N. L. F., & DOS SANTOS FERNANDES, C. E. Histopathological alterations in the reproductive tract of male dogs with Canine Visceral Leishmaniasis. **Semina: Ciências Agrárias**, v.40, n. 2,p. 665-676, 2019.

DE CARVALHO, F. L. N, RIBOLDI, E. O., BELLO, G. L. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. **Epidemiol Infect**, v.146, p. 571–576, 2018.

DE CASTRO FERREIRA, E., DE LANA, M., CARNEIRO, M., REIS, A. B., PAES, D. V., DA SILVA, E. S., ... & GONTIJO, C. M. F .Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations,**Veterinary Parasitology**, vol. 146, no. 3-4, pp. 235–241, 2007.

DE CESARIS P., FILIPPINI A., CERVELLI C., RICCIOLI A., MUCI S., STARACE G., STEFANINI M. & ZIPARO E. Immunosuppressive molecules produced by Sertoli cells cultured in vitro: Biological effects on lymphocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 186, p. 1639-1646, 1992.

DE FREITAS, E., MELO, M. N., DA COSTA-VAL, A. P., & MICHALICK, M. S. M. Transmission of Leishmania infantum via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary parasitology**, v. 137, n. 1-2, p. 159-167, 2006.

DE LIMA, V. M. F., FATTORI, K. R., DE FÁTIMA MICHELIN, A., DA SILVEIRA NETO, L., & VASCONCELOS, R. D. O. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 173, n. 3-4, p. 330-333, 2010.

DE MELO EVANGELISTA, L. S., DE SOUSA FILHO, M. A. C., E SILVA, M. N. D. N., ALVES, G. B. B., DE ARAÚJO CARVALHO, R. M., DE LIRA, N. S. C., ... & DE SOUZA, J. A. T. Testicular and seminal evaluation of dogs naturally infected with Leishmania sp. **Semina: Ciências Agrárias**, v.40, n.1,p. 217-224, 2019.

DIAZ, M. P.; ARRIBAS, J. L. G.; GARCIA, E. G.; ROSADO, M. C. Lesiones testiculares y epididimarias en la leishmaniasis visceral canina, de presentacion natural. **Higia Pecoris**, v.4, n. 10, p. 05-25, 1982.

DINIZ, S. A., MELO, M. S., BORGES, A. M., BUENO, R., REIS, B. P., TAFURI, W. L., NASCIMENTO, E. F., SANTOS, R. L. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. **Vet. Pathol.**, v. 42, n. 5, p. 650-658, 2005.

DO ROSÁRIO, C. J., DOMINICI, M. F., BRAGA, M. D. S. C., LIMA, C. A., PEREIRA, J. G., & MELO, F. A. Quantificação da IL-10 e do INF- γ em cães com ou sem sinais clínicos de infecção com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Pesqui. vet. bras.**, 129-132, 2018.

DOSSI, A.A.; CORRÊA, A.P.F.; VASCONCELOS, R.O.; LIMA, V.M.F. **Avaliação de TGF, INF, IL-10 em cães machos e fêmeas e sua correlação clínica na leishmaniose visceral**. In: 10 FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal. Anais do Fórum de Leishmaniose Visceral canina, p.63, 2006.

FREEMAN, K. S., MILLER, M. D., BREITSCHWERDT, E. B., & LAPPIN, M. R. "Leishmaniasis in a dog native to Colorado," **Journal of the American Veterinary Medical Association**, vol. 237, no. 11, pp. 1288–1291, 2010.

FEITOSA, M. M., IKEDA, F. A., LUVIZOTTO, M. C. R. & PERRI, S. H. V. (2000). Clinical aspects of dogs with visceral leishmaniasis from Araçatuba-São Paulo State (Brazil). **Clínica Veterinária**, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1987. 785 p.

FELIPE, I. M. A., AQUINO, D. M. C. D., KUPPINGER, O., SANTOS, M. D. C., RANGEL, M. E. S., BARBOSA, D. S., ... & CALDAS, A. D. J. M. Leishmania infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, p. 207-211, 2011.

