

FABIANA LESSA SILVA

**Lesões genitais em cadelas naturalmente infectadas com *Leishmania chagasi* e
soroconversão de cadelas acasaladas com cães portadores**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da UFMG,
como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor
em Ciência Animal.

Área: Patologia

Orientador: Prof. Renato de Lima Santos

Co-orientador: Prof. Ernane Fagundes do Nascimento

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2007**

S5861 Silva, Fabiana Lessa, 1975-
Lesões genitais em cadelas naturalmente infectadas com *Leishmania chagasi* e soroconversão de cadelas acasaladas com cães portadores / Fabiana Lessa Silva. – 2007.
47 p. : il.

Orientador: Renato de Lima Santos

Co-orientador: Ernane Fagundes do Nascimento

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Cão – Doenças – Teses. 2. Leishmaniose visceral – Transmissão – Teses. 3. Aparelho genital – Ferimentos e lesões – Teses. I. Santos, Renato de Lima. II. Nascimento, Ernane Fagundes do. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.708 96

Tese defendida e aprovada em 16 de agosto de 2007 pela comissão examinadora constituída por:

À Deus por me concecer o dom da vida
e por me guiar em meus caminhos...

À minha filha Sophia, razão da minha vida...

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pela dedicação ao longo de toda minha vida, apoio e incentivo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, essencial para a execução deste trabalho e para minha formação profissional ao longo desses anos.

Ao professor e orientador Renato de Lima Santos, para mim um exemplo de profissional, por ter confiado a mim a execução deste trabalho e por ter me ajudado a crescer como profissional e como pessoa.

Ao professor Ernane Fagundes do Nascimento pelos ensinamentos, pelo apoio e por ter facilitado a execução da parte experimental deste trabalho.

Ao professor Wagner Luiz Tafuri, profissional e ser humano que tanto admiro, pela colaboração e pelo apoio fundamental nos momentos difíceis.

À professora Maria Norma de Mello pela atenção e colaboração.

Aos alunos e ao responsável pelo Laboratório de Leishmaniose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, professor Élvio Carlos Moreira, pela realização dos exames sorológicos.

Ao Departamento Municipal de Limpeza Urbana de Juiz de Fora (DEMLURB), em especial aos funcionários do canil, pela boa vontade e prestabilidade no fornecimento de cães para execução da parte experimental deste trabalho.

Ao Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, em especial aos funcionários Maria do Carmo e Róbson, pela boa vontade e valiosa colaboração no fornecimento de material para o trabalho.

Ao Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Ribeirão das Neves, em especial à veterinária Soraia, pela boa vontade e valiosa colaboração no fornecimento de material e cães para execução da parte experimental deste trabalho.

Ao Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Contagem, em especial ao veterinário Leonardo, pela boa vontade e fornecimento de cães para execução da parte experimental deste trabalho.

Ao Ângelo e sua família pela boa vontade e valiosa contribuição na aquisição de cães para execução da parte experimental deste trabalho.

Às funcionárias do Colegiado de Pós-Graduação da Escola de Veterinária da UFMG pela paciência e boa vontade em ajudar ao longo desses quatro anos.

À professora Rogéria Serakides e à Natália, pelos bons momentos divididos e apoio em momentos difíceis.

Às funcionárias Mel e Marilene, técnicas do laboratório de Histopatologia da Escola de Veterinária da UFMF, pela contribuição valiosa na execução deste trabalho.

Aos alunos de Iniciação Científica Antônio, Mariana, Raquel Oliveira, Raquel Hungueri e Teane pela boa vontade, disponibilidade e pela ajuda indispensável na execução deste trabalho. Este trabalho também é de vocês!!!

Aos amigos Antônio, Mariana, Raquel Oliveira, Raquel Hungueri e Teane, por terem estado ao meu lado ao longo de todo esse tempo, compartilhando alegrias e dificuldades... Vocês me ensinaram muito!

Às amigas e companheiras Flávia e Eliane, por tanta amizade ao longo dos últimos anos, por tantos momentos felizes compartilhados e pelo apoio incondicional nos momentos difíceis. Vocês fazem parte de minha vida!

À amiga Regina Bueno pela amizade, por compartilhar comigo momentos difíceis e também momentos felizes! Pela tranquilidade e lucidez que tantas vezes me ajudaram durante essa jornada...

Aos amigos Soraia e Marcos pela amizade, apoio valioso nas horas difíceis e pelos vários momentos felizes compartilhados juntos. Obrigada por tudo!

Às amigas e companheiras Alcina e Tatiane, pela colaboração neste trabalho, pelo companheirismo, sinceridade, amizade, apoio em momentos difíceis e pelas alegrias compartilhadas. Vocês moram no meu coração!

À amiga Sílvia França, pelo companheirismo, apoio em momentos difíceis e pela risada mais espontânea que eu conheço, que tantas vezes tornou mais leves os meus dias...

Às minhas novas amigas Aliny e Jankerle, pela amizade, companheirismo e por terem tornado meus dias mais felizes!

Às colegas da preventiva Ana Cláudia, Ana Paula, Karina, Sílvia e Telma pelo carinho e pelos tantos bons momentos compartilhados.

Aos colegas de pós-graduação do laboratório de Patologia de ontem e de hoje... Alessandra Estrela, Aline Viott, Andréa Piacenti, Cris, Edmilson, Eveline, Fábio, Núbia, Renatinha, Sílvia e Vitor pela convivência agradável durante todo esse tempo e pelos bons momentos vividos.

Aos demais colegas de pós-graduação da Escola de Veterinária, às festas e churrascos, por terem tornado meus dias mais felizes. As recordações serão muitas!

Aos cães que a mim confiaram as suas vidas... Muito obrigada!

Tudo tem seu tempo e até certas manifestações mais vigorosas e originais entram em voga ou saem de moda. Mas a sabedoria tem uma vantagem: é eterna.

(Baltasar Gracián)

SUMÁRIO

	RESUMO	11
	ABSTRACT	12
1.	CAPÍTULO 1 – Aspectos gerais da leishmaniose visceral canina	13
1.1.	Introdução	13
1.2.	Objetivos e hipótese	14
1.3	Revisão de literatura	14
1.3.1	Aspectos clínicos, bioquímicos e patológicos da infecção por <i>L. chagasi</i> e métodos de diagnóstico	16
2.	CAPÍTULO 2. – Lesões genitais e distribuição de amastigotas em cadelas naturalmente infectadas por <i>Leishmania chagasi</i>	20
2.1	INTRODUÇÃO	20
2.1.1	Lesões genitais na leishmaniose visceral humana	20
2.1.2	Lesões genitais na leishmaniose visceral canina e eliminação de <i>Leishmania</i> sp no sêmen de cães	20
2.2	Material e Métodos	21
2.3	Resultados e Discussão	22
2.4	Conclusões	26
3.	CAPÍTULO 3 – Transmissão venérea da leishmaniose visceral canina	27
3.1	Introdução	27
3.2	Material e Métodos	27
3.3	Resultados	29
3.4	Discussão	35
3.5	Conclusões	36
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
5.	APÊNDICES	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados da PCR para detecção de <i>Leishmania</i> (Complexo Donovanii) na genitália de cadelas naturalmente infectadas	25
Tabela 2	Resultados da PCR para detecção de kDNA de <i>Leishmania</i> no sêmen dos cães testados	30
Tabela 3	Número de cópulas e número de cães que copularam para cada cadela	31
Tabela 4	Principais alterações macroscópicas observadas durante as necropsias das cadelas.	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Vulva; cadela assintomática. Infiltrado inflamatório na derme prepredominantemente perifolicular. HE	23
Figura 2	Vulva; cadela assintomática. Imunomarcção de amastigotas de <i>Leishmania</i> sp no citoplasma de macrófagos. Complexo estreptavidina-peroxidase	24
Figura 3.	Resultado representativo da PCR para detecção de DNA de <i>Leishmania</i> (Complexo Donovan) em amostras de genitália de cadela naturalmente infectada e sintomática	26
Figura 4	Resultado representativo da PCR para detecção de DNA de <i>Leishmania</i> (Complexo Donovan) em amostras de sêmen de dois cães naturalmente infectados	30

RESUMO

A transmissão da leishmaniose visceral ocorre principalmente na presença do hospedeiro invertebrado, embora existam relatos de transmissão na ausência do vetor, inclusive a transmissão venérea na espécie humana. Considerando a importância de vias alternativas de transmissão para o controle da doença, este estudo teve como objetivos (i) caracterizar as lesões genitais e detectar *Leishmania* sp. em cadelas com leishmaniose visceral e (ii) verificar a ocorrência de soroconversão e a presença de amastigotas nos tecidos e órgãos de cadelas livres de *Leishmania* acasaladas com cães que eliminavam *Leishmania* sp. no sêmen. Dez cadelas adultas soropositivas para leishmaniose foram selecionadas e divididas em dois grupos: (i) cadelas assintomáticas (n=5) e (ii) cadelas sintomáticas (n=5). Cinco cadelas adultas sorologicamente negativas foram utilizadas como controle. Amostras de ambos os ovários, tubas uterinas, cornos uterinos, corpo do útero, cérvix, vagina, vulva, baço e fígado foram avaliadas histologicamente e processadas para imunodeteção de *Leishmania* sp. Amostras dos mesmos tecidos foram processadas para detecção de kDNA de *Leishmania* pela técnica de PCR. Amastigotas de *Leishmania* sp. foram observadas somente na vulva e vagina de cadelas com leishmaniose visceral, embora o processo inflamatório observado nesses segmentos tenha apresentado intensidade e distribuição semelhantes em cadelas naturalmente infectadas e controles. Embora o kDNA de *Leishmania* tenha sido detectado por PCR na genitália interna, não foram evidenciadas amastigotas ou lesões associadas a leishmaniose visceral nestes segmentos do trato genital. Treze cães com leishmaniose visceral foram selecionados e avaliados quanto à eliminação de *Leishmania* sp. no sêmen pela PCR. Dez cadelas adultas livres de *Leishmania*, mantidas em ambiente vedado e sem contato com flebotomíneos, foram acasaladas com os cães soropositivos que eliminavam *Leishmania* sp. no sêmen. Após as cópulas as cadelas foram avaliadas sorologicamente a cada 15 dias. Ao final do período de observação (cinco meses após a última cópula) foram coletadas amostras de todos os segmentos do trato genital, fígado, baço e linfonodos, que foram avaliadas histologicamente e processadas para imunodeteção de *Leishmania* sp. Onze dos 13 cães com leishmaniose visceral eliminaram *Leishmania* sp. no sêmen, sendo essa eliminação intermitente e aleatória. Das dez cadelas estudadas, duas apresentaram soroconversão. Entretanto, não foram observadas amastigotas nos tecidos de nenhuma das cadelas avaliadas.

Palavras-chave: Cão, *Leishmania*, trato genital, transmissão venérea.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is primarily transmitted by a biological invertebrate vector, although transmission in the absence of the vector has been reported, including venereal transmission in humans. Considering the importance of alternative routes of transmission for disease control, the goals of this study were (i) to characterize genital lesions and to detect *Leishmania* sp. in bitches with visceral leishmaniasis, and (ii) to verify the occurrence of seroconversion and presence of amastigotes in organs and tissues of bitches free of *Leishmania* sp. that have copulated with male dogs shedding *Leishmania* sp. in the semen. Ten adult bitches seropositive for leishmaniasis were selected and divided into two groups: (i) symptomatic bitches (n=5) and (ii) asymptomatic bitches (n=5). Five adult serologically negative bitches were used as controls. Samples were collected from both ovaries, uterine tubes, uterine horns, uterine body, cervix, vagina, vulva, spleen and liver, histologically evaluated, and processed for immunodetection of *Leishmania* sp. Samples of the same tissues were processed for detection *Leishmania* kDNA by PCR. *Leishmania* amastigotes were observed only in the vulva and vagina of the bitches with visceral leishmaniasis, although infected and control bitches had similar intensity and distribution of inflammation. Although *Leishmania* kDNA was detected by PCR in the internal genital organs, no evidences of amastigotes or lesions associated with visceral leishmaniasis were observed in these segments. Thirteen male dogs with visceral leishmaniasis were selected and tested for shedding of *Leishmania* sp. in the semen. Ten adult bitches free of *Leishmania*, maintained in an environment free of phlebotomines, copulated with serologically positive male dogs that eliminated *Leishmania* sp. in the semen. After copulations, bitches were serologically evaluated every 15 days. At the end of the period of observation (five months after the last mating), samples of all the genital organs, spleen, liver, and lymph nodes were collected, histologically evaluated, and processed for immunodetection of *Leishmania* sp. Eleven of the dogs with visceral leishmaniasis that were tested shed *Leishmania* sp. in the semen, and shedding was intermittent and randomly distributed over the time-course. Two of the ten bitches had seroconversion. However, no amastigotes were observed in tissues.

