

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

VIVIANE CARDOSO BOECHAT

**OCORRÊNCIA DE *Leishmania infantum* E
ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS ASSOCIADAS NO
TRATO GENITAL E GLÂNDULA MAMÁRIA DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS**

Rio de Janeiro

2015

**Ocorrência de *Leishmania infantum* e alterações
histológicas associadas no trato genital e glândula
mamária de cães naturalmente infectados**

VIVIANE CARDOSO BOECHAT

Dissertação apresentada ao curso
de pós-graduação em Pesquisa
Clínica em Doenças Infecciosas do
Instituto Nacional de Infectologia
Evandro Chagas para obtenção do
grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Rodrigo Caldas
Menezes

Rio de Janeiro

2015

VIVIANE CARDOSO BOECHAT

**Ocorrência de *Leishmania infantum* e alterações
histológicas associadas no trato genital e glândula
mamária de cães naturalmente infectados**

Dissertação apresentada ao
curso de pós-graduação em
Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas do Instituto Nacional
de Infectologia Evandro Chagas
para obtenção do grau de Mestre
em Ciências.

Orientador: Dr. Rodrigo Caldas Menezes

Aprovada em 24/02/2015

BANCA EXAMINADORA

Maria de Fátima Madeira (Presidente)

Doutora em Ciências

Laboratório de Vigilância em Leishmanioses/INI-FIOCRUZ

Patricia Riddell Millar Goulart

Doutora em Higiene Veterinária e Processamento em Produtos de Origem Animal

Departamento de Microbiologia e Parasitologia/Instituto Biomédico-UFF

Leonardo Pereira Quintella

Doutor em Ciências

Serviço de Anatomia Patológica/INI-FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me presentear com a alegria da vida, me fortalecer diante das dificuldades e me capacitar para alcançar mais essa etapa de estudo.

Aos meus pais, que me criaram, dando todo o amor e carinho, não medindo esforços para que eu tivesse uma boa educação. Agradeço por todo apoio, incentivo e conselhos na tomada de minhas decisões.

Aos meus avós, tios e primos que sempre tiveram uma palavra amiga nos momentos difíceis e por se alegrarem em cada conquista minha.

Ao meu namorado, Raphael Rocha, sempre presente em cada momento bom ou ruim, me presenteando com seu carinho, atenção, conselhos e incentivo.

Ao meu orientador, Rodrigo Menezes, que desde quando ingressei na Fiocruz como aluna de iniciação científica, sempre esteve disponível a me ajudar e ensinar o que fosse necessário. Ações estas, que permaneceram ao longo desses dois anos de mestrado, os quais sou muito grata. Agradeço por me receber como aluna e confiar no meu desempenho profissional.

À Dra. Maria de Fátima Madeira, pela disponibilidade e pelo fundamental acompanhamento, correções e sugestões em cada etapa do estudo.

À Dra. Luciana Casartelli, minha “mãe científica”, com a qual tive a satisfação de trabalhar durante seu projeto de doutorado como aluna de iniciação científica, me acolhendo como uma filha.

A toda equipe do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos pela amizade e apoio de sempre.

Aos técnicos Luiz Cláudio Ferreira e Francisco Rodrigues, pela fundamental colaboração e apoio durante a execução das técnicas histológicas.

À agência de fomento a pesquisa, FAPERJ, pelo financiamento do projeto de pesquisa pelo Programa Jovem Cientista do Nosso Estado (processo E-26/102.247/2013) e pela concessão da bolsa de mestrado (Bolsa Nota 10, processo E-26/101.549/2014) no ano de 2014 e a Fiocruz pela bolsa concedida no ano de 2013.

Aos funcionários da secretaria do curso de pós-graduação pela atenção e ajuda para solucionar qualquer problema.

A todos, que contribuíram indiretamente para a realização desse estudo, me ajudando de alguma forma a chegar nessa etapa acadêmica. Muito Obrigada!

“Entregue o seu caminho ao Senhor, confie nele, e ele agirá.”

Salmos 37:5

Boechat V. C. **Ocorrência de *Leishmania infantum* e alterações histológicas associadas no trato genital e glândula mamária de cães naturalmente infectados.** Rio de Janeiro, 2015, 78 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) causada pelo protozoário *Leishmania infantum* é uma zoonose, de ampla distribuição mundial. O cão doméstico é a principal fonte de infecção para o flebotomíneo, sendo o fator de risco mais importante para infecção humana. A transmissão geralmente ocorre pela picada de flebotomíneos infectados, porém a transmissão por via vertical e por transfusão sanguínea já foi comprovada em cães, sendo a transmissão venérea potencial nesses animais. Recentemente, iniciou-se uma epidemia de LV em cães e humanos no município de Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro. Entretanto, não se sabe se além da transmissão vetorial, outras formas de transmissão possam estar ocorrendo, como a venérea e/ou vertical, o que poderia estar contribuindo para o elevado número de casos caninos nesse município. Portanto, os objetivos desse estudo foram verificar a ocorrência de *L. infantum* no trato genital e glândula mamária feminina, avaliar a carga parasitária e identificar as lesões associadas a esse protozoário em cães naturalmente infectados. Com essa finalidade, foi utilizada uma amostra de conveniência de 40 cães, 20 machos e 20 fêmeas não castrados, provenientes do município de Barra Mansa, soropositivos para *Leishmania* e com isolamento de *L. infantum*. Amostras teciduais de órgãos do trato genital e glândula mamária foram fixadas em formol a 10% e depois processadas para emblocamento em parafina. Cortes histológicos com cerca de 5 μm foram processados pelas técnicas de imuno-histoquímica, histopatologia e hibridização *in situ*. O líquido seminal foi aspirado por meio de seringa e agulha estéreis de ambos os epidídimos e submetidos à cultura parasitológica. No trato genital, 34 (85%) cães, 18 machos e 16 fêmeas, foram positivos para *Leishmania* em pelo menos uma das técnicas de diagnóstico utilizadas. Foi isolado *L. infantum* pela primeira vez no líquido seminal e útero de cães naturalmente infectados. A carga parasitária e a intensidade da reação inflamatória nos machos foi mais intensa no prepúcio e glândula e nas fêmeas, na vulva. Além da inflamação, foi observado no testículo degeneração, atrofia, ausência de espermatogênese e necrose. Mamite esteve presente em todas as cadelas e foi descrito pela primeira vez a presença de formas amastigotas na glândula mamária, as quais também foram observadas no interior de macrófagos dos seios lactíferos, indicando a possibilidade de eliminação pelo leite. O elevado envolvimento do trato genital de cães com LV sugere a possibilidade de transmissão venérea bidirecional e também vertical na área estudada.

Palavras-chave: 1. Trato genital. 2. Glândula mamária 3. *Leishmania infantum*. 4. Cães. 5. Transmissão venérea. 6. Imuno-histoquímica. 7. Histopatologia. 8. Hibridização *in situ*.

Boechat V C. Occurrence of *Leishmania infantum* and associated histological changes in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs.