FERNANDES, M. A., LEONEL, J. A. F., ISAAC, J. A., BENASSI, J. C., SILVA, D. T., SPADA, J. C. P., ... & OLIVEIRA, T. M. F. D. S. Molecular detection of *Leishmania infantum* DNA according to clinical stages of leishmaniasis in dog. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 2, p. 194-202, 2019.

FOSTER, R. A. Common lesions in the male reproductive tract of cats and dogs. Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice, **Maryland Heights**, v. 42, n. 3, p. 527-545, 2012,

FURTADO, A. S., NUNES, F. B. B. D. F., SANTOS, A. M. D., & CALDAS, A. D. J. M. Space-time analysis of visceral leishmaniasis in the State of Maranhão, Brazil. **Ciencia & saude coletiva**, v. 20, n. 12, p. 3935-3942, 2015.

GIBSON-CORLEY, K. N., J. M. HOSTETTER, S. J. HOSTETTER, K. MULLIN, A. E. RAMER-TAIT, P. M. BOGGIATTO, AND C. A. PETERSEN. Disseminated Leishmania infantum infection in two sibling foxhounds due to possible vertical transmission. **Can. Vet. J.** V. 49, p.1005–1008, 2008.

GIUNCHETTI, R. C., MAYRINK, W., CARNEIRO, C. M., CORRÊA-OLIVEIRA, R., MARTINS-FILHO, O. A., MARQUES, M. J., ... & REIS, A. B. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Research in veterinary science**, v. 84, n. 2, p. 269-277, 2008.

GUIMARÃES, V.C., PRUZINOVA, K., SADLOVA, J., VOLFOVA, V., MYSKOVA, J., FILHO, S.P., VOLF, P. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. **Parasit Vectors**. v. 9, p. 159, 2016.

GONZALEZ, J. L., GALLEGOS, E., CASTAÑO, M., & RUEDA, A. Testicular amyloidosis in hamsters experimentally infected with *Leishmania donovani*. **British Journal of Experimental Pathology**, v.64, p.518-523, 1983.

GORIELY, S., CAVOY, R. & GOLDMAN, M. Interleukin-12 family members and type interferons in Th17-mediated inflammatory disorders. **Allergy** ,v.64,p.702-709,2009.

GUARGA, J. L., LUCIENTES, J., PERIBÁÑEZ, M. A., MOLINA, R., GRACIA, M. J., & CASTILLO, J. A.. Experimental infection of Phlebotomusperniciosus and determination of the natural infection rates of Leishmaniainfantum in dogs. **Acta tropica**, v. 77, n. 2, p. 203-207, 2000.

HOMAN, W.L., VERCAMMEN, M., DE BRAEKELEER, J., VERSCHUERER, H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in Toxoplasma gondii, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **Int. J. Parasitol.**v. 30,p. 69–75, 2000.

HOSSAIN, F., GHOSH, P., KHAN, M. A. A., DUTHIE, M. S., VALLUR, A. C., PICONE, A., ... & MONDAL, D. Real-time PCR in detection and quantitation of *Leishmania donovani* for the diagnosis of Visceral Leishmaniasis patients and the monitoring of their response to treatment. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0185606, 2017.

JÚNIOR, N. F. L., GUEDES, P. E. B., SANTANA, L. N., DOS ANJOS ALMEIDA, V., CARVALHO, F. S., ALBUQUERQUE, G. R., ... & SILVA, F. L. Epidemiology of canine leishmaniasis in southern Bahia, Brazil. **Acta Tropica**, v. 148, p. 115-119, 2015.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. Sistema genital. In: _____. **Patologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. p. 1169-1244.

JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4. ed. New York: Academic Press, 1993. v. 3, 747 p.

JÚNIOR, N. F. L., GUEDES, P. E. B., SANTANA, L. N., DOS ANJOS ALMEIDA, V., CARVALHO, F. S., ALBUQUERQUE, G. R., ... & SILVA, F. L. Epidemiology of canine leishmaniasis in southern Bahia, Brazil. **Acta Tropica**, v. 148, p. 115-119, 2015.