Keywords: Dog, *Leishmania*, genital tract, venereal transmission.

CAPÍTULO 1

Aspectos gerais da leishmaniose visceral canina

1.1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma zoonose de ampla distribuição mundial, presente em países do Mediterrâneo, Ásia e América Latina. A doença é endêmica em 62 países, com cerca de 300.000 milhões de pessoas sob o risco de contraírem a infecção e 500.000 novos casos da doença humana e 40.000 mortes a cada ano (Desjeux, 2001; Guerin et al., 2002; OMS, 2005). De acordo com o Ministério da Saúde, mais de 1.000 casos humanos da doença ocorrem anualmente no Brasil. Apesar da região do nordeste brasileiro concentrar o maior número de casos da doença (Arias et al., 1996; Ashford et al., 1998; Caldas et al., 2002; FUNASA, 2002), nos últimos anos tem ocorrido um aumento significativo da incidência da leishmaniose visceral em estados da região sudeste, incluindo Minas Gerais (Oliveira et al., 2001; FUNASA, 2002; Silva et al., 2005). A região metropolitana de Belo Horizonte teve seu primeiro caso de leishmaniose visceral humana diagnosticado em 1994. Entre o período de 1994 e 1999 foram confirmados 345 casos humanos na região metropolitana (Silva et al., 2001). Existem estudos demonstrando a correlação entre a distribuição espacial de cães soropositivos e ocorrência de casos humanos, o que reforça a importância do cão como reservatório para infecções humanas (Oliveira et al., 2001; Margonari et al., 2006).

A *Leishmania* sp. é um parasito heteroxeno, necessitando de dois hospedeiros para completar seu ciclo de vida. Um dos hospedeiros é vertebrado mamífero, geralmente canídeos domésticos ou

silvestres e o homem. O outro hospedeiro é invertebrado díptero hematófago pertencente à família Phlebotomidae, gênero *Phlebotomus*, com várias espécies no Velho Mundo e o gênero *Lutzomyia*, com uma única espécie *Lutzomyia longipalpis*, no Novo Mundo (Chang, 1990; Vassílios, 1993; Marsella e Gopegui, 1998).

Parasitas do gênero *Leishmania* apresentam três formas morfológicas: amastigota, que parasita os macrófagos dos hospedeiros vertebrados, promastigota e paramastigota, que ocupam o lume do trato digestivo dos hospedeiros invertebrados e permanecem ligadas ao epitélio por seus flagelos móveis. A transmissão geralmente acontece entre vetores invertebrados e mamíferos. Portanto, geralmente a transmissão ocorre na presença do vetor, que se infecta quando faz repasto sanguíneo num animal ou homem infectado, ingerindo as formas amastigotas presentes na derme. Dentro do trato digestivo do inseto as formas amastigotas transformam-se em promastigotas entre 24 a 48 horas após a ingestão. No intestino do inseto essas promastigotas reproduzem-se e migram para o esôfago e faringe. Durante o próximo repasto sanguíneo elas são regurgitadas e penetram na derme do hospedeiro vertebrado (Kamhawi, 2006). Quando o hospedeiro vertebrado é infectado pelas promastigotas estas são fagocitadas por macrófagos e se transformam em amastigotas. Dentro dos macrófagos as amastigotas reproduzem-se, rompem os macrófagos, são liberadas no meio extracelular e são, então, novamente fagocitadas por outros macrófagos (Handman e Bullen, 2002).

Embora a principal forma de transmissão seja da infecção seja pela picada do hospedeiro invertebrado, existem relatos na literatura sobre transmissão na ausência do vetor. Em humanos, há relatos de transmissão entre doadores de sangue (Otero et al., 2000) e devido ao uso de agulhas e

seringas compartilhadas entre usuários de drogas injetáveis (Bosch et al., 2002). A transmissão vertical de *Leishmania* entre humanos já foi descrita (Low et al., 1926) Adicionalmente, há um relato de transmissão venérea entre um homem contaminado e sua esposa em área livre da doença e do vetor (Symmers, 1960).

Em cães, Gaskin et al. (2002) sugeriram a possibilidade de transmissão da infecção por *L. infantum* na ausência do vetor invertebrado, para justificar a ocorrência de leishmaniose visceral num canil localizado em área não endêmica e livre do vetor. Há relatos na literatura que indicam a ocorrência de transmissão da infecção por transfusão sanguínea (Owens et al., 2001; Giger et al., 2002; De Freitas et al., 2006). A transmissão vertical da infecção em cães também foi sugerida por Masucci et al. (2003) e Dubey et al. (2005), embora tenham sido publicadas evidências anteriores indicando que a transmissão vertical não ocorre na espécie canina (Andrade et al., 2002). Amastigotas de *Leishmania* já foram previamente descritas no útero de uma cadela (Rosypal et al., 2005), com evidências de transmissão vertical da doença.

Em cães, não se sabe se ocorre transmissão venérea, embora esta forma de transmissão tenha sido considerada provável (Deane, 1956). Além disso, recentemente foram descritas em detalhes as lesões no sistema genital do cão associadas com leishmaniose visceral, além da detecção do protozoário no sêmen pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Diniz et al., 2005).

1.2. OBJETIVOS E HIPÓTESE

A hipótese que originou este projeto é que ocorre transmissão venérea da leishmaniose visceral canina. Esta hipótese foi testada através dos seguintes objetivos específicos:

- (i) Verificar a ocorrência de soroconversão em cadelas livres de *Leishmania* acasaladas com cães soropositivos sintomáticos com eliminação seminal de *Leishmania* na ausência do vetor biológico;
- (ii) Detectar formas amastigotas em vários órgãos e tecidos de cadelas livres de *Leishmania* acasaladas com cães soropositivos sintomáticos com eliminação seminal de *Leishmania* na ausência do vetor biológico;
- (iii) Identificar e caracterizar as lesões presentes no trato genital de cadelas naturalmente infectadas por *L. chagasi*;
- (iv) Detectar a presença de *Leishmania* nos órgãos genitais por imuno-histoquímica e PCR.

1.3. REVISÃO DE LITERATURA

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários digenéticos do gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae) manifestando-se sob várias formas clínicas. Parasitas do gênero *Leishmania* são transmitidos ao homem e a outros mamíferos por meio da picada de fêmeas de insetos hospedeiros infectados. Os hospedeiros invertebrados estão restritos a espécies de flebotomíneos hematófagos (Ordem Diptera, Família Psychodidae, Sub-família Phlebotominae), especialmente à espécie *Lutzomyia longipalpis* no Novo Mundo e ao gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo (Grimaldi Jr. e Tesh, 1993).

As espécies do gênero *Leishmania* possuem formas distintas durante seu ciclo de vida: formas promastigotas e paramastigotas,

flageladas e móveis, que se desenvolvem no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados e formas amastigotas, não-flageladas, que vivem e se multiplicam no interior de células do sistema fagocítico-mononuclear (SFM) dos hospedeiros vertebrados (Maüel, 1990). As formas infectantes são denominadas promastigotas metacíclicas e são menores e possuem flagelo mais longo quando comparadas às formas procíclicas ou não-infectantes (Molyneux e Killick-Kendrick, 1987).

A transmissão da doença para os hospedeiros vertebrados geralmente ocorre por meio da inoculação das formas promastigotas infectantes durante a picada do inseto vetor. Após inoculação nos hospedeiros mamíferos, as promastigotas infectantes ligam-se aos macrófagos por meio de diversos receptores celulares, sendo subsequentemente fagocitadas, localizando-se em um vacúolo que se funde com lisossomas, denominado vacúolo parasitóforo (Russel e Talamas-Rohana, 1989; Maüel, 1990). Os parasitos sobrevivem à fagocitose e sofrem diversas transformações metabólicas sendo convertidos em formas amastigotas, que posteriormente multiplicam-se e rompem as células hospedeiras para então infectarem outras células mononucleares (Mauël, 1990).

A manifestação da doença depende de complexas interações entre fatores inerentes aos parasitos, tais como espécie e cepa e outros ligados ao hospedeiro, como resposta imune (Pearson e Sousa, 1996; Cardoso e Cabral, 1998) resultando em amplo espectro de manifestações clínicas. Uma única espécie de *Leishmania* pode ser responsável por mais de um quadro clínico enquanto um único quadro pode ser causado por mais de uma espécie de *Leishmania* (Pearson e Sousa, 1996).

Nas Américas, a leishmaniose no homem pode ser dividida em duas amplas categorias clínico-patológicas: a leishmaniose

tegumentar americana (LTA) e a leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar. A leishmaniose tegumentar americana possui grande variedade de formas as quais podem ser agrupadas da seguinte maneira: (1) leishmaniose cutânea, caracterizada por lesões localizadas na pele, as quais podem curar espontaneamente ou evoluir para lesões crônicas com cicatrizes desfigurantes; (2) leishmaniose mucocutânea, caracterizada por lesões ulcerativas e destrutivas das mucosas ou junções muco-cutâneas; (3) leishmaniose cutânea disseminada caracterizada múltiplas lesões papulares geralmente ulceradas, distribuídas por diferentes partes do tegumento; (4) leishmaniose cutânea difusa, forma menos comum de apresentação, caracterizada por lesões papulares ou nodulares, deformantes e graves, com ampla distribuição pela superfície corporal (Carvalho et al., 1994; Cardoso e Cabral, 1998; Oliveira-Neto, 2000). A forma visceral da doença é crônica e progressiva e afeta vários órgãos, incluindo o baço, o fígado, a medula óssea, os linfonodos e a pele (Cardoso e Cabral, 1998). Em cães infectados a doença manifesta-se principalmente sob a forma visceral, crônica e progressiva e, frequentemente, observam-se também lesões cutâneas (Alvar et al., 2004).

A leishmaniose visceral humana ou Calazar tem como agentes etiológicos as espécies *Leishmania donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo e *L. chagasi* no Novo Mundo (Cardoso e Cabral, 1998). Atualmente existe a tendência de considerar *L. infantum* e *L. chagasi* como uma única espécie, baseado nas observações de Maurício et al. (1999).

Várias espécies de canídeos (cães, raposas e chacais), marsupiais (gambás) e roedores foram incriminadas como reservatórios em regiões endêmicas (Cardoso e Cabral, 1998). Os cães desempenham papel fundamental para a manutenção da doença nas áreas endêmicas, particularmente urbanas, atuando

como principal reservatório doméstico e fonte de infecção para os flebotomíneos, com posterior transmissão para o homem (Deane, 1956; Iverson et al., 1983; Marzochi et al., 1985; Tesh, 1995).

1.3.1. Aspectos clínicos, bioquímicos e patológicos da infecção por *L. chagasi* e métodos de diagnóstico

Na espécie humana, a doença acomete principalmente crianças (Marzochi et al., 1994; Nascimento et al., 1996) e indivíduos imunossuprimidos (Badaró et al., 1986), sendo caracterizada clinicamente por febres irregulares de longa duração, debilidade geral, emagrecimento, pancitopenia, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, podendo progredir para um quadro crônico ou para a morte, caso não haja tratamento adequado (Alencar et al., 1991).

Em cães, a infecção resulta em manifestações clínicas diversas, variando desde infecções sub-clínicas até a forma crônica e progressiva da doença, ocorrendo febre irregular por longos períodos, perda progressiva de peso, caquexia (Genaro, 1993), anemia, hepatoesplenomegalia e linfadenomegalia generalizada (González et al., 1990; Genaro, 1993). Perda de peso e atrofia muscular são os sinais mais comuns de envolvimento visceral. Alguns cães podem perder peso apesar da manutenção ou mesmo da exacerbação do apetite. Entretanto, a perda acentuada de condição física está associada com anorexia e outros sinais de insuficiência renal, incluindo depressão, poliúria, polidipsia e vômitos (Longstaffe e Guy, 1985; Slappendel e Greene, 1990). Alguns animais podem apresentar o desenvolvimento de lesões oculares como ceratoconjuntivite e uveíte (Swenson et al., 1988; Molleda et al., 1993; Cardoso e Cabral, 1998; Peña et al., 2000; Brito et al., 2004) ou ainda panoftalmite (Carvalho-Neta et al., 2007).

Nos cães, sinais clínicos associados ao trato gastrointestinal, como vômito, diarreia e hemorragia intestinal, têm sido descritos com menor frequência na literatura (Slappendel, 1988; Slappendel e Greene, 1990; Pumarola et al., 1991).