Rio de Janeiro, 2015, 78 f. Master [Science dissertation in Clinic Research in Infectious Diseases]- Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) caused by *Leishmania infantum* is a zoonosis of worldwide distribution. The domestic dog is the main source of infection for the sandfly, being the most important risk factor for human infection. Transmission usually occurs through the bite of infected sandflies, but the vertical transmission and transmission via blood transfusion has been proven in dogs, with the venereal transmission being potential in these animals. Recently, began a LV epidemic in dogs and humans in Barra Mansa, Rio de Janeiro State. However, it is unclear whether in addition to vector transmission, other forms of transmission may be occurring, such as venereal and / or vertical, which could contribute to the high number of canine cases in this municipality. Therefore, the objectives of this study were to verify the occurrence of *L. infantum* in the genital tract and female mammary gland, evaluate the parasite load and identify the lesions associated with this protozoa in naturally infected dogs. For this purpose, a convenience sample was used of 40 dogs was used, 20 males and 20 females unneutered from the Barra Mansa, which were seropositive by *Leishmania* and with isolation of *L. infantum*. Tissue samples of genital tract organs and mammary gland were fixed in 10% formalin and then processed for paraffin embedding. Histological sections with about 5µm were processed by immunohistochemical, histopathology and *in situ* hybridization techniques. The seminal fluid was aspirated through sterile syringe and needle from both epididymis and submitted to parasitological culture. In the genital tract 34 (85%) dogs, 18 males and 16 females, were positive by *Leishmania* in at least one of diagnostic techniques. *L. infantum* was isolated for the first time in the seminal fluid and uterus of naturally infected dogs. The parasite load and the intensity of the inflammatory reaction in males was more intense in the prepuce and gland and females, the vulva. In addition to inflammation, in testis was observed degeneration, atrophy, absence of spermatogenesis and necrosis. Mastitis was present in all dogs and was first described the presence of amastigotes in the mammary gland, which were also observed within macrophages of lactiferous sinus, indicating the possibility of eliminating the milk. The high involvement of the genital tract of dogs with LV suggests the possibility of bidirectional and also vertical venereal transmission in this area.

Keywords: 1. Genital Tract. 2. Mammary gland. 3. *Leishmania infantum*. 4. Dogs. 5. Venereal transmission. 6. Immunohistochemical. 7. Histopathology. 8. *In situ* hybridization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma das etapas da metodologia. Classificação clínica dos cães com *Leishmania*, órgãos coletados e as respectivas técnicas de diagnóstico utilizadas.....21

Figura 2- (A-D) Hibridização *in situ* em caninos infectados por *L. infantum*, apresentando formas amastigotas no interstício do testículo (A), no endométrio (B) e no interstício do epidídimo (C,D).....27

Figura 3- Órgãos genitais caninos com carga parasitária intensa; A- Glândula, apresentando formas amastigotas de *Leishmania* marcadas em castanho no interior de macrófagos na lâmina própria da uretra; B- Vulva, apresentando formas amastigotas de *Leishmania* marcadas em castanho no interior de macrófagos na derme. Imuno-histoquímica.....30

Figura 4- (A-B) Achados histológicos em cães infectados por *L. infantum*; A- Orquite, apresentando infiltrado inflamatório intersticial, difuso e intenso; B- Orquite granulomatosa com presença de linfócitos, plasmócitos e formas amastigotas (seta) no citoplasma de macrófagos; (A,B) Coloração Hematoxilina-eosina.....32

Figura 5- A- Epididimite, apresentando foco inflamatório intersticial acentuado, coloração Hematoxilina-eosina; B- Formas amastigotas

(setas) marcadas em castanho no interior de citoplasma de macrófagos, Imuno-histoquímica.....33

Figura 6- A- Balanite, apresentando infiltrado inflamatório intenso e difuso na lâmina própria da uretra; B- Numerosas formas amastigotas no citoplasma de macrófagos (setas) na lâmina própria da uretra; (A,B) Coloração Hematoxilina-eosina.....34

Figura 7- (A,B) Achados histológicos em cadelas infectadas por *L. infantum*; A- Endometrite, apresentando reação inflamatória granulomatosa composta por plasmócitos, linfócitos e macrófagos, contendo formas amastigotas de *Leishmania* (no detalhe), coloração Hematoxilina-eosina; B- Formas amastigotas (setas) marcadas em castanho no citoplasma de macrófagos no endométrio, Imuno-histoquímica.....36

Figura 8- (A,B) Achados histológicos em cadelas infectadas por *L. infantum*; A- Ooforite composta por macrófagos e linfócitos e formas amastigotas de *Leishmania* (seta e detalhe) no corpo lúteo, coloração Hematoxilina-eosina; B- Formas amastigotas (seta) marcadas em castanho no citoplasma de macrófagos no ovário, Imuno-histoquímica.....37

Figura 9- (A,B) Achados histológicos em cadelas infectadas por *L. infantum*; A- Vaginite, apresentando infiltrado inflamatório epitelial e formas amastigotas de *Leishmania* no citoplasma de macrófagos (seta), coloração Hematoxilina-eosina; B- Formas amastigotas marcadas em castanho no citoplasma de macrófagos na vagina, Imuno-histoquímica.....38

Figura 10- (A,B) Achados histológicos em cadelas infectadas por *L. infantum*; A- Vulvite, apresentando infiltrado inflamatório na derme, composto por macrófagos e linfócitos e numerosas formas amastigotas (setas); B- Mamite, apresentando reação inflamatória no tecido conjuntivo intralobular; (A,B) Coloração Hematoxilina-eosina.....39