JUNIOR, G., RIBEIRO, A., BRASIL, G. V. D. S., FERREIRA, L. C., RODRIGUES, Z. M. R., & AQUINO JÚNIOR, J. Análise dos casos de leishmaniose visceral utilizando técnicas de geoprocessamento. **J. health inform**, v.8, supl. I, p. 929-938, 2016.

KARP, C. L., EL-SAFI, S. H., WYNN, T. A., SATTI, M. M. H., KORDOFANI, A. M, et al. *In vivo* cytokine profiles in patients with kala azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. **J Clin Invest**, v. 91, p.1644–1648, 1993.

KAUFER, A., ELLIS, J., STARK, D., & BARRATT, J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 287, 2017.

KOUTINAS, A. F. & KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 527-538, 2014.

LACHAUD, L., CHABBERT, E., DUBESSAY, P., DEREURE, J., LAMOTHE, J., DEDET, J. P., BASTIEN, P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. **Parasitology**, v. 125, p. 197–207, 2002 .

LAGE, R. S., OLIVEIRA, G. C. D., BUSEK, S. U., GUERRA, L. L., GIUNCHETTI, R. C., CORREA-OLIVEIRA, R., & REIS, A. B. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by Leishmania chagasi. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 115, n. 1, p. 135-145, 2007.

LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LASKAY, T., VAN ZANDBERGEN, G., SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology** v.213,p. 183–191, 2008.

LAURENTI, M. D., DE SANTANA LEANDRO JR, M. V., TOMOKANE, T. Y., DE LUCCA, H. R. L., ASCHAR, M., SOUZA, C. S. F., ... & DA MATTA, V. L. R Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 444–450, 2014.

LEANDRO, C.; SANTOS-GOMES, G.M.; CAMPINO, L.; ROMÃO, P.; CORTES, S.; ROLÃO, N.; GOMES-PEREIRA, S.; CAPELA, M.J.R.; ABRANCHES, P. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibodies response in natural and experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.79p. 273-284, 2001.

LEITE, R. S., DE ALMEIDA FERREIRA, S., ITUASSU, L. T., DE MELO, M. N., & DE ANDRADE, A. S. R. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. **Veterinary parasitology**, v. 170, n. 3-4, p. 201-206, 2010.

LOPES, E. G., SEVÁ, A. P., FERREIRA, F., NUNES, C. M., KEID, L. B., HIRAMOTO, R. M., ... & GALATI, E. A. B. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. **Epidemiology & Infection**, v.145, n.12,p. 2436-2444, 2017.

LOPES-NETO, B. E., LIMA, A. L., SANTOS, G. J. L., GONÇALVES, L. D., MAIA, F. M. M., DE FREITAS, J. C. C., & NUNES-PINHEIRO, D. C. S. (2015). Avaliação da resposta inflamatória em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.9, n.4,p. 645-656, 2015.

LUCENA, R. V., e DOS SANTOS MEDEIROS, J. Caracterização epidemiológica da leishmaniose visceral humana no Nordeste brasileiro, entre 2010 e 2017. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v.14, n.4, 2018.

MACHADO, J. G. **Resposta imune após à infecção por Leishmania chagasi em camundongos Balb/c imunossuprimidos.** 95-f. (Tese de doutorado em Medicina Veterinária). São Paulo. Universidade Estadual de São Paulo –UNESP, 2008.

MADEIRA, M. F., UCHÔA, C. M. A., LEAL, C. A., SILVA, R. M. M., DUARTE, R., MAGALHÃES, C. M. & SERRA, C. M. B. Leishmania (Viannia) braziliensis in naturally infected dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 551-555, 2003.

MAGALHÃES, N.A., PINHO, F.A., OLIVEIRA, F.L., SILVA, K. R., COSTA, F. A. L. Classificação das alterações pulmonares na leishmaniose visceral canina. **R. bras. Ci. Vet.** v. 23, n.1-2, p. 60-65, 2016.

MAIA, C., CAMPINO, L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? **Trends in Parasitology**.v.27,n.8, p.341-344, 2011.