As anormalidades dermatológicas nos cães são bastante comuns e variáveis quanto à caracterização e extensão. As alterações mais proeminentes são a hiperqueratose, caracterizada por espessamento excessivo da epiderme com descamação, despigmentação e formação de fissuras, principalmente nos coxins e no focinho e a descamação da pele, principalmente ao redor dos olhos, nas orelhas ou difusamente pelo corpo. Os pêlos podem apresentar-se opacos, frágeis e quebradiços sendo comum o surgimento de áreas de alopecia. Alguns animais podem desenvolver dermatite seborréica (Slappendel, 1988) e úlceras mucocutâneas (Slappendel, 1988; Slappendel e Greene, 1990). Onicogribose e onicorrexia são também observados com frequência (Slappendel, 1988; Slappendel e Greene, 1990; Cardoso e Cabral, 1998).

O período de incubação do calazar canino é muito variável, sendo que os sinais clínicos da doença podem tornar-se evidentes meses ou anos após o animal ter sido infectado (Slappendel, 1988; Genaro, 1993). Usualmente a infecção por *L. chagasi* manifesta-se sob a forma de uma doença crônica sistêmica (Slappendel e Greene, 1990; Ferrer et al., 1991).

A leishmaniose visceral canina determina resposta humoral policlonal que origina disproteinemia (Cardoso e Cabral, 1998), caracterizada por aumento das proteínas séricas totais, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia. A hiperglobulinemia é devida principalmente ao aumento dos níveis séricos das β e γ globulinas (Slappendel, 1988; Ciaramella et al., 1997). Redução marcante da concentração sérica do

aminoácido essencial triptofano têm sido observados em animais infectados experimentalmente. A explicação para esse achado pode ser competição por nutrientes entre o parasita e seu hospedeiro (Keenan et al., 1984a). Anemia do tipo normocítica normocrômica com intensidade variável tem sido observada com frequência (Keenan et al., 1984a; Ciaramella et al., 1997). No leucograma, pode ocorrer linfocitose com leucopenia moderadas a acentuadas (Keenan et al., 1984a). Entretanto, alguns animais podem apresentar linfopenia (Slappendel, 1988). Podem ocorrer ainda neutrofilia e trombocitopenia (Keenan et al., 1984a; Slappendel, 1988; Ciaramella et al., 1997). A urinálise pode revelar a ocorrência de proteinúria que, em combinação com a presença de hemácias, leucócitos e células epiteliais renais no sedimento urinário podem indicar nefrite ou glomerulonefrite. Elevação dos níveis séricos de creatinina podem ser observados em animais com uremia (Slappendel, 1988).

As lesões encontradas na leishmaniose visceral canina, com exceção das alterações cutâneas, são similares às descritas na doença humana (Keenan et al., 1984b). As alterações histopatológicas mais frequentemente descritas são observadas no baço, fígado, medula óssea, linfonodos, rins, pulmões, e tegumento (Genaro, 1993; Tafuri, 1995).

A esplenomegalia constitui uma alteração macroscópica bastante comum (Keenan et al., 1984b; Swenson et al., 1988). Entretanto, o baço nem sempre apresenta-se aumentado de volume. Microscopicamente este órgão pode apresentar decréscimo na população de linfócitos na bainha linfóide periarteriolar e acúmulo de macrófagos nestas áreas. Podem-se observar também hiperplasia dos folículos linfóides com aumento da população de plasmócitos e aumento da polpa vermelha, cuja celularidade mostra-se aumentada devido ao

acúmulo de macrófagos (Tryphonas et al., 1977; Keenan et al., 1984b; Tafuri, 1995).

O fígado geralmente apresenta aumento de volume e congestão (Tryphonas et al., 1977). Microscopicamente, pode-se notar hiperplasia e hipertrofia das células de Küpfer (Tryphonas et al., 1977; Keenan et al., 1984b; Oliveira et al., 1993; Tafuri et al., 1996) e infiltrado inflamatório do tipo linfóide-plasmocitário no parênquima hepático (Tryphonas et al., 1977). Uma outra alteração histopatológica importante é a presença de granulomas intralobulares, localizados principalmente no lúmen dos sinusóides e às vezes na luz das veias centrolobulares. Eles são constituídos predominantemente por macrófagos, parasitados ou não, células epitelióides, pequeno número de linfócitos e raros polimorfonucleares neutrófilos (Tafuri et al., 1996, Tafuri et al., 2001).

A medula óssea apresenta aumento da celularidade, que se deve primariamente à grande população de células da série monocítica presentes, algumas das quais podem apresentar-se parasitadas (Keenan et al., 1984b).

Os linfonodos apresentam-se frequentemente aumentados de volume com perilinfadenite (Tafuri, 1995). Microscopicamente observa-se hiperplasia dos folículos linfóides com aumento da população de plasmócitos, redução da população de linfócitos e acúmulo de macrófagos nas áreas paracorticais, cordões medulares e seios medulares (Keenan et al., 1984b; Lima et al., 2004). Macrófagos parasitados com amastigotas podem ser observados principalmente nas áreas paracorticais (Keenan et al., 1984b) e também nos seios e cordões medulares (Lima et al., 2004).

A leishmaniose visceral canina está frequentemente associada a glomerulonefrite membranoproliferativa (Tryphonas et al.,

1977; Swenson et al., 1988; Marcuseen et al., 1989; Tafuri et al., 1989; Font et al., 1993; Valadares et al., 1997, Tafuri et al., 2001), caracterizada por espessamento da cápsula de Bowman e da membrana basal dos capilares glomerulares (Tryphonas et al., 1977). Além de glomerulopatia, freqüentemente observa-se nefrite intersticial crônica com infiltração de linfócitos, plasmócitos e macrófagos, que podem estar parasitados (Marcuseen et al., 1989). Essas alterações eventualmente podem conduzir a um quadro de insuficiência renal (Font et al., 1993).

Nos pulmões, a principal alteração descrita é a pneumonia intersticial, com espessamento dos septos interalveolares e acúmulo de plasmócitos e macrófagos (Tryphonas et al., 1977; Anderson et al., 1980; Keenan et al., 1984b ; Duarte et al., 1986; Gonçalves, 2001; Tafuri et al., 2001; Gonçalves et al., 2003).

No trato gastrointestinal, observa-se reação inflamatória com infiltração predominantemente de macrófagos contendo amastigotas de *Leishmania*, principalmente no ceco e cólon (Silva, 2001).

As alterações patológicas do trato genital masculino foram descritas por Diniz et al. (2005) e incluem epididimite, balanopostite e menos frequentemente orquite, com infiltrado inflamatório composto por macrófagos, plasmócitos e linfócitos, associado à presença de *Leishmania*.

Na pele geralmente observa-se infiltrado linfo-plasmo-histiocitário difuso na derme superficial e em focos ao redor de vasos sangüíneos e anexos na derme profunda. Não raro pode-se observar a presença de formas amastigotas no interior de macrófagos (Deane, 1956; Xavier et al., 2006). Deane (1956) relatou a presença de amastigotas na pele de 77,6% de cães naturalmente infectados, enquanto Genaro (1993) verificou incidência de parasitismo

na pele em 70% dos animais experimentalmente infectados com *L. chagasi*. Recentemente, dos Santos et al. (2004) relatou parasitismo de cerca de 53% na pele de 55 cães com leishmaniose visceral.

O diagnóstico da leishmaniose visceral canina não difere essencialmente do diagnóstico da infecção na espécie humana e consiste na avaliação conjunta de parâmetros clínicos, bioquímicos, epidemiológicos e parasitológicos (Alvar et al., 2004). O diagnóstico parasitológico permite maior confiança, pois se baseia na observação direta do parasita (Deane e Deane, 1962; Longstaffe e Guy, 1985; Grimaldi Jr. e Tesh, 1993; Ferrer et al., 1995), podendo ser realizado à partir do exame direto de esfregaços ou cortes histológicos, inoculação em hamsters ou cultura *in vitro* de aspirados ou tecidos dos animais suspeitos (Grimaldi Jr. e Tesh, 1993).

A sorologia é o principal método empregado para os diagnósticos de rotina e levantamentos epidemiológicos da doença e baseia-se no fato da maioria dos animais infectados apresentam elevados títulos de anticorpos específicos na circulação (Marzochi et al., 1985; Slappendel, 1988). Dentre as principais técnicas sorológicas empregadas no diagnóstico do calazar canino destacam-se a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a reação de fixação do complemento (RFC) (Pellegrino e Brener, 1958). Tais testes utilizam como antígenos parasitos íntegros (promastigotas ou amastigotas) ou extratos solúveis de *Leishmania*. De maneira geral, os métodos que utilizam parasitos íntegros como antígenos apresentam elevada sensibilidade enquanto os métodos que utilizam extratos solúveis de parasitos apresentam especificidade superior (Alvar et al., 2004). Nos últimos anos, vários laboratórios têm desenvolvido antígenos recombinantes que possam ser utilizados nos testes sorológicos

convencionais com o objetivo de melhorar sua especificidade. Dentre esses, destaca-se o antígeno recombinante K39 (rK39), uma proteína dominante em amastigotas de *Leishmania* do Complexo *Donovani* (Reithinger et al., 2002). O rK39 também é a base dos testes imunocromatográficos rápidos, os quais vêm sendo recentemente utilizados como método de diagnóstico da infecção em cães (Reithinger et al., 2002; Tafuri et al., 2004).

Adicionalmente, procedimentos imunohistoquímicos têm sido utilizados para a detecção de amastigotas nos tecidos (Ferrer et al., 1991; Font et al., 1993; Silva, 2001; Tafuri et al., 2004; Diniz et al., 2005). Recentemente foi descrita a utilização de técnica de imunoperoxidase para marcação de amastigotas de *Leishmania* nos tecidos, à partir da utilização de soro hiperimune de cães infectados como anticorpo primário, que mostrou elevada sensibilidade e especificidade, sendo particularmente útil para a detecção de amastigotas de *Leishmania* em tecidos onde o parasitismo é pouco intenso (Tafuri et al., 2004).

Nos últimos anos tem sido crescente a utilização da PCR como ferramenta no

diagnóstico da infecção por *Leishmania*. Vários trabalhos têm demonstrado elevadas sensibilidade e especificidade deste procedimento para o diagnóstico da leishmaniose, além da superioridade dos resultados em relação aos obtidos por outros procedimentos diagnósticos tradicionais. A reação pode ser feita à partir de *primers* específicos para o DNA genômico ou DNA do cinetoplasto do parasito (kDNA), sendo que a utilização de *primers* específicos para o kDNA geralmente apresentam melhores resultados, uma vez que frequentemente utiliza-se o minicírculo do kDNA como alvo de amplificação, o que resulta em aumento significativo da sensibilidade, uma vez que existem múltiplas cópias desta seqüência no kDNA. Dentre as vantagens da PCR destaca-se a possibilidade de utilização em diversos tipos de amostras biológicas, inclusive aquelas obtidas à partir de métodos poucos invasivos, como o sangue (Lachaud et al., 2002). Esta técnica foi recentemente otimizada com sucesso para a detecção de kDNA de *Leishmania* em amostras de sêmen canino, apresentando sensibilidade de detecção de, no mínimo, um organismo por ml de sêmen (Diniz et al., 2005).

CAPÍTULO 2

Lesões genitais e distribuição de amastigotas em cadelas naturalmente infectadas por *Leishmania chagasi*

2.1. INTRODUÇÃO

2.1.1. Lesões genitais na leishmaniose visceral humana

Lesões genitais associadas à amastigotas de *Leishmania* têm sido mais frequentemente descritas em pacientes humanos, principalmente em indivíduos do sexo masculino. As lesões genitais já foram descritas tanto em pacientes com manifestação muco-cutânea quanto visceral da doença e incluem lesões crônicas destrutivas e ulcerativas no pênis, caracterizadas histologicamente por infiltrado inflamatório composto predominantemente por macrófagos, células gigantes, plasmócitos e linfócitos associadas à presença de formas amastigotas de *Leishmania* (Castro et al., 1987; Schubach et al., 1998; Cabello et al., 2002). Além das lesões penianas são descritas também lesões ulcerativas crônicas no prepúcio, caracterizadas microscopicamente por infiltrado inflamatório composto por linfócitos, plasmócitos, raros neutrófilos e macrófagos com numerosas formas amastigotas de *Leishmania* intracitoplasmáticas (Aste et al., 2002) e ulcerações no escroto, com as mesmas características histológicas (Cain et al., 1994; Cabello et al., 2002). Em alguns casos descreve-se processo inflamatório granulomatoso, inclusive com a presença de células gigantes (Cabello et al., 2002; Schubach et al., 1998). Há um relato na literatura que descreve a presença de amastigotas de *Leishmania* nos testículos de um jovem com leucemia linfoblástica aguda, sem lesões aparentes (Kapila et al., 1994).

Lesão na genitália feminina foi descrita por Symmers (1960), que relatou a ocorrência de uma lesão ulcerativa contendo macrófagos parasitados com *Leishmania* na vulva de uma mulher que contraiu a infecção por via venérea.

A transmissão venérea de *Leishmania* na espécie humana foi documentada em área livre da doença e do vetor, com transmissão da infecção de um homem infectado em área endêmica para sua esposa (Symmers et al., 1960).