Figura 11- (A,B) Achados histológicos em cadelas infectadas por *L. infantum*; A- Exsudato inflamatório no seio lactífero da glândula mamária, coloração Hematoxilina-eosina; B- Formas amastigotas marcadas em castanho no citoplasma de macrófagos no lúmen do seio lactífero da glândula mamária, Imuno-histoquímica.....40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Frequência de positividade para *Leishmania* nas técnicas de imuno-histoquímica (IHC), histopatologia (HP) e hibridização *in situ* (ISH) em amostras do trato genital e glândula mamária de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, janeiro a julho de 2013 (Barra Mansa, Brasil).....26
- Tabela 2- Frequência de positividade para *Leishmania* em amostras do trato genital e glândula mamária de cães naturalmente infectados por *L. infantum* e a classificação clínica correspondente, janeiro a julho de 2013 (Barra Mansa, Brasil).....28
- Tabela 3- Frequência da carga parasitária nos órgãos genitais e glândula mamária pela técnica de imuno-histoquímica em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, janeiro a julho de 2013 (Barra Mansa, Brasil).....29
- Tabela 4- Distribuição das células inflamatórias nos órgãos do trato genital e glândula mamária de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, janeiro a julho de 2013 (Barra Mansa, Brasil).....41
- Tabela 5- Classificação do infiltrado inflamatório nos órgãos do trato genital de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, janeiro a julho de 2013 (Barra Mansa, Brasil).....42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BCIP - 5-bromo-4-cloro-3 indolil fosfato
- CISH - Hibridização *in situ* cromogênica
- DPP® - Teste rápido de imunocromatografia de duplo percurso/*Dual-Path platform technology*
- CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
- ELISA - Ensaio imunoenzimático
- FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
- HE - Hematoxilina-eosina
- INI - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
- kDNA - DNA do cinetoplasto
- LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública
- LVC - Leishmaniose Visceral Canina
- LV - Leishmaniose Visceral
- min - Minutos
- NBT - 4-nitro blue cloreto de tetrazolium
- NNN - Novy, MacNeal e Nicolle
- PCR - Reação em cadeia da polimerase /*Polymerase chain reaction*
- pH - Potencial hidrogeniônico
- qPCR - PCR quantitativa
- RIFI - Reação de imunofluorescência indireta
- RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa
- SINAN - Sistema Nacional de Agravos de Notificação
- TBS - Solução salina tamponada com TRIS
- USA - United States of America
- °C - Graus Celsius
- ® - Marca registrada
- TM - Marca não registrada/ *Trademark*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 LEISHMANIOSES	1
1.1.1 Classificação taxonômica	1
1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	2
1.2.1 Transmissão vetorial	3
1.2.2. Transmissão não vetorial.....	4
1.2.3 Reação inflamatória associada à infecção por <i>L. infantum</i> em cães	5
1.2.4 Infecção natural e experimental por <i>L. infantum</i> e alterações histológicas associadas no trato genital de cães	6
1.2.5 <i>Leishmania</i> sp. no sêmen de cães	8
1.3 EPIDEMIOLOGIA	8
1.4 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR <i>L. infantum</i> EM CÃES	10
1.4.1 Diagnóstico clínico	10
1.4.2 Diagnóstico sorológico	11
1.4.3 Diagnóstico parasitológico	12
1.4.4 Diagnóstico molecular	123
1.4.5 Diagnóstico diferencial	14
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 CÃES E AMOSTRAS	19
4.2 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE	19
4.2.1 Critérios de inclusão	19
4.2.2 Critérios de Exclusão	19

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS E EXAME CLÍNICO.....	20
4.4 HISTOPATOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	21
4.5 CULTURA PARASITOLÓGICA.....	23
4.6 HIBRIDIZAÇÃO <i>in situ</i>	23
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
5. RESULTADOS.....	25
5.1 ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS	30
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são consideradas primariamente como uma antroponose, podendo acometer o homem quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito e representam um problema de saúde pública, composto por um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica (Ministério da Saúde, 2010a).

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contrair as leishmanioses, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano no mundo.

Protozoários do gênero *Leishmania*, incluindo aproximadamente 30 espécies de parasitos que infectam seres humanos e animais são os agentes etiológicos das leishmanioses (Gramiccia; Gradoni, 2005; Bañuls et al., 2007; WHO, 2010). Nas Américas, de acordo com a espécie envolvida as leishmanioses se subdividem em leishmaniose tegumentar americana e leishmaniose visceral americana (Ministério da Saúde, 2010b).

1.1.1 Classificação taxonômica

Os agentes etiológicos das leishmanioses pertencem ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, sub-filo Mastigophora, classe Zoomastigophorea, ordem Kinetoplastida, sub-ordem Trypanosomatina, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Ministério da Saúde, 2006).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são classificados nos subgêneros *Leishmania* (por exemplo, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana*) que replicam no intestino médio e *Viannia* (por exemplo, *L. braziliensis*, *L.*

peruviana), que replicam no intestino posterior de flebotomíneos (Lainson; Shaw, 1987). Cerca de 20 espécies são consideradas patogênicas para o homem (Ashford et al., 2000; Bañuls et al., 2007) e 11 foram isoladas de cães, incluindo *L. infantum* (Sin. *L. chagasi*), *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. arabica*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. colombiensis* e *L. panamensis* (Delgado et al., 1993; Dereure et al., 1994; Noli, 1999; Dantas-Torres, 2007; Tolezano et al., 2007).

1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A espécie mais incriminada e bem caracterizada na infecção canina e causadora da leishmaniose visceral americana, conhecida também como leishmaniose visceral canina (LVC), ou calazar é a *L. infantum*, que pertence ao complexo *L. donovani* (Bañuls et al., 2007) e geralmente apresenta uma evolução crônica, com acometimento sistêmico (Ministério da Saúde, 2006; Maia; Campino, 2012).

Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é o principal reservatório de *L. infantum*, pois apresenta intenso parasitismo cutâneo, estreito contato com o homem e serve, principalmente, de fonte de alimento, atraindo a presença do flebotomíneo transmissor. O vetor face às condições ambientais como temperatura, umidade e presença de matéria orgânica tem condições de se manter, facilitando a transmissão para outros animais e para o homem (Molina et al., 1994; Giunchetti et al., 2006; WHO, 2010). Devido à importância do cão no ciclo da leishmaniose visceral (LV), o Ministério da Saúde (2006) preconiza de acordo com a Portaria Interministerial nº 1.426 de 11 de julho de 2008, a eutanásia do cão infectado por *L. infantum*, sendo proibido o tratamento dos mesmos, pois aumentaria o risco para seleção de parasitas resistentes ao medicamento que também é utilizado no tratamento humano (Ministério da saúde, 2012).

Além disso, a enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem (Camargo-Neves et al., 2001; Ministério da Saúde, 2006).

No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (Ministério da Saúde, 2006).

1.2.1 Transmissão vetorial

A principal forma de transmissão do parasito para o homem, cães e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, sub-família Phebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos. O flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor biológico do protozoário *L. infantum* no Brasil (Gontijo; Melo, 2004; Ready, 2013).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*, durante o repasto sanguíneo. Ao atingir o trato digestivo anterior ocorre o rompimento desses macrófagos, com posterior liberação das formas amastigotas. Estas se reproduzem por divisão binária e diferenciam-se para formas flageladas denominadas de promastigotas, que também se reproduzem por divisão binária. As formas promastigotas transformam-se então em paramastigotas, que por sua vez colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, até que se diferenciem nas formas infectantes, as promastigotas metacíclicas (Ministério da Saúde, 2006).

Após o término do ciclo do parasito no vetor, que dura em torno de 72 horas, as fêmeas parasitadas ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva. Na derme do hospedeiro vertebrado, estas formas são fagocitadas por macrófagos, onde ficam no interior de vacúolos parasitóforos, se diferenciando em amastigotas e multiplicando intensamente por divisão binária até o rompimento dos macrófagos. As amastigotas liberadas são então fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo a disseminação hematogênica. No caso das espécies viscerotrópicas, essa disseminação se dá principalmente para tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (Ministério da Saúde, 2006; Ready, 2014).

1.2.2. Transmissão não vetorial

Embora a LVC seja normalmente transmitida através do vetor biológico, a transmissão na sua ausência já é conhecida. Casos autóctones de LVC foram relatados nos Estados Unidos (Gaskin et al., 2002; Duprey et al., 2006), no Reino Unido (Harris et al., 1994), Alemanha (Naucke; Lorentz, 2012), Finlândia (Karkamo et al., 2014) e Guiana Francesa (Rotureau et al., 2006) onde não foi encontrado o vetor. Nestes casos, a transmissão vertical ou venérea foram consideradas possíveis vias de infecção.