MANNA, L., PACIELLO, O., DELLA MORTE, R., & GRAVINO, A. E. Detection of Leishmania parasites in the testis of a dog affected by orchitis: case report. **Parasites & Vectors**, v.5, p.1-4, 2012.

MARANHÃO. Secretaria de Estado da Saúde. **Governo orienta populações sobre Leishmanioses.** São Luis, 2015. Disponível em: www.ma.gov.br-governo-orienta-populações-sobre-as-leishmanioses . Acesso em: 10 ago. 2019.

MARINO, G.; GAGLIO, G.; ZANGHI, A. Clinicopathological study of canine transmissible venereal tumour in leishmaniotic dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v.53, p.323-327, 2012.

MESSAOUD, H. B. B., GUICHARD, M., LAWTON, P., DELTON, I., & AZZOUZ-MAACHE, S. Changes in lipid and fatty acid composition during intramacrophagic

transformation of Leishmania donovani complex promastigotes into amastigotes. **Lipids**, v. 52, n. 5, p. 433-441, 2017.

MICHELETTI, A. C.; BEATRIZ, A. Progressos recentes na pesquisa de compostos orgânicos com potencial atividade leishmanicida. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 268-286, 2012.

MIR, F., FONTAINE, E., REYES-GOMEZ, E., CARLUS, M., & FONTBONNE, A. Subclinical leishmaniasis associated with infertility and chronic prostatitis in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v.53, p.419-422, 2012.

MOHAMMADIHA, A., HAGHIGHI, A., MOHEBALI, M., MAHDIAN, R., ABADI, A. R., ZAREI, Z., YEGANEH, F., KAZEMI, B., TAGHIPOUR, N., AKHOUNDI, B., BARATI, M., MAHMOUDI, M. R. Canine visceral leishmaniasis: a comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of Leishmania infantum infection. **Vet Parasitol**, v.192, p. 83–90, 2013a.

MOHAMMADIHA, A., MOHEBALI, M., HAGHIGHI, A., MAHDIAN, R., ABADI, A.R., ZAREI, Z., YEGANEH, F., KAZEMI, B., TAGHIPOUR, N., AKHOUNDI, B. Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of Leishmania (Leishmania) infantum infectionin human and dog blood samples. **Exp Parasitol**, v.133, p. 89–94, 2013b.

MONTEIRO, É. M., SILVA, J. C. F. D., COSTA, R. T. D., COSTA, D. C., BARATA, R. A., PAULA, E. V. D., ... & DIAS, E. S. 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.

MÜLLER, N., ZIMMERMANN, V., HENTRICH, B., GOTTSSTEIN, B. Diagnosis of Neospora caninum and Toxoplasma gondii infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. **J. Clin. Micro.** V. 34,p. 2850–2852, 1996.

NASCIMENTO, M. S. L., CARREGARO, V., LIMA-JÚNIOR, D. S., COSTA, D. L., RYFFEL, B., DUTHIE, M. S., ... & DA SILVA, J. S. Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against Leishmania infantum infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 211, n. 6, p. 1015-1026, 2014.

NASCIMENTO, E.F. & SANTOS, R.L. **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos**. Guanabara Koogan,Rio de Janeiro, 156 p.,2011.

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, p.67, 2012.

NELSON, R. W., COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1324p.

NEMATI, T., KHANMOHAMMADI, M., BAZMANI, A., MIRSAMADI, N., KOSHKI, M. H. K., MOHEBALI, M. Study on Leishmania infection in cats from Ahar, East Azerbaijan

Province and North West Iran by parasitological, serological and molecular methods. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v.5,n.1, p.40-43, 2015.

OLIVEIRA, V. V. G. D., MACEDO, S. R. B. D., ARAÚJO, F. R. D., RAMOS, C. A. D. N., RAMOS, R. A. N., MAIA, F. C. L., ... & SILVA JUNIOR, V. A. D. Histopathological evaluation and parasite quantification (qPCR) in the male dog's genital system after natural infection with *Leishmania infantum*. **Ciência Rural**, v.46, n.4,p. 641-647, 2016 a.