2.1.2. Lesões genitais na leishmaniose visceral canina e eliminação de *Leishmania* sp no sêmen de cães

O envolvimento do trato genital na leishmaniose canina tem sido descrito com menor frequência. Diaz et al. (1982) descreveram as lesões testiculares e epididimárias em 15 cães com leishmaniose visceral infectados naturalmente e distribuídos em grupos conforme a intensidade da doença. Esses autores verificaram reação inflamatória intersticial composta por macrófagos, plasmócitos e linfócitos associada à presença de amastigotas intralesionais, sendo que as lesões mais graves foram observadas nos animais com doença clínica mais avançada. Além do infiltrado inflamatório foram observadas também alterações degenerativas nas células tubulares testiculares e epididimárias e fibrose intersticial.

Há na literatura um relato da presença de amastigotas de *Leishmania infantum* na glândula peniana de um cão com tumor venéreo transmissível (Catone et al., 2003)

Em estudo mais recente, Diniz et al. (2005) verificaram que cães naturalmente infectados por *Leishmania* apresentam frequentemente epididimite e balanopostite e, menos frequentemente, orquite. Orquite intersticial linfo-plasmocitária foi observada

associada à degeneração testicular discreta a intensa. Apesar de não ter sido encontrada diferença estatística significativa, observou-se que animais infectados têm maior tendência a apresentar orquite em relação aos animais controle e, além disso, os animais sintomáticos têm inflamação testicular mais intensa. Inflamação do epidídimo foi caracterizada por infiltrado inflamatório composto predominantemente por macrófagos e linfócitos. A frequência de epididimite foi maior entre os animais infectados e com doença clínica e, além disso, a intensidade de inflamação foi maior nos animais infectados sintomáticos e assintomáticos em relação aos animais não-infectados. Reação inflamatória com predomínio de macrófagos foi observada na glândula, com maior frequência e intensidade nos animais sintomáticos. Entre os animais infectados observou-se que grande número dos macrófagos infiltrados na glândula apresentavam amastigotas de *Leishmania* intracelulares, tendo sido observado macrófago parasitado entre as células do epitélio da uretra, indicando migração trans-epitelial. Postite histio-plasmocitária foi observada com maior frequência e intensidade entre os animais infectados em relação aos animais controle. Adicionalmente, observou-se ocorrência de dermatite granulomatosa com elevado número de macrófagos parasitados por *Leishmania* em alguns animais infectados, associada a erosões e ulcerações. Nesse mesmo trabalho verificou-se, por meio de estudo imuno-histoquímico, que a imunomarcagem de *Leishmania* no trato genital masculino correlacionou-se às alterações inflamatórias apresentadas.

Adicionalmente os autores verificaram que, de 22 cães naturalmente infectados, oito (36%) eliminaram *Leishmania* sp. no sêmen, sendo esta avaliação feita pela PCR à partir de uma única amostra de sêmen de cada cão avaliado. Esses dados dão suporte à hipótese de transmissão venérea da leishmaniose visceral em cães, à semelhança do que foi

previamente documentado em humanos (Symmers, 1960).

Amastigotas de *Leishmania* já foram previamente descritas no útero de uma cadela (Rosypal et al., 2005), com evidências de transmissão vertical da doença. A transmissão vertical da infecção em cães também foi sugerida por Masucci et al. (2003) e Dubey et al. (2005), embora tenham sido publicadas evidências indicando que a transmissão vertical não ocorre na espécie canina (Andrade et al., 2002). Placentite associada à presença de *Leishmania* já foi descrita em cães por Dubey et al. (2005)

Considerando-se a elevada frequência de lesões genitais e a eliminação de *Leishmania* no sêmen de cães com leishmaniose visceral (Diniz et al., 2005) e, conseqüentemente, o potencial para transmissão venérea da leishmaniose visceral canina, além da ausência de estudos sobre o parasitismo e lesões no trato genital de cadelas com leishmaniose visceral, os objetivos desse trabalho foram identificar e caracterizar as lesões presentes no trato genital de cadelas naturalmente infectadas por *Leishmania* e detectar a presença do parasito nesses órgãos por imuno-histoquímica e PCR.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Dez cadelas adultas não senis, sem raça definida, soropositivas para leishmaniose pelo método de ELISA, foram selecionadas no Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte – MG e divididas em dois grupos, segundo a manifestação clínica da doença: (i) cadelas assintomáticas (n=5) e (ii) cadelas sintomáticas (n=5). Cinco cadelas adultas sorologicamente negativas com a mesma procedência foram utilizadas como controle. Após a seleção, todos os animais foram imediatamente submetidos à anestesia geral com Thiopental sódico seguida de eutanásia com Cloreto de Potássio endovenoso e então

necropsiados, tendo sido colhidos fragmentos de todos os segmentos do trato genital (vulva, vagina, cérvix, corpo do útero, cornos uterinos, tubas uterinas e ovários), fígado e baço para histopatologia e imuno-histoquímica. Os fragmentos de ovários e tubas uterinas de cada lado foram processados conjuntamente. Após a colheita, o material foi fixado em formalina tamponada a 10% por 24 a 48 horas. Após a fixação, as amostras foram submetidas a processamento histológico de rotina e coradas por hematoxilina e eosina (HE), ou processados para imuno-deteção de amastigotas de acordo com a metodologia descrita por Tafuri et al. (2004), com a utilização de soro hiperimune de cão como anticorpo primário e sistema de deteção a base de estreptavidina-biotina-peroxidase disponível comercialmente (LSAB+ kit, Dako USA.) A marcação foi revelada com diaminobenzidina (DAB). (Apêndice A).

Fragmentos dos mesmos tecidos também foram coletados para extração de DNA pelo método de isotiocianato de guanidina (Pitcher et al, 1989). Os DNAs dos ovários e tubas uterinas de cada lado foram extraídos conjuntamente. Os fragmentos de ovários e tubas uterinas de cada lado foram processados conjuntamente. Para a deteção de DNA de *Leishmania* foram utilizados *primers* delineados para amplificação do minicírculo do kDNA (Lachaud et al., 2002). As seqüências dos *primers* utilizados foram as seguintes: 5'-CTTTTCTGGTCCC GCGGGTAGG-3' e 5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3'. As condições para a reação de PCR, como número de ciclos, temperatura de anelamento, concentração de Taq polimerase e Cloreto de Magnésio (MgCl₂) foram semelhantes aquelas previamente descritas por Lachaud et al. (2002). Os produtos da PCR foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose a 1%. Os mesmos tipos de

tecidos provenientes de animais naturalmente infectados por *L. chagasi* e positivos por imuno-histoquímica foram utilizados como controle positivo.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observadas lesões macroscópicas evidentes na genitália de nenhuma das cadelas. Em nenhum dos grupos foram observadas lesões microscópicas nos ovários, tubas uterinas, cornos uterinos, corpo do útero e cérvix. A alteração histopatológica mais freqüente foi uma reação inflamatória cutânea na vulva, de intensidade variável e caracterizada por infiltrado histio-plasmo-lymfocitário, principalmente ao redor de folículos pilosos e de glândulas sebáceas e sudoríparas (Fig. 1). Essa alteração foi observada em todas as cadelas assintomáticas, em quatro sintomáticas e em três animais do grupo controle, com intensidade variável. Em uma cadela assintomática e outra sintomática foi possível a observação de formas amastigotas do parasito no citoplasma de macrófagos infiltrados na derme da vulva em secções coradas por HE (Fig. 1) com posterior confirmação pela imuno-histoquímica (Fig. 2). Imunomarcção de amastigotas foi detectada apenas nesses dois animais. Na cadela assintomática observou-se imunomarcção de amastigotas também na mucosa vaginal, em associação com infiltrado inflamatório multifocal discreto composto por macrófagos, plasmócitos e alguns linfócitos. Não foram detectadas amastigotas pela imuno-histoquímica no útero, tubas uterinas e ovários das cadelas infectadas. Imunomarcção foi observada nos fragmentos de fígado e baço das infectadas. Todos os órgãos das cadelas não infectadas foram negativos pela técnica imuno-histoquímica, incluindo fígado e baço.

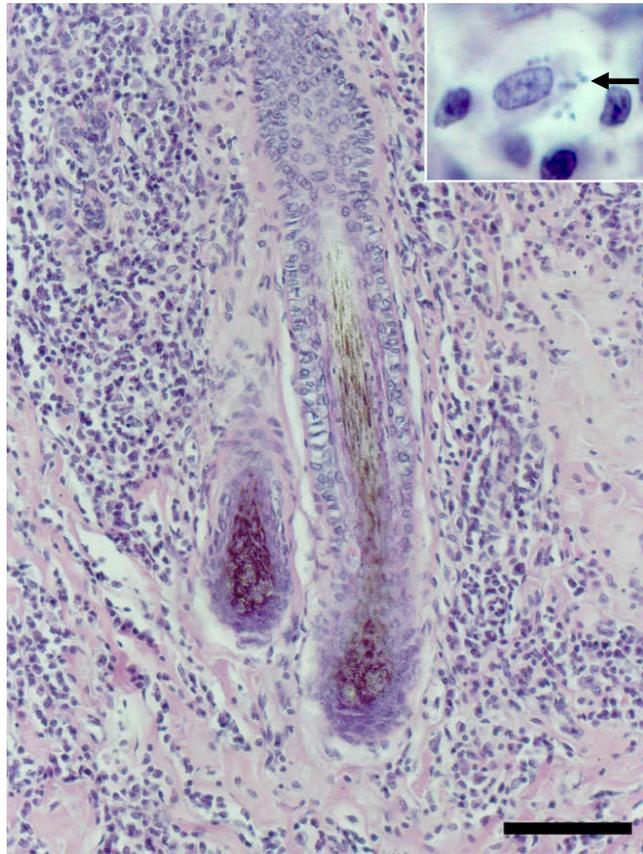


Figura 1. Vulva; cadela assintomática. Infiltrado inflamatório na derme predominantemente perifolicular. HE. Barra = 400 μ m. Detalhe: macrófago parasitado com amastigotas de *Leishmania* intracitoplásmicas (seta).

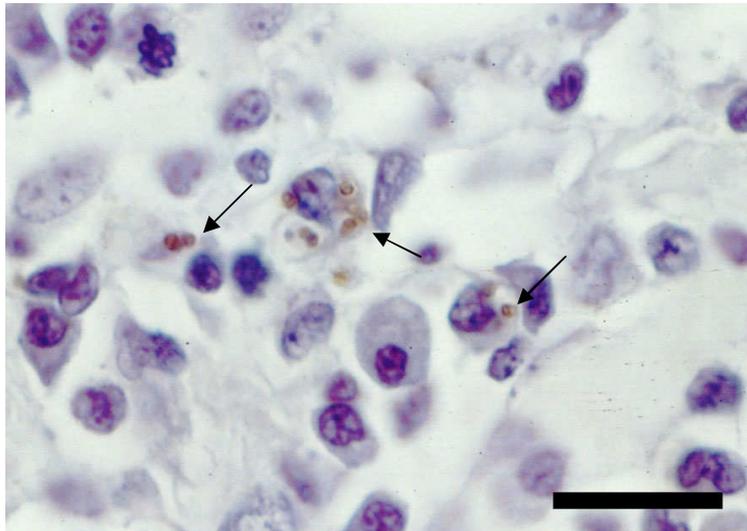


Figura 2. Vulva; cadela assintomática. Imunomarcção de amastigotas de *Leishmania* sp no citoplasma de macrófagos (setas). Complexo estreptavidina-peroxidase. Barra: 20 μ m.

O fato de ter sido observado infiltrado inflamatório com as mesmas características na vulva de cadelas infectadas e não infectadas, com detecção de *Leishmania* pela IHQ nesse tecido em apenas duas cadelas infectadas (2/10), sugere tratar-se de uma alteração inflamatória inespecífica, ou seja, o processo inflamatório nesse caso não foi desencadeado necessariamente pela *Leishmania*. A exposição constante da genitália externa ao ambiente torna esse segmento do trato genital altamente susceptível a inflamações inespecíficas e, portanto, macrófagos parasitados com *Leishmania* poderiam eventualmente ser atraídos para focos com inflamação prévia. Esta observação contrasta com as lesões no trato genital masculino de cães com leishmaniose visceral, que apresentam maior frequência de epididimite, indicando predisposição deste órgão para o desenvolvimento de inflamação associada com amastigotas de *Leishmania* sp. (Diniz et al., 2005).