Transmissão direta através de transfusão sanguínea também já foi relatada (Owens et al., 2001; De Freitas et al., 2006).

No Brasil, já foi demonstrada a primeira evidência experimental da transmissão venérea por *L. infantum* em cães na ausência do vetor biológico no estado de Minas Gerais (Silva et al., 2009). Além disso, há diversos relatos de transmissão vertical entre cadelas grávidas e seus fetos através da placenta (Masucci et al., 2003; Dubey et al., 2005; Rosypal et al., 2005a; Gibson-Corley et al., 2008; Boggiatto et al., 2011).

Em camundongos, também há relato de detecção de *Leishmania* em fetos e placentas de fêmeas infectadas experimentalmente, através da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Rosypal; Lindsay, 2005). Nesse estudo, realizado na América do Norte, os autores também demonstraram que um, entre oito machos BALB/C livres de *Leishmania* criados com fêmeas infectadas experimentalmente, apresentaram DNA de *Leishmania* detectado no baço e o desenvolvimento de anticorpos anti-*Leishmania* sp., sugerindo que a transmissão venérea de agentes da LV também possa ocorrer nessa espécie, ainda que num nível baixo.

Em humanos, a primeira evidência de que a LV poderia ser transmitida sexualmente foi relatada a partir de uma paciente que nunca havia saído das Ilhas Britânicas, onde não houve registro do vetor e nenhum relato de leishmaniose autóctone (Symmers, 1960). A mulher desenvolveu uma pápula genital com detecção de formas amastigotas nesse sítio. Seu marido havia sido diagnosticado e tratado para LV vários anos antes, apresentando no momento do seu diagnóstico, esplenomegalia, hepatomegalia e aumento generalizado de linfonodos, repletos de

formas amastigotas compatíveis com *Leishmania* sp. No sêmen, o protozoário não foi detectado.

Embora raro, houve outros relatos envolvendo órgãos genitais de pacientes humanos com LV, incluindo a observação de amastigotas no interior de macrófagos obtidos por aspiração testicular em um menino com leucemia linfoblástica grave (Kapila et al., 1994), e detecção de *L. infantum* em amostra de lesão ulcerada nodular no prepúcio de um homem (Aste et al., 2002).

1.2.3 Reação inflamatória associada à infecção por *L. infantum* em cães

Protozoários do gênero *Leishmania* podem infectar diferentes tipos de células, incluindo os do sistema fagocítico mononuclear, como macrófagos e células de Kupffer, além de células dendríticas, fibroblastos, células endoteliais, hepatócitos, neutrófilos, eosinófilos e células neoplásicas (Rodríguez et al., 1996; Marchal et al., 1997; Tafuri et al., 2001; Levy et al., 2006). Dessa forma, são capazes de invadir quase todos os tecidos e órgãos do corpo, incluindo o sistema nervoso central (Viñuelas et al., 2001).

O controle da multiplicação do parasita, a progressão da doença ou cura são determinadas pelo equilíbrio da resposta imune mista do tipo Th1 e Th2, que a *L. infantum* parece induzir (Baneth et al., 2008). Essa resposta mista parece ocorrer tanto em cães assintomáticos quanto sintomáticos, sendo prevalente nos últimos, nos quais eventualmente resulta em danos nos tecidos via diferentes mecanismos patológicos (Panaro et al., 2009). Estes mecanismos são gerados como uma forma de compensar, porém sem eficácia, a incapacidade dos macrófagos de destruir o parasito em cães susceptíveis e incluem principalmente, inflamação granulomatosa (por exemplo, dermatite nodular, osteomielite), deposição de complexos imunes (por exemplo, glomerulonefrite), e/ou a produção de autoanticorpos (Baneth et al., 2012; Koutinas; Koutinas, 2014).

Na maioria dos casos, o infiltrado granulomatoso é acompanhado de um infiltrado linfoplasmocítico e/ou linfohistiocítico e, ocasionalmente, neutrofílico,

especialmente nos estágios iniciais da doença (Pinto et al., 2011; Verçosa et al., 2012; Momo et al., 2014).

No geral, a variabilidade clínica e a lesão tecidual subjacente à LVC refletem o resultado combinado de uma imunidade celular ineficiente, que conduz a uma inflamação granulomatosa compensatória e uma imunidade humoral hiperativa, que eventualmente, resulta na deposição de complexos imunes nos tecidos alvo e/ou geração de autoanticorpos (Koutinas; Koutinas, 2014).

1.2.4 Infecção natural e experimental por *L. infantum* e alterações histológicas associadas no trato genital de cães

A infecção por *L. infantum* no trato genital canino está associada com alterações histológicas tanto em machos como em fêmeas. Em machos sorologicamente positivos, utilizando a técnica de histopatologia, pode ser observado orquite, epididimite, balanite e postite com infiltrado inflamatório do tipo granulomatoso, variando de focal a difuso, composto principalmente por macrófagos, plasmócitos e linfócitos, associados com a observação de formas amastigotas compatíveis com *Leishmania* sp. (Diniz et al., 2005). Prostatite granulomatosa multifocal, composta por macrófagos e plasmócitos também já foi observada pela histopatologia, associada com a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. (Mir et al., 2012), embora outro estudo não tenha encontrado essa mesma associação na próstata (Benites et al., 2011).

Na técnica de imuno-histoquímica, considerada mais sensível do que a histopatologia, amastigotas também já foram detectadas nos diferentes órgãos do trato genital masculino de cães, incluindo a próstata (Diniz et al., 2005).

Na citologia, associação entre perfil leucocitário e presença de formas amastigotas já foi determinada em cães sorologicamente positivos, a partir de aspirado e impressões em lâmina de testículo (Benites et al., 2011; Manna et al., 2012) e epidídimo (cabeça, corpo e cauda) (Benites et al., 2011). Nesses órgãos foi detectada maior frequência de macrófagos, neutrófilos e linfócitos, com predomínio de formas amastigotas na cauda do epidídimo e nos testículos.

As fêmeas, porém, de acordo com as pesquisas realizadas até o momento (Silva et al., 2008; Silva et al., 2009), não apresentam significativas lesões genitais associadas à infecção por *L. infantum*. Em cadelas naturalmente infectadas, apenas foi relatada uma dermatite vulvar de leve a moderada e uma leve vaginite, caracterizadas por um infiltrado de macrófagos, plasmócitos e linfócitos, sendo também observadas formas amastigotas no citoplasma de macrófagos pela histopatologia e imuno-histoquímica (Silva et al., 2008). No entanto, como o infiltrado inflamatório foi observado tanto na vulva e vagina de cadelas infectadas quanto nas não infectadas, esse dado não foi associado com a presença do parasito. Apesar de no útero, tubas uterinas e ovários ter sido detectado DNA de *Leishmania* pela técnica de PCR, nenhuma lesão e formas amastigotas foram observadas nas técnicas de histopatologia e imuno-histoquímica nesses tecidos. Com base nesses resultados, Silva et al. (2008) sugeriram que *L. infantum* não possui tropismo para o trato genital feminino de cães, diferente do que ocorre no trato genital de machos.