OLIVEIRA, V. V. G. D., MACEDO, S. R. B. D., ARAÚJO, F. R. D., RAMOS, C. A. D. N., RAMOS, R. A. N., MAIA, F. C. L., ... & SILVA JUNIOR, V. A. D. Correlation between chronic inflammation, immunostaining and parasite load in the genital system of female dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Ciência Rural**, v.46, n.11, p. 2029-2035, 2016b.

OLIVEIRA, V. V. G. D., RAMOS, R. A. N., RAMOS, C. A. D. N., GUERRA, N. R., MAIA, F. C. L., ALVES, L. C., & SILVA JUNIOR, V. A. D. Molecular evidence of early vertical transmission of *Leishmania* (*Leishmania*) infantum in a dog. **Ciência Rural**, v. 47, n. 1, 2017.

ORDEIX, L., SOLANO-GALLEGO, L., FONDEVILA, D., FERRER, L., FONDATI A. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune response. **Vet Dermatol**.v. 16, n. 3, p. 187-19, 2005.

OWENS, S. D.; OAKLEY, D. A.; MARRYOTT, K.; HATCHETT, W.; WALTON, R.; NOLAN, T. J.; NEWTON, A.; STEURER, F.; SCHANTZ, P.; GIGER, U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 219, p.1076-1083, 2001.

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

PENHA, T.A.; SANTOS, A.C.G.; REBÉLO, J.M.M.; MORAES, J.L.P.; GUERRA, R.M.S.N.C. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área endêmica de leishmaniose visceral canina na região metropolitana de São Luís – MA, Brasil. **Biotemas**, v. 26, n. 2, p. 121-127, 201.

PEREIRA, V. F., BENASSI, J. C., STARKE-BUZZETTI, W. A., SILVA, D. T., FERREIRA, H. L., KEID, L. B., ... & OLIVEIRA, T. M. F. D. S. Detection of canine visceral leishmaniasis by conjunctival swab PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.49, n.1 ,p. 104-106, 2016.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V., MACHADO-DE-ASSIS, T.S., RABELLO, A. Use of the Kala-Azar Detect® and IT-LEISH® rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro.v. 107, n.7, p.951-952, 2012.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BENADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infectious Immunology**, v. 62p. 229-235, 1994.

PODINOVSKAIA, M., DESCOTEAUX, A. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111-129, 2015.

QUARESMA, P. F., MURTA, S. M. F., DE CASTRO FERREIRA, E., DA ROCHA, A. C. V. M., XAVIER, A. A. P., & GONTIJO, C. M. F. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of Leishmania species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta tropica**, v. 111, n. 3, p. 289-294, 2009.

QUINNEL, R.J.; COURTNAY, O.; SHAW, M.; DAY, M.J.; GARCEZ, L.M.; DYE, C.; KAYE, P.M. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Disease**, v.183, p. 1421-1424, 2001.

QUINTAL, A. P., BORGES, B. C., BRÍGIDO, P. C., SILVA, R. T., NOTÁRIO, A. F., SANTOS, M. A., ... & VASCONCELOS, A. B. Revealing the kinetics of Leishmania chagasi infection in the male genital system of hamsters. **Infectious diseases of poverty**, v. 5, n. 1, p. 29, 2016.

RAMOS, R. A. D. N.; RAMOS, C. A. D. N.; JUSI, M. M. G.; ARAÚJO, F. R. D.; MACHADO, R. Z.; FAUSTINO, M. A. D. G.; & ALVES, L. C. Polymerase chain reaction and real-time PCR for diagnosing of *Leishmania infantum chagasi* in dogs. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v. 21, n. 3, p. 192-195, 2012.

RAMOS-VARA, J. A., KIUPEL, M., BASZLER, T., BLIVEN, L., BRODERSEN, B. W., CHELACK, B. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **J Vet Diagn Invest**.v. 202008; p. 393-413, 2008.