Todas as cadelas infectadas apresentaram resultado positivo pela PCR em pelo menos

uma das amostras de tecido do sistema genital. Além disso, todos os segmentos do sistema genital, tanto de cadelas assintomáticas quanto sintomáticas, foram positivos em pelo menos um animal em cada grupo, como mostrado na Tabela 1. Todas as cadelas do grupo controle não infectado foram negativas em todas as reações de PCR, incluindo baço e fígado. A Fig. 3 apresenta resultados representativos de uma PCR em amostras de uma cadela sintomática. Os resultados apresentados na Tabela 1 indicam que os segmentos da genitália externa apresentaram maior frequência de resultados positivos, tendo a PCR detectado a presença de *Leishmania* na vulva de 89% (8/9) e na vagina de 70% (7/10) das cadelas estudadas, enquanto os demais segmentos do trato genital tiveram 40 a 60% de resultados positivos. Todas as cadelas infectadas tiveram resultados positivos pela PCR nas amostras de baço e/ou fígado.

Tabela 1. Resultados da PCR para detecção de *Leishmania* (Complexo *Donovani*) no sistema genital de cadelas naturalmente infectadas.

	Grupos / animais *									
	Assintomáticos					Sintomáticos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Ovário/tuba uterina direita	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
Ovário/tuba uterina esquerda	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
Corno uterino direito	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
Corno uterino esquerdo	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Corpo do útero	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Cérvix	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
Vagina	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Vulva	+	+	+	-	ND	+	+	+	+	+

* +, positivo; -, negativo

ND = amostra não-testada

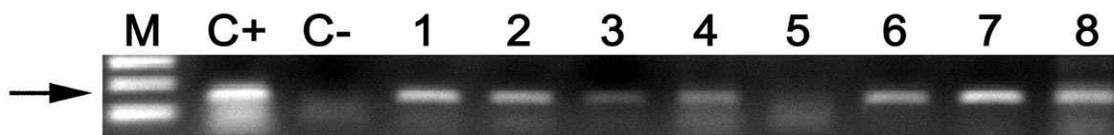


Figura 3. Resultado representativo da PCR para detecção de DNA de *Leishmania* (Complexo Donovanii) em amostras de genitália de cadela naturalmente infectada e sintomática. M = marcador de peso molecular; C+ = controle positivo (produto com 145 bp); C- = controle negativo; 1 = ovário e tuba direita; 2 = ovário e tuba esquerda; 3 = corno uterino direito; 4 = corno uterino esquerdo; 5 = corpo do útero; 6 = cérvix; 7 = vagina; 8 = vulva.

A detecção de DNA de *Leishmania* na genitália interna e a ausência de alterações microscópicas evidentes nesses segmentos indicam que a presença do parasito não está relacionada ao desencadeamento de reação inflamatória nesses tecidos. Além disso, a detecção de DNA de *Leishmania* e a ausência de imunodeteção de amastigotas indicam uma carga parasitária muito baixa nesses tecidos, já que o protocolo de PCR utilizado nesse estudo é extremamente sensível (Lachaud et al., 2002). Estima-se que o limite de detecção desse protocolo de PCR seja de 0,0001 amastigotas (equivalente parasitário) por reação (Lachaud et al., 2002). Esse nível de sensibilidade pode resultar na detecção de DNA de *Leishmania* mesmo se o parasito estiver restrito ao sangue circulante nesses segmentos da genitália interna, o que é uma hipótese válida já que os leucócitos do sangue periférico estão dentre as amostras de escolha para extração de DNA e PCR nos casos de leishmaniose visceral (Lachaud et al., 2002).

Cabe salientar que as observações feitas em cães por Diniz et al. (2005) indicam elevado parasitismo associado à inflamação dos epidídimos e prepúcio e em menor extensão nos testículos de animais naturalmente infectados por *L. chagasi*, com grande

número de amastigotas de *Leishmania* no citoplasma de macrófagos.

Analisados em conjunto, os resultados do presente estudo juntamente com aqueles obtidos anteriormente por Diniz et al. (2005) são consistentes com os relatos de envolvimento genital nos casos de leishmaniose humana, que em sua grande maioria envolvem o sistema genital masculino (Schubach et al., 1998; Aste et al., 2002; Cabello et al., 2002). Além disso, *L. chagasi* parece não possuir tropismo pelo trato genital feminino, em oposição às observações feitas em cães naturalmente infectados (Diniz et al., 2005).

2.4. CONCLUSÃO

Amastigotas de *Leishmania* foram observadas somente na vulva e vagina de cadelas com leishmaniose visceral, embora o processo inflamatório observado na vulva e vagina tenha intensidade e distribuição semelhantes em cadelas naturalmente infectadas e controles. Embora o kDNA de *Leishmania* tenha sido detectado por PCR na genitália interna, não foram evidenciadas amastigotas ou lesões associadas a leishmaniose visceral nestes segmentos do trato genital.

CAPÍTULO 3

Transmissão venérea da leishmaniose visceral canina

3.1. INTRODUÇÃO

Existem algumas protozooses de transmissão venérea descritas entre os animais domésticos, destacando-se a tricomoníase bovina, causada pelo *Tritrichomonas foetus* e a durina, doença de eqüídeos causada pelo *Trypanosoma equiperdum*. Adicionalmente, vários trabalhos recentes descrevem a eliminação de *Neospora caninum* no sêmen de touros infectados (Ortega-Mora et al., 2003; Caetano-da-Silva et al., 2004; Ferre et al., 2005; Serrano-Martínez et al., 2007). Entretanto, a transmissão por contato sexual nos casos de neosporose em bovinos ainda permanece como uma possibilidade a ser investigada. Da mesma forma, há relatos na literatura que demonstram a eliminação de *Toxoplasma gondii* no sêmen de caprinos (Dubey e Sharma, 1980) e ovinos (Teale et al., 1982). Recentemente, foi relatada a ocorrência de transmissão de *T. gondii* pelo sêmen em coelhos (Liu et al., 2006).

A transmissão da leishmaniose visceral geralmente ocorre na presença do vetor invertebrado (*Lutzomyia longipalpis*), embora existam casos de transmissão na ausência do vetor na espécie humana (Low et al., 1926; Otero et al., 2000; Bosch et al., 2002) e canina (Owens et al., 2001; Giger et al., 2002; Macucci et al., 2003; Dubey et al., 2005; Rosypal et al., 2005; De Freitas et al., 2006). A transmissão venérea da leishmaniose já foi comprovada em humanos. Em 1960, Symmers descreveu a ocorrência de transmissão de *Leishmania donovani* entre um homem infectado e sua esposa, em região livre da doença e do vetor. Segundo o autor, o homem teria adquirido a infecção numa região endêmica enquanto viajava a trabalho, tendo sido submetido a

tratamento após logo após o diagnóstico da doença. Um ano após a cura, o paciente manifestou leishmaniose dérmica pós-calazar e foi então submetido a novo tratamento, com completa remissão dos sintomas. Aproximadamente dez anos mais tarde, sua esposa, que sempre viveu em área livre da doença e do vetor, apresentou uma lesão nodular e ulcerada na vulva em associação com amastigotas de *Leishmania*. Nas condições descritas, o autor considera o contato sexual como a única possibilidade de transmissão da infecção.

Foi demonstrado que cães com leishmaniose visceral apresentaram lesões genitais e eliminam *Leishmania* no sêmen (Riera et al., 1996; Diniz et al., 2005). Entretanto, até o momento não existem estudos sobre a possibilidade de transmissão sexual da infecção por *Leishmania* em cães. Por este motivo e devido à grande importância da leishmaniose visceral canina em nosso meio, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ocorrência de transmissão venérea da leishmaniose visceral.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental utilizado nessa parte do trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFGM) (protocolo nº 006/03). Treze cães sabidamente soropositivos para *Leishmania* foram selecionados no Centro de Controle de Zoonoses de Ribeirão das Neves e de Contagem na região metropolitana de Belo Horizonte. Estes cães foram mantidos em canis completamente vedados do meio exterior por tela fina (tela P inox 304 F32 x M40) e pulverizados com Cipermetrina (Barrage, Fort Dodge) na proporção de 20 ml para cada 20 litros de água. Os canis eram localizados no infectório do departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFGM. A confirmação do diagnóstico foi feita a partir da realização de ELISA e RIFI, no Laboratório de

Leishmanioses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. Os cães foram então submetidos a colheitas de sêmen, por manipulação digital, para detecção do kDNA de *L. chagasi* por PCR.. Foi feita colheita seriada do sêmen desses animais, com intervalo de 1 a 12 dias, a fim de estabelecer se a eliminação de *Leishmania* ocorre de forma contínua ou intermitente. O procedimento para amplificação de kDNA de *Leishmania* sp. foi previamente descrito (Diniz et al., 2005) (Apêndice B). Para cada reação, utilizou-se como controle positivo o produto obtido a partir da PCR de amostra de DNA extraída de sêmen e/ou tecidos de cães que sabidamente continham o DNA de *Leishmania*. Da mesma forma, para cada reação utilizou-se como controle negativo o produto obtido pela PCR sem acréscimo de DNA.

Dez cadelas sorologicamente negativas foram obtidas junto ao serviço de controle de zoonoses do município de Juiz de Fora ou no município de Ibertioga, Minas Gerais, consideradas regiões não endêmicas para leishmaniose visceral canina. Após transporte até a Escola de Veterinária da UFMG, as cadelas foram mantidas em quarentena em ambiente tratado com inseticida com uso de coleiras impregnadas com deltametrina (Scalibor, Intervet) nas mesmas condições de isolamento descritas acima para os cães, porém em área totalmente separada deles, em sala equipada com armadilha para flebotomíneos (HP Biomédica) funcionando permanentemente durante todo o período experimental. Durante o período de quarentena as cadelas foram sorologicamente testadas por duas vezes com intervalo de 15 dias e receberam tratamento anti-helmíntico e vacinação contra raiva, cinomose, parvovirose, coronavirose, hepatite infecciosa, leptospirose e parainfluenza. Adicionalmente, para garantir que as cadelas eram realmente livres da infecção, foi feito PCR a partir de amostras de DNA extraídas

de sangue total, papa de leucócitos e medula óssea para detecção de kDNA de *Leishmania* (Diniz et al., 2005) (Apêndice B). As cadelas foram então submetidas a um procedimento cirúrgico para ligadura da extremidade cranial de ambos cornos uterinos para prevenção de prenhez. Após a recuperação cirúrgica, as cadelas foram observadas quanto à manifestação natural de estro ou submetidas a indução do estro, utilizando-se implantes subcutâneos de deslorelina de liberação lenta na concentração de 1,05 mg/animal (Ovuplant, Peptech Animal Health) (Volkman et al., 2004).

Durante os períodos de estro os cães eram conduzidos diariamente até o ambiente das fêmeas e, então, era permitido o contato entre os animais. Cada uma das cadelas foi acasalada naturalmente com os cães soropositivos disponíveis durante todo o período de estro. Após as cópulas, as cadelas foram mantidas em ambiente controlado, alojadas individualmente, na ausência do vetor por 165 dias para colheita de sangue e exames sorológicos intervalados de 15 dias, que incluíram imunofluorescência indireta e ELISA para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*. Os exames sorológicos foram todos realizados no Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. Uma cadela sentinela, submetida aos mesmos procedimentos experimentais, inclusive indução de cio, e mantida na mesma sala das demais cadelas, não foi acasalada e permaneceu no ambiente experimental durante 11 meses com colheita de amostras de soro a cada 15 dias para exame sorológico.

Após o final do período de avaliação sorológica (165 dias), as cadelas foram anestesiadas com Thiopental sódico e submetidas à eutanásia com dose letal de Cloreto de Potássio endovenoso, para colheita de amostras para histopatologia e

imuno-histoquímica. Foram obtidos fragmentos da vagina, da parede uterina (do endométrio até o perimétrio) de ambos os cornos e do corpo do útero, da tuba uterina, dos ovários, baço, fígado, e de todos linfonodos visíveis na carcaça, que foram fixados em formalina tamponada a 10% para processamento histológico.

Cortes montados em lâminas tratadas com silane ou gelatina biológica foram processadas para imuno-deteção de amastigotas, conforme descrito previamente por Tafuri et al., 2004. Soro hiperimune de cão foi utilizado como anticorpo primário, seguido de deteção a base de estreptavidina-biotina-peroxidase disponível comercialmente (LSAB+ kit, Dako USA). A marcação foi revelada com diaminobenzidina (DAB). (Apêndice A).

3.3. RESULTADOS

Onze dos 13 cães infectados examinados para eliminação de *Leishmania* no sêmen foram positivos pelo método de PCR (Tabela 1). Dentre os cães que apresentaram resultados positivos pela PCR para deteção de DNA de *Leishmania* no sêmen, verificou-se que a deteção foi intermitente, aleatória e não contínua (Figura 1). As amostras de sêmen obtidas por manipulação digital tiveram volume variável (entre 0,4 a 15 ml) e apresentavam-se transparentes ou leitosas, dependendo do animal considerado e da coleta. Durante o período de cópulas foram utilizados ao todo sete dos 11 cães com resultados positivos pela PCR para deteção de DNA de *Leishmania* no sêmen. À medida que os cães apresentavam evolução da doença e/ou desinteresse sexual pelas fêmeas, eles foram submetidos à eutanásia e substituídos pelos demais que também eliminavam *Leishmania* sp no sêmen. Os cães 2 e 6 não foram utilizados nas cópulas devido às condições clínicas ruins; os cães 10 e 11 não foram utilizados devido ao desinteresse sexual pelas fêmeas.