Portanto, considerando que cães com LV apresentam formas amastigotas e lesões genitais associadas, sugerindo potencial transmissão venérea, Silva et al. (2009) comprovaram, sob condições experimentais, que tal transmissão ocorre. Nesse estudo, cadelas livres de *Leishmania* alojadas na ausência do inseto vetor e copuladas com cães naturalmente infectados, apresentando DNA do parasito no sêmen, após seis meses a última cópula soroconverteram e/ou foram positivas na PCR. Histologicamente, porém, somente foi observado um leve a moderado infiltrado, periglandular ou perifolicular composto predominantemente por linfócitos e plasmócitos presentes na vulva. Além disso, duas cadelas apresentaram endometrite, composta por linfócitos, plasmócitos e neutrófilos associada à hiperplasia endometrial cística glandular. Não foram observadas nas técnicas histológicas, presença de amastigotas nos órgãos genitais coletados (vulva, vagina, cérvix, cornos e corpo uterinos, tubas uterinas e ovários).

Segundo esses autores, os resultados apresentados, juntamente com os anteriores (Silva et al., 2008) apoiam a hipótese de que a transmissão venérea em cães seja provavelmente unidirecional, de preferência a partir de machos infectados para as fêmeas suscetíveis.

1.2.5 *Leishmania* sp. no sêmen de cães

A primeira evidência de eliminação de *Leishmania* sp. no sêmen de cães foi relatada por Riera e Valladares (1996). Nesse estudo, seis cães da raça beagle, foram experimentalmente inoculados com *L. infantum* e estudados. Após a confirmação da infecção por sorologia, exame direto e cultura do aspirado de linfonodos, o sêmen coletado de três cães foi submetido à cultura parasitológica, isolando *L. infantum* de um deles.

Outros estudos relataram eliminação de *Leishmania* no sêmen de cães naturalmente infectados confirmado por PCR (Diniz et al., 2005; Silva et al., 2009), assim como a pobre qualidade do sêmen, caracterizada por hiperproteïnemia seminal e baixa motilidade progressiva (Labat et al., 2010; Assis et al., 2010), determinando um comprometimento reprodutivo em cães com LV.

Esses achados de *Leishmania* no sêmen sugerem a possibilidade de transmissão venérea da LVC.

1.3 EPIDEMIOLOGIA

As leishmanioses são consideradas doenças negligenciadas, altamente influenciadas por fatores sociais e ambientais e são endêmicas em 98 países e territórios. Os dois focos importantes, ambos causados por *L. infantum*, incluem a bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia ocidental, e o outro no Novo Mundo, predominando no Brasil (WHO, 2010; Alvar et al., 2012).

No mundo, há uma incidência estimada de 0,5 milhões de casos de LV humana registrados anualmente. Mais de 90% dos casos da doença estão concentrados em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão, provocando um número estimado de mais de 50.000 óbitos por ano, uma taxa superada, dentre as doenças parasitárias, apenas pela malária (WHO, 2010; Alvar et al., 2012). Além disso, a LVC é emergente na América do Norte (Maia; Campino, 2012).

Conforme a Portaria nº 104 de 25 de janeiro de 2011 a LV faz parte da lista das doenças de notificação compulsória, devendo ser notificada e registrada no Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN).

No Brasil, entre os anos de 2007 e 2012 ocorreram 22.642 casos humanos de LV, confirmados e notificados no SINAN (Ministério da Saúde, 2014) e um total de 1.345 óbitos nesse período (Ministério da Saúde, 2014a).

O país enfrenta atualmente a expansão geográfica e urbanização da LV com casos humanos e caninos em várias cidades de grande e médio porte (Maia-Elkyhoury et al., 2008; Werneck, 2008; Coura-Vital et al., 2011; Harhay et al., 2011; Tonini et al., 2012; Cardim et al., 2013; Castro-Júnior, 2014) , chegando a 4.992 (n=16.529) cães positivos para *Leishmania* (Barata et al., 2013).

As modificações ambientais causadas pelo homem, o desmatamento, ocupação desordenada das periferias das grandes cidades por população de baixa ou nenhuma imunidade à infecção, presença significativa do reservatório e do vetor *L. longipalpis*, contribuíram para esse processo, promovendo o surgimento de novos focos ou reativação de antigos (Gontijo; Melo, 2004; Ministério da Saúde, 2006; Boraschi et al., 2007; Maia-Elkyhoury et al., 2008).

Recentemente, foi descrito o primeiro caso autóctone de LVC na região sul do país, a qual era a única região brasileira sem relatos comprovados da doença (Da Silva et al., 2011).

Na região sudeste, o estado do Rio de Janeiro é um dos estados do país que menos registra casos de LV em seres humanos. No período de 2007 ao início de 2013 foram notificados ao SINAN 25 casos humanos de LV, distribuídos em sua maioria no município do Rio de Janeiro, que notificou 10 casos, seguido de Barra Mansa que notificou 9. Dos nove casos humanos de Barra Mansa, quatro evoluíram para óbito (Pimentel et al., 2014).

Porém, nos últimos anos verificou-se um aumento do número de casos caninos, especialmente em alguns municípios do estado como o Rio de Janeiro, Barra Mansa, Volta Redonda, Niterói, Maricá e Mangaratiba (Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro, 2013). Casos novos de infecção por *L. infantum* já foram registrados em alguns municípios desse estado anteriormente livres da doença (Cabrera et al., 2003; Souza et al., 2009; De Paula et al., 2009; Figueiredo et al., 2010a).

Recentemente, um caso autóctone de infecção canina por *L. infantum* foi relatado no município de Volta Redonda. A infecção foi confirmada a partir do isolamento e identificação etiológica em amostras de pele íntegra e medula óssea (De Campos et al., 2013). Esse aumento no número de casos de infecção por *L. infantum* em cães e sua expansão para áreas anteriormente indenes, com aparecimento de novos casos de LV em humanos reflete a fragilidade do controle da doença no estado do Rio de Janeiro.

1.4 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *L. infantum* EM CÃES

1.4.1 Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico da LVC é difícil devido à variedade de sintomas, que incluem linfadenopatia generalizada, perda de pelos ao redor dos olhos, nariz, boca e orelhas, lesões de pele com ou sem descamações, e às vezes, úlceras, perda de apetite, apatia, emagrecimento, onicogribose, dificultando a locomoção, febre, distúrbios de coagulação, lesões renais e hepáticas (Feitosa et al., 2000; Saridomichelakis; Koutinas, 2014).

A prevalência da infecção em cães em áreas endêmicas pode chegar a 50% ou mais, porém a prevalência da doença clínica ocorre entre 3% e 10% (Gomes et al., 2008), demonstrando que a maioria dos cães infectados não desenvolve sintomas, o que dificulta ainda mais o diagnóstico. Portanto, uma variedade de testes laboratoriais tem sido utilizado para detectar a infecção por *L. infantum* em cães, como testes sorológicos, cultura parasitológica em meio bifásico, citologia, histopatologia, imuno-histoquímica, PCR e hibridização *in situ* (Tafari et al., 2004; Maia; Campino, 2008; Miró et al., 2008; Menezes et al., 2013). Entretanto, a sensibilidade dos métodos de diagnóstico de *L. infantum* varia consideravelmente em função de inúmeros aspectos, limitando o uso isolado desses métodos, especialmente em cães assintomáticos (Moreira et al., 2007; Gomes et al., 2008; Miró et al., 2008; Otranto et al., 2009; Figueiredo et al., 2010b; Grimaldi et al., 2012;

Ferreira et al., 2012). Dessa forma, deve-se buscar melhorar a acurácia no diagnóstico da infecção de cães com *L. infantum*.