REIS, A. B., TEIXEIRA-CARVALHO, A., VALE, A. M., MARQUES, M. J., GIUNCHETTI, R. C., MAYRINK, W., ... & MARTINS-FILHO, O. A. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 112, n. 3, p. 102-116, 2006.

REIS, L. L. D., BALIEIRO, A., FONSECA, F. R., GONCALVES, M. J. F. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.50, n. 5, p. 638–645, 2017.

REY, L. C., MARTINS, C. V., RIBEIRO, H. B., & LIMA, A. A. Leishmaniose visceral americana (calazar) em crianças hospitalizadas de área endêmica. **J Pediatr**, v. 81, n. 1, p. 73-8, 2005.

RITTER, U., FRISCHKNECHT, F., VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites?. **Trends in parasitology**, v. 25, n. 11, p. 505-510, 2009.

ROGERS, K. A., DEKREY, G. K., MBOW, M. L., GILLESPIE, R. D., BRODSKY, C. I., & TITUS, R. G. Type 1 and type 2 responses to Leishmania major. **FEMS microbiology letters**, v. 209, n. 1, p. 1-7, 2002.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251-262, 2014.

ROSA, M. E. e A., MACHADO, P. R. L Disseminated Leishmaniasis: Clinical, immunological, and therapeutic aspects. **Drug Development Research**, v. 72, n. 6, p. 437-441, 2011.

SCHIMMING, B. C., & SILVA, J. R. C. P. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, p. 1-17, 2012.

SALES, D. P., CHAVES, D. P., DOS SANTOS MARTINS, N., & SILVA, M. I. S. Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Canina e Humana no Estado do Maranhão, Brasil (2009-2012). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.24,n.3, 2017.

SANTOS-GOMES, G., M, ROSA, R., LEANDRO, C., CORTES, S., ROMÃO, P. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by Leishmania infantum. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, p. 21-30, 2002.

SAPORITO, L., GIAMMANCO, G. M., DE GRAZIA, S., & COLOMBA, C. Visceral leishmaniasis: host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. e572-e576, 2013.

SARIDOMICHELAKIS, M. N., KOUTINAS, A. F., OLIVRY, T., DUNSTON, S. M., FARMAKI, R., KOUTINAS, C. K. & PETANIDES, T. Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniosis. **Veterinary Dermatology**, v. 18, n. 4, p. 227-233, 2007.

STRAUSS-AYALI, DALIT; BANETH, GAD; JAFFE, CHARLES L. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Veterinary research**, v. 38, n. 4, p. 547-564, 2007.

SELDER, R., WEBER, K., BERGMANN, M., GEISWEID, K., & HARTMANN, K. Sensitivity and specificity of an in-clinic point-of-care PCR test for the diagnosis of canine leishmaniasis. **The Veterinary Journal**, v. 232,p. 46-51, 2018.

SERENO, D; MAIA, C; AÏT-OUDHIA, K. Antimony resistance and environment: Elusive links to explore during Leishmania life cycle. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 200-203, 2012.

SILVA, F. L., RODRIGUES, A. A., REGO, I. O., SANTOS, R. L., OLIVEIRA, R. G., SILVA, T. M., ... & SANTOS, R. L. 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.; OLIVEIRA, R.G.; SILVA, T.M.; XAVIER, M.N.; NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol.** v. 160, p. 55–59, 2009a.

SILVA, F. K. A. **Leishmaniose Visceral Canina** [Monografia]. Recife-PE: Universidade Federal Rural do Semi-Árido; 2009b.

SILVA, R. B., MENDES, R. S., SANTANA, V. L., SOUZA, H. C., RAMOS, C. P., SOUZA, A. P., ... & MELO, M. A. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 36, n. 7, p. 625-629, 2016.

SILVA, S. C. P. F. **Impacto do uso de coleiras impregnadas com Deltametrina a 4% na prevenção da Leishmaniose Visceral Canina, no município de Juatuba, Minas Gerais.Dissertação (Mestrado)** - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 112 p. 2017.