Tabela 2. Resultados da PCR para detecção de kDNA de *Leishmania* no sêmen dos cães testados

Cães	Amostras de sêmen			Utilização nas cópulas
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	
1	-	-	-	não
2	+	-	-	não
3	+	-	-	sim
4	+	-	+	sim
5	+	+	+	sim
6	+	-	-	não
7	-	-	+	sim
8	+	-	+	sim
9	+	-	-	sim
10	+	-	-	não
11	+	+	+	não
12	-	+	-	sim
13	-	-	-	não

** +, positivo; -, negativo

** O número de colheitas de sêmen variou de 1 a 12 mas foram consideradas apenas as três primeiras amostras de cada cão para efeito comparativo.



Figura 4. Resultado representativo da PCR para detecção de DNA de *Leishmania* (Complexo Donovanii) em amostras de sêmen de dois cães naturalmente infectados. M = marcador de peso molecular; C+ = controle positivo (145bp); C- = controle negativo; 1^o - 3^o = ordem de coletas.

Todas as cadelas selecionadas apresentaram sorologias negativas e resultados negativos na PCR para detecção de kDNA de *Leishmania* sp. no sangue, papa de leucócitos e medula óssea antes das cópulas, ao final do período de quarentena.

Das dez cadelas utilizadas, quatro apresentaram manifestação de estro natural enquanto seis tiveram o estro induzido com deslorelina. A detecção do estro foi feita à partir da observação de edema de vulva,

corrimento sanguinolento, aceitação do macho e citologia vaginal. As cadelas submetidas ao tratamento com deslorelina manifestaram sinais de estro em um período variável de 8 a 27 dias. As cadelas foram colocadas na presença dos cães durante todo o período de estro sendo permitidas cópulas com mais de um cão num mesmo dia. A Tabela 2 mostra o número total de cópulas para cada fêmea e o número de diferentes cães com o qual cada fêmea copulou

Tabela 3. Número de cópulas e identificação dos cães que copularam para cadela

Cadelas	Cães que copularam	Número de cópulas
1	3, 4 e 5	13
2	3, 4 e 5	11
3	3 e 5	08
4	3, 4 e 5	26
5	5, 7 e 8	17
6	5 e 7	12
7	5 e 9	12
8	12	5
10	9	5
11	5 e 9	4

Durante o período de diestro, após as cópulas, quatro cadelas (2, 4, 10 e 11) apresentaram quadro clínico de piometra, tendo sido submetidas a tratamento conservativo à base de prostaglandina natural, antibióticos (Quemacetina) e fluidoterapia. Adicionalmente, a cadela 11 apresentou quadro de prolapso vaginal após colocação do implante subcutâneo de deslorelina.

Apenas duas cadelas apresentaram soroconversão durante o período experimental. A cadela 3 apresentou

resultados de Elisa e RIFI (1/40) positivos 138 dias após a data da última cópula. Da mesma forma, a cadela 4 também apresentou resultados de Elisa e RIFI (1/40) positivos na amostra de soro coletada no dia da eutanásia (165 dias após a data da última cópula). A cadela 3 teve estro induzido com desrorelina enquanto a cadela 4 teve manifestação natural de estro.

As principais alterações macroscópicas observadas durante as necropsias das cadelas estão representadas na Tabela 4.

Tabela 4. Principais alterações macroscópicas observadas durante as necropsias das cadelas.

Cadelas	Principais alterações macroscópicas à necropsia
1	Aumento de volume discreto dos linfonodos cervicais superficiais, retrofaríngeo direito, bronquial e mesentéricos. Congestão de linfonodos mesentéricos. Baço com bordas irregulares e hiperplasia de polpa branca.
2	Útero discretamente distendido com hiperplasia endometrial cística/piometra
3	Aumento discreto de volume dos linfonodos cervicais superficiais, inguinais, ilíacos internos e retrofaríngeo direito. Linfonodo ilíaco interno direito hemorrágico. Esplenomegalia discreta.
4	Aumento discreto a moderado de volume dos linfonodos cervicais superficiais, axilares, retrofaríngeos e submandibular esquerdo. Esplenomegalia discreta com hiperplasia de polpa branca. Hiperplasia endometrial cística.
5	Hiperemia endometrial intensa e difusa
6	Sem alterações macroscópicas
7	Sem alterações macroscópicas
8	Esplenomegalia moderada, congestão esplênica. Aumento discreto de volume dos linfonodos poplíteos. Áreas multifocais de coloração amarelada no fígado. Espessamento da parede da vesícula biliar.
10	Aumento discreto de volume dos linfonodos poplíteos e linfonodos retrofaríngeos. Esplenomegalia discreta com hiperplasia de polpa branca. Tumor venéreo transmissível no assoalho da vagina.
11	Sem alterações macroscópicas
Sentinela	Sem alterações macroscópicas

As principais alterações microscópicas observadas nas secções de tecidos das diferentes cadelas coradas em HE estão citadas abaixo:

Cadela 1: Infiltrado inflamatório histio-linfocitário discreto e multifocal na vulva, predominantemente peri-glandular e perifolicular. Os demais órgãos não apresentaram lesões microscópicas evidentes.

Cadela 2: Infiltrado inflamatório histio-linfocitário discreto e multifocal na vulva, predominantemente peri-glandular perifolicular. Infiltrado inflamatório plasmohistio-linfocitário discreto a moderado subepitelial na mucosa vaginal, com distribuição difusa. Nos cornos uterinos, corpo do útero e cérvix observaram-se infiltrado inflamatório moderado a intenso na lâmina própria composto predominantemente por plasmócitos, linfócitos e neutrófilos e alguns macrófagos. No útero observou-se hiperplasia cística das glândulas endometriais. Havia degeneração hepática discreta, hepatite neutrofílica discreta e multifocal e acúmulo discreto de macrófagos na região medular de linfonodo mesentérico.

Cadela 3: Infiltrado inflamatório discreto, multifocal na vulva, composto por macrófagos, linfócitos e alguns neutrófilos, predominantemente peri-glandular e perifolicular. Infiltrado inflamatório discreto a moderado, predominantemente histio-linfocitário, peri-vascular na camada muscular dos cornos uterinos. Degeneração hepática discreta, hepatite multifocal histio-linfocitária discreta. Hiperplasia linfóide no baço, congestão moderada dos seios esplênicos. Hiperplasia linfóide nos linfonodos inguinal esquerdo, mesentérico e bronquial.

Cadela 4: Nos cornos e corpo do útero havia infiltrado inflamatório moderado na lâmina

própria, predominantemente plasmolinfocitário, com neutrófilos ocasionais. Vacuolização hepatocelular difusa discreta, hepatite linfocitária discreta multifocal. Hiperplasia linfóide no linfonodo mesentérico.

Cadela 5: Infiltrado inflamatório discreto, multifocal na vulva, com distribuição periglandular e perifolicular predominantemente histio-plasmolinfocitário com alguns neutrófilos ocasionais. Congestão endometrial difusa moderada a intensa com áreas multifocais de hemorragias. Hemorragia multifocal na medular dos linfonodos ilíacos internos e mesentérico. Hiperplasia linfóide nos linfonodos submandibular esquerdo, axilar direito, cervical superficial direito e inguinal esquerdo. Acúmulo de macrófagos na região medular dos linfonodos bronquial e submandibular esquerdo.

Cadela 6: Infiltrado inflamatório histio-linfocitário discreto, multifocal na vulva, predominantemente peri-glandular e perifolicular. Vacuolização hepatocelular difusa discreta, com congestão hepática moderada e hepatite plasmohistio-linfocitária com alguns neutrófilos ocasionais, multifocal, moderada, com distribuição predominantemente peri-portal. Hemorragia moderada e difusa na região medular dos linfonodos ilíacos internos.

Cadela 7: Hemorragia endometrial superficial multifocal moderada. Vacuolização hepatocelular difusa moderada, com hemorragia multifocal discreta e hepatite linfocitária focal.

Cadela 8: Infiltrado inflamatório histio-linfocitário discreto, multifocal na vulva, predominantemente peri-glandular. Vacuolização hepatocelular difusa moderada a intensa; hepatite granulomatosa parasitária multifocal; hepatite neutrofílica multifocal moderada. Edema de submucosa da vesícula

biliar. Hiperplasia linfóide nos linfonodos submandibulares, axilar esquerdo, cervical superficial direito, retrofaríngeos, mesentéricos e poplíteos. Linfadenite neutrofílica multifocal discreta a moderada nos linfonodos axilar esquerdo, cervical superficial direito e poplíteos. Acúmulo de grande quantidade de macrófagos na região medular dos linfonodos poplíteo direito e mesentéricos, associado a eritrofagocitose. Hemorragias multifocais de intensidade moderada na região medular do linfonodo ilíaco interno direito.

Cadela 10: Tumor venéreo transmissível vaginal. Hiperplasia linfóide discreta no baço. Vacuolização hepatocelular difusa discreta a moderada difusa, com congestão moderada e hemorragia multifocal e hepatite linfocitária multifocal discreta. Hiperplasia linfóide nos linfonodos submandibular direito, retrofaríngeo direito, bronquial, mesentérico e poplíteo esquerdo. Acúmulo de macrófagos na medular dos linfonodos mesentérico e poplíteo esquerdo.

Cadela 11: Hemorragia endometrial superficial e difusa. Vacuolização hepatocelular difusa moderada, com congestão moderada, hemorragia multifocal e hepatite neutrofílica multifocal discreta. Hiperplasia linfóide no baço, com congestão moderada. Hiperplasia linfóide no linfonodo mesentérico. Hemorragia multifocal nos seios medulares do linfonodo mesentérico associada à eritrofagocitose e hiperplasia e hipertrofia discreta de macrófagos.

Cadela sentinela: Infiltrado inflamatório histio-linfocitário discreto com alguns plasmócitos ocasionais, multifocal na vulva, predominantemente peri-glandular e perifolicular. Vacuolização hepatocelular difusa moderada; hepatite multifocal discreta histio-linfocitária. Hemorragias multifocais de intensidade discreta a moderada na região medular dos linfonodos cervical superficial direito, ilíacos internos e poplíteo esquerdo associadas a acúmulo de hemossiderina.

Hiperplasia linfóide nos linfonodos submandibular e cervical superficial direitos.

Nas secções histológicas coradas em HE de nenhuma das cadelas foram observadas estruturas compatíveis com amastigotas de *Leishmania*. Da mesma forma, não se observou imunomarcagem nos tecidos examinados.

3.4. DISCUSSÃO

A soroconversão em duas das 10 cadelas estudadas demonstra pela primeira vez, a transmissão venérea de *Leishmania* sp. na espécie canina. Embora não reste dúvida de que a transmissão da doença através de seu vetor biológico (*Lutzomyia longipalpis*) seja a forma de transmissão mais importante, vias alternativas de transmissão na ausência do vetor podem ter papel relevante na disseminação da doença e devem ser consideradas na elaboração das estratégias de controle. Nesse caso em especial, medidas de controle devem priorizar o controle ainda mais rigoroso da população de cães errantes visto que um cão infectado pode copular com várias cadelas nas ruas, além de oferecer risco de transmissão pela infecção de flebotomíneos. Outra medida de controle a ser considerada é a não utilização de cães infectados para reprodução.

Embora tenha ocorrido soroconversão em duas cadelas, as alterações macroscópicas e microscópicas observadas no trato genital, fígado, baço e linfonodos das cadelas provavelmente se tratam de alterações inespecíficas não relacionadas à doença, visto que não foram observadas amastigotas de *Leishmania* associadas.

O período de incubação da leishmaniose visceral pode variar de dois a três meses até anos (Alvar et al., 2004), o que justifica a ausência de sinais clínicos e lesões nas duas cadelas que apresentaram soroconversão. Além disso, como se trata de uma via de transmissão que até então não tinha sido

mostrada na espécie canina, ainda não é conhecida sua eficiência, bem como o período de incubação após infecção venérea.

A grande variação do número total de cópulas entre as diferentes cadelas (4 a 26) foi devida à variação fisiológica do período de aceitação da cadela, pela disponibilidade de cães para cópulas e também pela preferência de alguns cães por determinadas cadelas.