1.4.2 Diagnóstico sorológico

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foi a técnica sorológica recomendada durante muitos anos pelo Ministério da Saúde para confirmação diagnóstica de LVC, apresentando em estudos sensibilidade de 83% a 100% (Mancianti et al., 1996; Almeida et al., 2005; Figueiredo et al., 2010c).

Entretanto, de acordo com Faria e Andrade (2012) a aplicação da RIFI requer alto nível de habilidade, experiência, equipamento especializado e de alto custo, incluindo as diluições seriadas do soro que tornam a técnica trabalhosa e inviável para avaliar grande número de amostras. Além disso, uma das grandes desvantagens é a impossibilidade de automação, levando a interpretações subjetivas dos resultados, dificultando a repetibilidade em diferentes laboratórios (Gradoni, 2002; Rosati et al., 2003). Já o ensaio imunoenzimático (ELISA), permite automação e utilização de valores de referência, apresentando vantagens nesse sentido (Rosati et al., 2003).

As técnicas sorológicas também apresentam a limitação da baixa especificidade, por conta de possíveis reações cruzadas com outros tripanosomatídeos como *L. (Viannia) braziliensis*, *Trypanosoma cruzi* (Rosypal et al., 2005b; Troncarelli et al., 2009; Zanette et al., 2013) e *Trypanosoma caninum* (Madeira et al., 2009b).

Contudo, a utilização das técnicas imunocromatográficas abriu um novo panorama no diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães. Devido à facilidade, rapidez na execução e resultados satisfatórios, desde dezembro de 2011 o Ministério da Saúde substituiu o antigo protocolo de diagnóstico da LVC, recomendando o teste rápido de imunocromatografia de duplo percurso (DPP®) como exame de triagem e o ELISA como exame confirmatório dos casos positivos no DPP® (Ministério da Saúde, 2012).

1.4.3 Diagnóstico parasitológico

Para o diagnóstico parasitológico a demonstração do parasito pode ser feita em material obtido por biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos e biópsia ou escarificação de pele (Ministério da Saúde, 2006; Souza et al., 2014). O material obtido pode ser utilizado para a confecção de esfregaço ou impressão em lâminas, histologia ou isolamento em meios de cultura (Sundar; Rai, 2002). Entretanto, alguns dos procedimentos citados para obtenção de material são invasivos, podendo gerar riscos para o animal, além de serem impraticáveis em programas de saúde pública, nos quais um grande número de animais deva ser avaliado num período curto (Ministério da Saúde, 2006).

A cultura parasitológica seguida da utilização da técnica de eletroforese enzimática multilocus constitui o método de referência para caracterização de protozoários do gênero *Leishmania*. A cultura, devido sua especificidade de aproximadamente 100% (Gontijo; Melo, 2004; Ministério da Saúde, 2006) e relativa sensibilidade, variando de 78,7% (n=310) (Madeira et al., 2009a) a 80,3% (n=51) (Madeira et al., 2006) é uma das técnicas mais tradicionais no contexto diagnóstico das leishmanioses. Todavia, os resultados da cultura parasitológica são demorados, além de ser uma técnica suscetível a contaminação microbiológica e que pode ser de difícil realização devido a pobre adaptação de algumas espécies ao meio de cultura (Maia et al., 2008).

A histopatologia e imuno-histoquímica são técnicas específicas para o gênero *Leishmania* e, diferentemente das técnicas citadas anteriormente, permitem a observação de formas amastigotas nos tecidos, embora apresentem uma menor sensibilidade do que as técnicas sorológicas, cultura parasitológica e PCR (Queiroz et al., 2011). A visualização do parasito nos tecidos é importante, pois permite a correlação dos parasitos com as lesões associadas e quantificação da carga parasitária (Queiroz et al., 2011). Entretanto, a histopatologia e imuno-histoquímica não permitem a identificação de *Leishmania* em nível de espécie.

1.4.4 Diagnóstico molecular

Para o diagnóstico molecular estão disponíveis métodos de hibridização *in situ* com sondas específicas e técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, incluindo a reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa (RT-PCR) para detecção de RNA, assim como a PCR convencional e PCR quantitativa (qPCR) para detecção de DNA (Gontijo; Melo, 2004; Solcà et al., 2014). Dentre estas, a PCR convencional é a mais realizada, utilizando iniciadores desenhados para amplificar sequências conservadas encontradas em minicírculos que compõem o kDNA (DNA do cinetoplasto) de diferentes espécies de *Leishmania*. O cinetoplasto é conhecido por possuir milhares de cópias de minicírculos de DNA (Sundar; Rai, 2002).

Resultados variáveis com relação à sensibilidade da PCR e qPCR podem ser observados em diferentes amostras caninas. Fatores que podem explicar tais variações incluem a distribuição heterogênea dos parasitos em cada tecido, devido ao tropismo da cepa, além da resposta imune local (Maia; Campino, 2008; Lombardo et al., 2012; Solcà et al., 2014).

Estudos têm descrito alta sensibilidade na detecção de pequenas cargas de parasitas, utilizando qPCR (Mary et al., 2004; Francino et al., 2006; Manna et al., 2009; Solcà et al., 2014). Pela capacidade de ser uma técnica quantitativa, também é utilizada para monitorar a carga parasitária em tecidos de cães (Maia; Campino, 2008; Martinez et al., 2011; Galletti et al., 2011). Em relação a PCR, algumas desvantagens devem ser consideradas, como o fato de ser uma técnica que não faz parte da rotina de muitos laboratórios, por conta da falta de padronização nos diferentes protocolos. Além disso, ainda apresenta alto custo operacional, há possibilidade de contaminação, além da não diferenciação entre doença e infecção (Xavier et al., 2006; Gomes et al., 2008; Queiroz et al., 2011; De Almeida et al., 2011).

A técnica de hibridização *in situ* cromogênica (CISH) foi recentemente introduzida como técnica de diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães (Dinhopl et al., 2011). O objetivo da técnica é detectar o agente infeccioso, demonstrando a presença de segmentos específicos de ácidos nucleicos de um agente infeccioso na amostra. Para realização da técnica é preciso um molde de

ácido nucleico (DNA ou RNA) no interior do tecido a ser testado (ácido nucléico alvo do organismo a ser detectado), uma sonda de ácido nucléico marcada, geralmente um oligonucleotídeo, específica para o organismo a ser detectado, e um sistema de detecção para demonstrar a reação de hibridização (Segalés et al., 1999). A principal vantagem sobre a cultura parasitológica, PCR, técnicas sorológicas, imuno-histoquímica e histopatologia é que ela permite de forma simultânea a visualização de formas amastigotas no tecido e a identificação delas como *L. infantum*, com o uso de sonda específica (Menezes et al., 2013).