SILVEIRA, A. P. S. D., VIEIRA, V. B. D., BATALINI, L. S., CARMO, S. B. D., FRIOZI, E., ARRUDA, E. J. D., ... & NEITZKE-ABREU, H. C. PCR sensitivity of peripheral blood of dogs co-infected with *Leishmania* spp. and *Ehrlichia* spp. in endemic area of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.51, n.6, p. 843-847, 2018.

SOLANO-GALLEGO, L.; RIERA, C.; ROURA, X.; INIESTA, L.; GALLEGOS, M.; VALLADARES, J. E., ... & ARBOIX, M. Leishmania infantum-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas: evolution in the course of infection and after treatment. **Veterinary parasitology**, v. 96, n. 4, p. 265-276, 2001.

SOUSA, J. M. S., RAMALHO, W. M., MELO, M. A. Demographic and clinical characterization of human visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco, Brazil between 2006 and 2015. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.51,n.5, p. 622- 630, 2018.

SOUSA, E. P. Evolution of visceral leishmaniasis in São Luís, Maranhão: an epidemiological and temporal analysis of cases. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 2, 2020.

SUDARSHAN, M., e SUNDAR, S. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian visceral leishmaniasis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v.80, n.1,p. 40-42, 2014

TAFURI, W. L., SANTOS, R. L., ARANTES, R. M., GONÇALVES, R., MELO, M. N., MICHALICK, M. S., TAFURI, W. L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffinembedded canine tissues. **J. Immunol. Methods**, v. 292, p. 17-23, 2004.

THOMÉ, H. E., DI SANTIS, G. W., DE MOURA, V. M. B. D., AMORIM, R. L., & BANDARRA, E. P. Avaliação histopatológica testicular e epididimária em cães adultos sem

raça definida (SRD) da região de São João da Boa Vista, SP. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 4, p. 745-755, 2007.

TILLEY, L. P.; SMITH, F. W. K. Distúrbios do desenvolvimento sexual. **Consulta Veterinária em**, v. 5, p. 420-421, 2008.

TRAVI, B. L., TABARES, C. J., CADENA, H., FERRO, C., OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitological status and infectivity for sand flies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, p.119-124, 2001.

TOLEDO, D. C., FALEIRO, M. B. R., RODRIGUES, M. M. P., SANTIS, D., WINGETER, G., AMORIM, R. L., & MOURA, V. M. B. D. Histomorphological characterization of proliferative inflammatory atrophy in canine prostate. **Ciência Rural**, v. 40, n. 6, p. 1372-1377, 2010.

TURCHETTI, A.P. **Perfil de expressão gênica e níveis de citocinas em macrófagos caninos com diferentes graus de suscetibilidade à infecção por Leishmania Infantum**. 2014. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

VARELLA, P.P.V.; FORTE, W.C.N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Immunopatologia**, v. 24, p. 146-154, 2001.

VERCOSA, B.L., MELO, M.N., DEL PUERTO, H.L., MENDONCA, I.L., VASCONCELOS,A.C., Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of Leishmania (Leishmania) chagasi naturally infected dogs: a histomorphometric analysis. **Vet. Parasitol.** v. 189,p. 162–170, 2012.

VERMA, S., KUMAR, R., KATARA, G. K., SINGH, L. C., NEGI, N. S., RAMESH, V., & SALOTRA, P. VERMA, Sandeep et al. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10107, 2010.

WERNECK, L. Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo?. **Cad. Saúde Pública** , v. 32, n. 6, 2016.

WEIRATHER, J. L., JERONIMO, S. M., GAUTAM, S., SUNDAR, S., KANG, M., KURTZ, M. A., ... & DONELSON, J. E. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of Leishmania spp. in human samples. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 11, p. 3892-3904, 2011.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> . Acesso em: 10 ago. 2019.

WILSON, T. M., MAGALHÃES, L. F., MEDEIROS, A. A. & FURQUIM, M. E. C. Alterações macroscópicas em cães sororreagentes para Leishmania chagasi e sua correlação com teste parasitológico. **Veterinária Notícias Veterinary News**, v.18, n.2, p. 20-25, 2012.

ZACHARY, J. F. Pathologic Basis of Veterinary Disease. 6 ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, p. 1204-1212, 2017.