A detecção de DNA de *Leishmania* no sêmen de 11 dos 13 cães testados (84,6%) foi bem mais freqüente quando comparada aos resultados obtidos por Diniz et al. (2005), que encontraram apenas 36% de resultados positivos. Essa diferença entre os dois resultados pode ser atribuída ao fato do presente trabalho ter avaliado mais de uma amostra de sêmen por animal, ao contrário de Diniz et al. (2005) que avaliaram apenas amostras de um único ejaculado de cada animal. A detecção intermitente de DNA de *Leishmania* no sêmen dos cães testados indica que a eliminação do parasito é intermitente, para amostras de sêmen coletadas por manipulação digital.

No presente estudo não foi possível estabelecer se a transmissão da doença ocorreu pelo contato do trato genital das cadelas com sêmen contaminado ou pela transferência de amastigotas originadas da genitália externa do macho durante o momento da cópula. Conforme observado por Diniz et al. (2005), cães com leishmaniose visceral frequentemente apresentam balanopostite com erosões ou ulcerações em associação com amastigotas no interior de macrófagos, o que favoreceria a transferência de amastigotas durante o ato sexual, sabidamente traumático na espécie canina. Estudos futuros envolvendo o uso de inseminação artificial com sêmen de animais infectados poderiam ajudar a elucidar essa questão.

3.5. CONCLUSÕES

- Cães com leishmaniose visceral apresentam elevada freqüência de eliminação de *Leishmania* sp. no sêmen artificialmente obtido e essa eliminação é intermitente e aleatória.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, J. E.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (Calazar). In: VERONISI, R. *Doenças infecciosas e parasitárias*. 8. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, p. 706-717.
- ALVAR, J., CANAVATE, C., MOLINA, R., MORENO, J., NIETO, J. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.*, v. 57, p. 1-88, 2004.
- ANDERSON, D. C., BUCKNER, R. G., GLENN, B. L., MACVEAN, D. W. Endemic canine leishmaniasis. *Vet. Pathol.*, v. 17, p. 94-96, 1980.
- ANDRADE, H. M., TOLEDO, V. P. C. P., MARQUES, M. J., SILVA, J. C. F., TAFURI, W. L., MAYRINK, W., GENARO, O. *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. *Vet. Parasitol.*, v.103, p.71-81, 2002.
- ARIAS, J.R.; MONTEIRO, P.S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v.2, n.2, p.145-46, 1996.
- ASHFORD, D. A.; DAVID, J. R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOK, I.; EULÁLIO, M. C.; SAMPAIO, D. P.; BADARÓ, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am. J. Trop. Med., Hyg.*, v.59, n.1, p.53-57, 1998.
- ASTE, N.; PAU, M.; ASTE, N.; BIGGIO, P. Leishmaniasis of the prepuce. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, v. 16, p. 93-94, 2002.
- BADARÓ, R., CARVALHO, E. M., ROCHA, H., QUEIROZ, A. C., JONES, T. C. *Leishmania donovani*: an opportunistic microbe associated with progressive disease in three immunocompromised patients. *Lancet*, v. 22, n. 1, p. 647-649, 1986.
- 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.
- BRITO, F. L. C.; ALVES, L. C.; ORTIZ, J. P. D. et al. Uveíte associada à infecção por *Leishmania chagasi* em cão na cidade de Olinda, Pernambuco, Brasil. *Ciênc. Rural*, v.34, n.3, p.925-29, 2004.
- CABELLO, I.; CARABALLO, A.; MILLÁN, Y. Leishmaniasis in the genital area. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.44, n.2, p.105-107, 2002.
- CAETANO-DA-SILVA, A., FERRE, I., COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., NAVARRO, V., ADURIZ, G., GARAGALZA-UGARTE, C., ORTEGA-MORA, L. M. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. *Theriogenology*, v.62, n.7, p.1329-1336, 2004.
- CAIN, C.; STONE, M. S.; THIEBERG, M.; WILSON, M. E. Nonhealing genital ulcers. *Arch. Dermatol.*, v.130, n.10, p.1311-1316, 1994.
- CALDAS, A.J.M.; COSTA, J.M.L.; SILVA, A.A.M. et al. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.96, p.21-28, 2002.
- CARDOSO, L., CABRAL, M. *Leishmania* e Leishmaniose canina. *Rev. Port. Ciênc. Vet.*, n. 527, p. 121-141, 1998.

- CARVALHO, E. M., BARRAL, A., COSTA, J. M., BITTENCOURT, A., MARSDEN, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.*, v. 56, n. 4, p. 315-325, 1994.
- CARVALHO-NETA, A. V., PAIXÃO, T. A., SILVA, F. L., SANTOS, R. L. Pan-oftalmite em cão com leishmaniose visceral: relato de caso. *Clínica Veterinária*, n. 66, p. 52-56, 2007.
- CASTRO, C. A.; HIDALGO, H. H.; SOLANO, A. E.; COTO, C. F. Leishmaniasis of the genital organs. *Med. Cutan Ibero Lat. Am.*, v. 15, p. 145-150, 1987.
- CATONE, G., MARINO, G., POGLAYEN, G., GRAMICCIA, M., LUDOVISI, A., ZANGHI, A. Canine transmissible venereal tumor parasitized by *Leishmania infantum*. *Vet. Res. Commun.*, v.27, p.549-553, 2003.
- CHANG, K. P. *Leishmania donovani*: Promastigote-macrophage surface interactions in vitro. *Exp. Parasitol.*, v.48, p. 175-189, 1979.
- CHANG, K. P. Modern Biology: Cell Biology of *Leishmania*. 2.ed. New York: Farman and Company, 1990. p. 79-89.
- CIARAMELLA, P., OLIVA, G., LUNA, R., D., GRADONI, L., AMBROSIO, R., CORTESE, L., SCALONE, A., PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. Rec.*, v. 22, n. 141, p. 539-543, 1997.
- DEANE, L. M. Epidemiologia e profilaxia do Calazar Americano. *Rev. Bras. Malariol. Doencas Trop.*, v.10, p.431-449, 1956.
- DEANE, L. M., DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil. Geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, n. 4, p. 149-212, 1962.
- DE FREITAS, E., MELO, M. N., DA COSTA VAL, A. P., MICHALICK, M. S. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet. Parasitol.*, v. 137, n. 1-2, p. 159-167, 2006.
- DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.95, p.239-43, 2001.
- 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, Soraia de Araújo. Lesões genitais associadas com Leishmaniose visceral e identificação de *Leishmania* sp no sêmen de cães naturalmente infectados. 2005, 39p. Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 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.
- DOS SANTOS, W. L., DAVID, J., BADARÓ, R., DE FREITAS, L. A. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. *Parasitol. Res.*, v. 92, n. 2, p. 89-94, 2004.
- DUARTE, M. I. S., LAURENTI, M. D., BRANDÃO NUNES, V. L., REGO JÚNIOR, A. F., OSHIRO, E. T.,

- CORBETT, C. E. Interstitial pneumonitis in canine visceral leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.28, n.6, p.431-436, 1986.
- DUBEY, J. P., ROSYPAL, A. C., PIERCE, V., SCHEINBERG, S. N., LINDSAY, D. S. Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.227, n.8, p.1266-1269, 2005.
- DUBEY, J. P., SHARMA, S. P. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. *Am. J. Vet. Res.*, v. 41, n. 5, p.794-795, 1980.
- FERRE, I., ADURIZ, G., DEL-POZO, I., REGIDOR-CERRILLO, J., ATXAERANDIO, R., COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., HURTADO, A., UGARTE-GARAGALZA, C., ORTEGA-MORA, L. M. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls, *Theriogenology*, v. 63, n. 5, p.1504-1518, 2005.
- FERRER, L., JUANOLA, B., RAMOS, J. A., RAMIS, A. Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. *Vet Pathol.*, v. 28, p. 342-343, 1991.
- FERRER, L., AISA, M. J., ROURA, X., PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet. Rec.*, v. 20, n. 136, p. 514-516, 1995.
- FONT, A., CLOSA, J. M., MOLINA, A., MASCORT, J. Thrombosis and nephrotic syndrome in a dog with visceral leishmaniasis. *J. Small Anim. Pract.*, v. 34, p. 466-470, 1993.
- FUNDAÇÃO NACIONAL da SAÚDE/CENTRO NACIONAL de EPIDEMIOLOGIA. Leishmaniose Visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. *Bol. Epidemiol.*, v.6, p.1-11, 2002.
- GASKIN, A. A., SCHANTZ, P., JACKSON, J., BIRKENHEUR, A., TOMLINSON, L., GRAMICCIA, M., LEVY, M., STEURER, F., KOOLMAR, E., HEGARTY, B. C., AHN, A., BREITSCHWERDT, E. B. Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. *J. Vet. Intern. Med.*, v.16, p. 34-44, 2002.
- GENARO, Odair. Leishmaniose visceral canina experimental. 1993, 220p. Tese, Doutorado em Parasitologia – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- GIGER, U.; OAKLEY, D. A.; OWENS, S. D.SCHANTZ, P. *Leishmania donovani* transmission by packed RBC transfusion to anemic dogs in the United States. *Transfusion*, v. 42, p. 381-382, 2002.
- GONÇALVES, Ricardo. Estudo histopatológico, imunocitoquímico, e morfométrico da pneumonite intersticial crônica em cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. 2001, 68p. Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- GONÇALVES, R., TAFURI, W. L., MELO, M. N., RASO, P., TAFURI, W. L. Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: a histopathological and morphometric study. *Rev. Inst. Med.Trop. São Paulo*, v. 45, n. 3, p. 153-158, 2003.
- GONZÁLEZ, J. L.; FERMIN, M L.; GARCIA, P., ROLLAN, F., CASTAÑO, M. Erosive colitis in experimental canine leishmaniasis. *J. Vet. Med. B*, v.37, p. 377-382, 1990.
- GRIMALDI JR, G., TESH, R. B. Leishmaniases of the New World: current concepts and implications for the future

- research. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.
- GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S. L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M. K.; BRYCESON, A. D. M. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis and treatment, and proposed research and development agenda. *Lancet*, v. 2, p. 494-501, 2002.
- HANDMAN, E., BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.*, v.18, n.8, p.332-334, 2002.
- HARRIS, M. P. Suspected transmission of leishmaniasis. *Vet. Rec.*, v.135, p.339, 1994.
- IVERSON, L. B., CAMARGO, M. E., VILLANOVA, A., REICHMANN, M. L. A. B., ANDRADE, E. A., TOLEZANO, J. E. Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina-urbana do município de São Paulo-Brasil (1979-1982). *Rev. Inst. Med.trop. São Paulo*, v. 25, p. 310-317, 1983.
- KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.*, v.22, n.9, p. 439-445, 2006.
- KAPILA, K., PRAKASH, M. B., MEHROTA, R., VERMAR, K. Testicular leishmaniasis in a boy with acute lymphoblastic leukemia. *Acta Cytol.*, v.38, n.5, p.878-879, 1994.
- KEENAN, C. M., HENDRICKS, L. D., LIGHTNER, L., JOHNSON, A. J. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II. Pathology. *Vet. Pathol.*, 21, p. 80-86, 1984b.
- KEENAN, C. M., HENDRICKS, L. D., LIGHTNER, L., WEBSTER, H. K., JOHNSON, A. J. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Vet. Pathol.*, 21, p. 74-79, 1984a.
- LACHAUD, L., MARCHERGUI-HAMMAMI, S., CHABBERT, E., DEREURE, J., DEDET, J. P., BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002.
- LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S.; MELO, M. N. et al. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop.*, v. 92, n.1, p.43-53, 2004.
- LIU, S. G., QUIN, C., YAO, Z. J., WANG, D. Study on the transmission of *Toxoplasma gondii* by semen in rabbits. *Chinese J. Parasitol Parasitic Dis.*, v.24, n.3, p.166-170, 2006.
- LONGSTAFFE, J. A., GUY, M. W. Leishmaniasis in dogs. *Vet. Ann.*, v. 25, p. 358-367, 1985.
- LOW, G. C., EDIN, M. D., LOND, F. R. C. P., COOKE, W. E., IREL, F. R. C. S. A congenital case of Kala-azar. *Lancet*, v. 11, n. 2, p.1209-1211, 1926.
- MARCUSEEN, N., VETNER, M., KRISTENSEN, H. M. Interstitial nephritis and glomerulonephritis in visceral leishmaniasis in a dog. *APMIS*, v.97, n. 12, p.1137-1140, 1989.
- MARGONARI, C., FREITAS, C. R., RIBEIRO, R. C., MOURA, A. C., TIMBÓ, M., GRIPP, A. H., PESSANHA, J. A., DIAS, E. S. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas

- Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 1, p. 31-38, 2006.
- MARSELLA, R., GOPEGUI, R. R. Leishmaniasis: a re-emerging zoonosis. *Int. J. Dermatol.*, v.37, p.801-814, 1998.
- MARZOCHI, M. C. A., COUTINHO, S. G., DE SOUZA, W. J., DE TOLEDO, L. M., GRIMALDI JÚNIOR, G., MOMEM, H., PACHECO RDA, S., SABROZA, P. C., DE SOUZA, M. A., RANGEL JÚNIOR, F. B. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 80, n.1, p. 17-22, 1985.
- MARZOCHI, M. C. A., MARZOCHI, K. B. F., CARVALHO, R., W. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Parasitol. Today*, v. 10, n. 1, 1994.
- MASUCCI, M., DE MAJO, M., CONTARINO, R. B., BORRUTO, G., VITALE, F., PENNISI, M. G. Canine leishmaniasis in the newborn puppy. *Vet. Res. Commun.*, v.27, Suppl.1, p.771-774, 2003.
- MAÜEL, J. Macrophage-parasite interactions in *Leishmania* infections. *J. Leukoc. Biol.*, v. 47, p. 187-193, 1990.
- MAURÍCIO, I. L., HOWARD, M. K., STOTHARD, J. L., MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitol.*, v. 119, p. 237-246, 1999.
- MOLLEDA, J. M., NOVALES, M., GINEL, P. J., FERNANDEZ, A., LÓPEZ, R. Clinical and histopathological study of the eye in canine leishmaniasis. *Israel J. Vet. Med.*, v. 48, p. 173-178, 1993.
- MOLLYNEUX, D.H.; KILLICK-KENDRICK, R. *The Leishmaniasis in biology and medicine: Morphology, ultrastructure and life cycles*. London: Academic Press Inc., 1987. p. 122-168.
- NASCIMENTO, M. D. S. B., COSTA, J. M. L., FIORI, B. I. P., VIANA, G. M. C., FILHO, M. S., ALVIM, A. C., BASTOS, O. C., NAKATANI, M., REED, S., BADARÓ, R., SILVA, A. R., BURATTINI, M. N. Aspectos epidemiológicos determinantes na manutenção da leishmaniose visceral no estado do Maranhão-Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 29, n. 3, p. 233-240, 1996.
- OLIVEIRA, C. L., ASSUNÇÃO, R. M., REIS, I. A., PROIETTI, F. A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. *Cad. Saúde Pública*, v.17, p.1231-1237, 2001.
- OLIVEIRA, G. G. S., SANTORO, F., SADIGURSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*, v.88, n.2, p.243-248, 1993.
- OLIVEIRA-NETO, M. P, MATTOS, M. S, PEREZ, M. A, DA-CRUZ, A. M, FERNANDES, O., MOREIRA, J., GONÇALVES-COSTA, S. C., BRAHIN, L. R, MENEZES, C. R, PIRMEZ, C. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int J Dermat*, v. 39, p.506-514, 2000.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (WHO), *Leishmaniasis* Disponível em: <<http://www.who.int/in/>> Acesso em: 11 set. 2007.
- ORTEGA-MORA, L. M., FERRE, I., DELPOZO, I., CAETANO-DA-SILVA, A.,

- COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., REGIDOR-CERRILO, J., GARAGALZA-UGARTE, C., ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. *Vet. Parasitol.*, v.117, n.4, p. 301-308, 2003.
- OTERO, A. C. S.; SILVA, V. O.; LUZ, K. G.; PALATINIK, M.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; SOUZA, C. P. Occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive brazilian blood donors. *Am. J. Trop. Med., Hyg.*, v. 62, n. 1, p. 128-131, 2000.
- 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.
- PEARSON, R. D., SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.*, v. 22, p. 1-13, 1996.
- PELLEGRINO, J., BRENER, Z. Reação de fixação de complemento com sangue dessecado no diagnóstico do calazar canino. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop. Publ. Avulsas*, v. 10, p. 39-44, 1958.
- PEÑA, M. T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M. G.; Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Vet. Ophthalmol.*, v.3, n.1, p.35-39, 2000.
- PITCHER, D. G., SAUNDERS, N. A., OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Let. Appl. Microbiol.*, v. 8, p. 151-156, 1989.
- PUMAROLA, M., BREVIK, L., BADIOLA, J., VARGAS, A., DOMINGO, M., FERRER, L. Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *J. Comp. Path.*, v. 105, p. 279-286, 1991.
- REITHINGER, R., QUINNELL, R. J., ALEXANDER, B., DAVIES, C. R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n. 7, p. 2352-2356, 2002.
- RIERA, C., VALLADARES, J. E. Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. *Parasitol. Today*, v.12, n.10, p.412, 1996.
- ROSYPAL, A. C., TROY, G. C., ZAJAC, A. M., FRANK, G., LINDSAY, D. S. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in a experimentally infected beagle. *J. Parasitol.*, v.91, n.4, p.970-972, 2005.
- RUSSELL, D. G., TALAMAS-ROHANA, P. *Leishmania* and macrophage: a marriage of inconvenience. *Immunol. Today*, v. 10, n. 10, p. 328-333, 1989.
- SCHUBACH, A.; CUZZI-MAYA, T.; GONÇALVES-COSTA, S. C.; PIRMEZ, C.; OLIVEIRA-NETO, M. P. Leishmaniasis of glans penis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, v.10, n.3, p.226-228, 1998.
- SERRANO-MARTÍNEZ, E., FERRE, I., MARTÍNEZ, A., OSORO, K., MATEOS-SANZ, A., DEL-POZO, I., ADURIZ, G., TAMARGO, C., HIDALGO, C., ORTEGA-MORA, L. M. Experimental neosporosis in bulls: parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. *Theriogenology*, v.67, n.6 p.1175-1184, 2007.
- SILVA, A.V.M.; PAULA, A.A.; CABRERA, M.A.A., CARREIRA, J.C.A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos

epidemiológicos. *Cad. Saúde Pública*. v.21, n.1, p.324-328, 2005.

SILVA, E. S., GONTIJO, C. M. F., PACHECO, R. S., FIUZA, V. O. P., BRAZIL, R. P. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.96, n.3, p.285-291, 2001.

SILVA, Fabiana Lessa. Estudo histopatológico e imuno-histoquímico do trato gastrointestinal de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* de duas regiões geográficas distintas. 2001, 41p. Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis. *Vet. Q.*, v. 10, n. 1, p. 1-16, jan.1988.

SLAPPENDEL, R. J., GREENE, C. E. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. Filadélfia: W. B. Saunders Company, 1990. p 769-777.

SWENSON, C. L., SILVERMAN, J., STROMBERG, P. C. Visceral leishmaniasis in an english foxhound from an Ohio research colony. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 193, n. 9, p. 1089-1092, 1988.

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

TAFURI, Wagner Luiz. Leishmaniose visceral em cães natural e experimentalmente infectados: histopatologia e estudo imunocitoquímico dos receptores do tipo 3 (CR3 - CD11b/D18) e 4 (CR4 - CD11c/CD18) do complemento e dos antígenos de histocompatibilidade da

classe II no fígado e órgãos linfóides. 1995, 207p. Tese, Doutorado em Ciências - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

TAFURI, W. L., MICHALICK, M. S. M., DIAS, M., GENARO, O., LEITE, V. H. R., BARBOSA, A. J. A., BAMBIRRA, E. A., COSTA, C. A., MELO, M. N., MAYRINK, W. Estudo ao microscópio óptico e eletrônico, do rim de cães natural e experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 31, p. 139-145, 1989.

TAFURI, W. L., OLIVEIRA, M. R., MELO, M. N., TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 96, p. 203-212, 2001.

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 paraffin-embedded canine tissues. *J. Immunol. Methods*, v. 292, p. 17-23, 2004.

TAFURI, W. L., TAFURI, W. L., BARBOSA, A. J., MICHALICK, M. S., GENARO, O., FRANÇA-SILVA, J. C., MAYRINK, W., NASCIMENTO, E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 38, n. 2, p. 81-89, 1996.

TEALE, A. J., BLEWETT, D. A., MILLER, J. K. Experimentally induced toxoplasmosis in young rams: the clinical syndrome and

semen secretion of *Toxoplasma*. *Vet. Rec.*, v.111, n.3, p.53-55, 1982.

TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: Is time to change strategies? *Am. J. Trop. Hyg.*, v. 52, p. 287-292, 1995.

TRYPHONAS, L., ZAWIDZKA, Z., BERNARD, M. A., JANZEN, E. A. Visceral leishmaniasis in a dog: Clinical, hematological and pathological observations. *Can. J. Comp. Med.*, v.41, p.1-12, 1977.

VASSÍLIOS, J. K. Old World canine leishmaniasis. *Compend. Cont. Ed. Pract. Vet.*, v.15, p.941-949, 1993.

VOLKMANN, D. H., KUTZLER, M. A., WHEELER, R., KREKELER, N. The use of deslorelin implants for the synchronization of estrus in diestrous bitches. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, 5, 2004, São Paulo. *Proceedings...* São Paulo: Theriogenology, 2004, p.52-54.

XAVIER, S. C., ANDRADE, H. M., MONTE, S. J. H., CHIARELLI, I. M., LIMA, W. G., MICHALICK, M. S. M., TAFURI, W. L., TAFURI, W. L. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet. Res.*, n 8, 2:17, 2006.

APÊNDICE A

Protocolo da técnica de imuno-deteção de *Leishmania* nos tecidos

A técnica imuno-histoquímica utilizada foi previamente descrita por Tafuri et. (2004), conforme descrito abaixo.

Etapas da técnica:

- (1) as lâminas foram inicialmente hidratadas em soluções de álcoois decrescentes, e a seguir, submetidas aos banhos em PBS (“*Phosphate Buffer Saline*”) 0,01 M pH 7,2;
- (2) bloqueio da peroxidase endógena foi feito adicionando-se ao banho de PBS o peróxido de hidrogênio 30 vv a 4% (30 minutos a temperatura ambiente);
- (3) bloqueio de reações inespecíficas (relacionadas ao anticorpo secundário) por meio de incubação com leite em pó integral diluído em água (0,259 gramas de leite em pó para cada 10 ml de água) em câmara úmida por 30 minutos a temperatura ambiente;
- (4) incubação com soro de cão naturalmente infectado com *Leishmania (Leishmania) chagasi* 1:100 em quantidade suficiente para recobrir os fragmentos, sendo as lâminas incubadas por 18 a 22 horas em câmara úmida a 4°C;
- (5) lavagem com PBS e incubação com anticorpo secundário de cabra anti-camundongo e anti-coelho biotinilado da DAKO (Antibody KIT: 85 plus 86 – LSAB2 R/M Sys/HRP-110 ml) e incubação em câmara úmida por 30 minutos a temperatura ambiente;
- (6) lavagem em PBS e incubação com estreptavidina-peroxidase (DAKO) por

30 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente;

(7) revelação da peroxidase com solução de diaminobenzidina (DAB) a 0,024% e 0,16% de peróxido de hidrogênio 40vv 10 minutos à temperatura ambiente;

(8) lavagem das lâminas em água corrente e contracoloração com hematoxilina de Harris por três segundos;

(9) lavagem, desidratação em álcoois crescentes, diafanização em xilol, e montagem com bálsamo do Canadá.

Os controles positivos foram feitos utilizando-se uma lâmina com corte histológico de baço ou fígado de um cão naturalmente infectado e sabidamente com alto parasitismo, quando observado ao microscópio óptico na coloração pela HE.

APÊNDICE B

Protocolo da reação PCR para deteção de DNA de *Leishmania* no sêmen de cães, sangue total, papa de leucócitos, medula óssea e tecidos das cadelas

As amostras de sêmen dos cães, obtidas por meio de estimulação manual, foram processadas para extração do DNA pela digestão do sêmen em tampão FE (100 mM tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, Sarcosyl 20%, proteinase K (20 mg/ml), DTT (154 mg/ml), seguida de extração pelo fenol-clorofórmio. O DNA foi precipitado em isopropanol a -20°C, lavado em etanol 70% e ressuspendido em água livre de nucleases. As amostras de tecidos das cadelas foram processadas para extração de DNA pelo método do isotiocianato de

guanidina, segundo descrito por Pitcher et al. (1989). A PCR para detecção do DNA de *L. chagasi* foi feita conforme metodologia previamente descrita (Lachaud et al., 2002). Um µg de DNA foi adicionado a 15,6 µl de uma solução contendo 5,1 µl de tampão 10x, 5,1 µl de solução de dNTP 200 µM, 0,2 µM do primer A (5'-CTTTTCTGGTCCC GCGGGTAGG-3'), 0,2 µM do primer B (5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3'), 3 mM de MgCl₂ e 1,5 U de Taq-polimerase. Para amplificação foram empregados os seguintes parâmetros: desnaturação (94°C por 4 minutos.), seguido por 49 ciclos de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (59°C por 30 segundos), extensão (72°C por 30 segundos) e um passo final de extensão (72°C por 10 minutos). Os produtos de PCR (145 bp) foram resolvidos em gel de agarose 1% a 100v durante 50 min., conforme descrito por Lachaud et al. (2002) e visualizados em transiluminador ultravioleta.