1.4.5 Diagnóstico diferencial

A maioria dos sinais clínicos observados na LVC é comum a outras doenças caninas, como por exemplo, erliquiose, babesiose, rickettsioses, tumor venéreo transmissível e brucelose (Barbosa de Deus et al., 2002; Reis et al., 2006; Mekuzas et al., 2009), além da imunossupressão provocada que pode gerar infecções oportunistas, dificultando do mesmo modo o diagnóstico da LVC (Silva, 2007).

Nesse contexto, os achados histopatológicos são, por vezes, inespecíficos e caracterizam-se por uma reação inflamatória granulomatosa com presença de células mononucleares, comum a várias outras doenças infecciosas.

No trato reprodutor, a infecção por *Brucella canis* constitui um importante diagnóstico diferencial para LVC. No macho, a próstata e epidídimos servem como locais eficazes para eliminação das bactérias e alterações patológicas observadas incluem epididimite, prostatite, orquite e consequente degeneração e atrofia testicular. Já na fêmea observa-se falha na reprodução, representada por aborto (Wanke, 2004; Hollett, 2006). Um diagnóstico definitivo de infecção por *B. canis* requer aplicação simultânea de diferentes técnicas laboratoriais como a cultura, sorologia, histopatologia, imuno-histoquímica e PCR, devido à falta de um método diagnóstico altamente confiável (Hollett, 2006; Gyuranecz et al., 2011) .

Desta forma, faz-se necessária uma associação entre os parâmetros clínicos, epidemiológicos, parasitológicos e sorológicos para um diagnóstico definitivo.

2. JUSTIFICATIVA

Classicamente, a transmissão de LV para o homem e outros hospedeiros mamíferos se dá pela picada de flebotomíneos, sendo os cães o principal reservatório dos mesmos no ambiente doméstico (Gontijo; Melo, 2004; Ministério da Saúde, 2006). Porém, cães naturalmente infectados desenvolvem frequentemente lesões genitais associadas com a presença de formas amastigotas, particularmente no epidídimo, prepúcio, glande e testículos (Diniz et al., 2005; Amara et al., 2009; Benites et al., 2011; Manna et al., 2012) e em menor escala na próstata (Mir et al., 2012). Além disso, estas lesões genitais estão associadas com eliminação de *Leishmania* no sêmen de cães infectados (Diniz et al., 2005), sugerindo possível transmissão venérea da LVC.

A presença de formas amastigotas, confirmada por PCR e imuno-histoquímica, em tecidos de baço e fígado de fetos de cadelas naturalmente infectadas já foi reportada (Da Silva, 2009), assim como também já foi detectado DNA de *Leishmania*, por PCR, em placenta de cadelas sorológica e parasitologicamente positivas (Pangrazio et al., 2009). Em cadelas infectadas experimentalmente, DNA de *Leishmania* já foi detectado em seus filhotes no fígado, medula óssea, coração, baço, linfonodo, rim e placenta e também em seu útero (Rosypal et al., 2005a; Ben Slimane et al., 2014). Esses estudos demonstram a possibilidade da transmissão vertical da LVC.

Recentemente, iniciou-se uma epidemia de LV em cães e humanos no município de Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, com 4 óbitos humanos registrados entre 2010 e 2013 (Pimentel et al., 2014) e 116 casos caninos confirmados pela cultura parasitológica no período de 2011 a 2013. (Mello et al., 2014). Entretanto, não se sabe se além da transmissão vetorial, outras formas de transmissão possam estar ocorrendo, como a venérea e/ou vertical, o que poderia estar contribuindo para o elevado número de casos caninos nesse município (Mello et al., 2014). Todavia, faltam estudos detalhados sobre a ocorrência da infecção por *L. infantum* no trato genital de cães desse município, assim como das lesões e carga parasitária no sistema reprodutor masculino e feminino. Esses dados permitirão

identificar o potencial de transmissão venérea e/ou vertical de *L. infantum* entre esses cães.

Nesse aspecto a técnica de hibridização *in situ* tem se mostrado promissora, detectando de maneira inequívoca, espécies de *Leishmania* em tecidos fixados com formol a 10% e emblocados em parafina (Dinhopl et al., 2011; Menezes et al., 2013). Pela sua elevada sensibilidade e especificidade, a técnica possibilita uma boa avaliação do parasitismo tecidual e, portanto, uma melhor correlação com as lesões genitais por *L. infantum* em cães naturalmente infectados na área estudada.

Adicionalmente, a análise do líquido seminal de cães naturalmente infectados através da cultura parasitológica, método de referência para o diagnóstico de *Leishmania*, ainda não foi relatada. Essa técnica é importante para verificar a eliminação de formas viáveis do parasito e sugerir, de fato, uma possível transmissão venérea de *L. infantum* entre os cães. Além disso, a ocorrência da infecção na glândula mamária é pouco conhecida, sendo importante avaliá-la para futuras pesquisas sobre a possível transmissão via transmamária em cães.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a ocorrência de *L. infantum* no trato genital e glândula mamária de cães naturalmente infectados e as lesões associadas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ☐ Comparar a frequência de cães sintomáticos e assintomáticos com a presença de *Leishmania* no trato genital;
- ☐ Avaliar a ocorrência de *L. infantum* no líquido seminal, testículo e útero de cães por meio da cultura parasitológica;
- ☐ Avaliar a ocorrência de *Leishmania* nos diferentes órgãos do trato genital e glândula mamária de cães por meio das técnicas de histopatologia e imuno-histoquímica;
- ☐ Comparar a frequência de positividade para *L. infantum* pelas técnicas de cultura parasitológica, imuno-histoquímica, histopatologia e hibridização *in situ* nas amostras de testículos, epidídimo e útero;
- ☐ Avaliar a carga parasitária dos órgãos do trato genital e glândula mamária por meio da técnica de imuno-histoquímica;

- Avaliar as alterações histológicas associadas à infecção por *L. infantum* nos órgãos do trato genital e glândula mamária de cães pela técnica de histopatologia;

- Verificar o grau de concordância entre os diferentes órgãos quanto à positividade nas técnicas de diagnóstico;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CÃES E AMOSTRAS

Foi realizado um estudo seccional em amostra de conveniência composta por 40 cães domiciliados (20 machos e 20 fêmeas), incluídos de janeiro a julho de 2013. Os cães foram provenientes do município de Barra Mansa (22°32'25,19"S e 44°10'35,33"O), estado do Rio de Janeiro, que é considerada uma área epidêmica de LVC (Mello et al., 2014).

4.2 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

4.2.1 Critérios de inclusão

Cães soropositivos para *Leishmania* no teste rápido de imunocromatografia de duplo percurso (DPP®) e no ensaio imunoenzimático (ELISA) e com isolamento de *L. infantum* comprovado pela técnica de eletroforese enzimática multilocus em pele, baço, medula óssea ou linfonodo.

4.2.2 Critérios de Exclusão



Ser castrado.

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS E EXAME CLÍNICO

Os quarenta cães foram testados previamente pelo DPP realizado pela Secretaria Municipal de Saúde do município estudado e pelo ELISA realizado pelo Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) do estado do Rio de Janeiro. Os cães positivos foram encaminhados para eutanásia no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) como medida de controle preconizada pelo Ministério da Saúde (2006). No INI, os cães foram contidos mecanicamente e inicialmente avaliados fisicamente, sendo realizados inspeção de pele e de mucosas oral e ocular, palpação de linfonodos superficiais e órgãos abdominais. Foram considerados sinais clínicos de LVC: emagrecimento, alopecia geral ou localizada, lesões cutâneas como úlceras e descamação, onicogribose, aumento de linfonodos superficiais, do fígado ou do baço à palpação, mucosas ocular ou oral hipocoradas e atrofia muscular esquelética. Os cães foram classificados em dois grupos de acordo com sinais clínicos: assintomático – ausência de sinais clínicos compatíveis com LVC; sintomáticos – presença de pelo menos um dos sinais clínicos descritos (Souza et al. 2014). Os cães foram sedados com cloridrato de quetamina (10 mg/kg) associado a maleato de acepromazina (0,2 mg/kg), por via intramuscular, submetidos à eutanásia com dose excessiva de tiopental sódico por via endovenosa e necropsiados. Na necropsia, foram coletadas amostras de tecido do trato genital masculino (prepúcio, incluindo pele e mucosa, glândula, epidídimo direito e esquerdo, testículos direito e esquerdo e próstata) e feminino (vulva, incluindo pele e mucosa, vagina, útero, incluindo perimétrio, miométrio e endométrio, tubas uterinas e ovários direito e esquerdo), além de amostra de glândula mamária feminina aleatória, que foram fixadas em formalina tamponada a 10%. Para obtenção do líquido seminal, inicialmente foi injetada solução salina estéril, contendo antibióticos no epidídimo direito e esquerdo com auxílio de seringa de 3 mL. Após a injeção da salina, era feito um aspirado de cada epidídimo, utilizando a mesma seringa e o conteúdo obtido era transferido para microtubos estéreis. As etapas da metodologia estão representadas na figura 1.

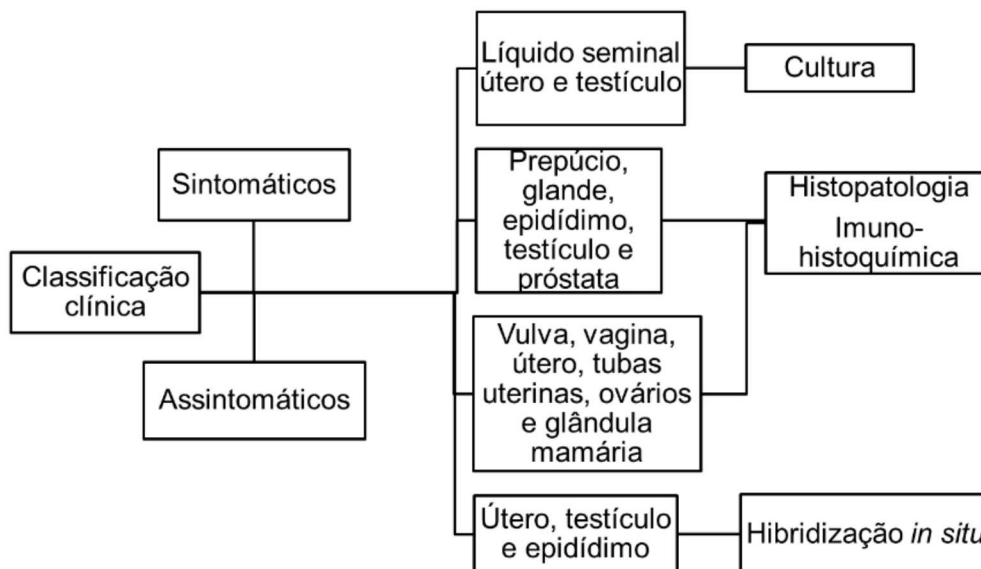


Figura 1- Fluxograma das etapas da metodologia. Classificação clínica dos cães com *Leishmania*, órgãos coletados e as respectivas técnicas de diagnóstico utilizadas.

Os procedimentos realizados nos cães desse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FIOCRUZ), licença LW-54/13.

4.4 HISTOPATOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA

Cortes histológicos de 5 μm de espessura dos blocos de parafina, foram colocados em lâminas não silanizadas para histopatologia e em lâminas silanizadas para imuno-histoquímica.

Para histopatologia, os cortes seriados obtidos foram corados pela hematoxilina-eosina (HE) (Carson; Hladick, 2009). Com o objetivo de avaliar a intensidade inflamatória, foi realizada uma análise semi-quantitativa sob microscopia óptica dos tipos celulares (macrófagos, plasmócitos, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos) detectados no infiltrado inflamatório. Para isso, com auxílio de um retículo óptico gradeado de 1 mm^2 e um contador de células manual realizou-se a


contagem a partir de um campo microscópico com aumento de 400X na área mais celular do corte histológico, sendo o infiltrado classificado quanto ao tipo em granulomatoso, caso fosse observada uma predominância de macrófagos, e não granulomatoso, caso fosse observada uma predominância dos outros tipos celulares. O infiltrado inflamatório total em cada órgão estudado foi calculado somando-se o número de cada tipo de célula inflamatória encontrada. Posteriormente, foi calculada a mediana para cada tipo celular e para o infiltrado inflamatório total de cada órgão.

Para imuno-histoquímica, cortes seriados foram desparafinizados em xilol e reidratados em concentrações decrescentes de etanol. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em solução de peróxido de hidrogênio a 30% e metanol (45 mL de peróxido de hidrogênio e 55 mL de metanol) por 40 min a temperatura ambiente. A recuperação antigênica foi realizada em tampão de citrato de sódio (pH = 6,0) a 65 °C durante 30 min em banho-maria. Para o bloqueio de ligações inespecíficas, os cortes foram incubados com a solução bloqueadora de proteínas Lab Vision™ Ultra V Block (Thermo Scientific, EUA) por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com soro de coelho policlonal anti-*Leishmania* na diluição de 1:500. O sistema de detecção de *Leishmania* foi baseado na reação da biotina, estreptavidina e peroxidase, a qual foi desenvolvida, usando o Kit UltraVision™ Plus Large Volume Detection System Anti-Polyvalente, HRP, Ready-to-use (Thermo Scientific™, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Cortes histológicos de tecidos intensamente parasitados com formas amastigotas de *Leishmania* foram incubados com soro homólogo não-imune como controle negativo e com soro policlonal de coelho anti-*Leishmania* como controle positivo. Para avaliação da carga parasitária, realizou-se a quantificação de macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania* da mesma forma que na técnica de histopatologia, porém em cinco campos com aumento de 400X nas áreas mais parasitadas dos cortes histológicos. Posteriormente, foi calculado o número médio de macrófagos parasitados, sendo o parasitismo graduado em ausente, leve a moderado (0,2 a 10 macrófagos parasitados) e intenso (mais de 10 macrófagos parasitados).

4.5 CULTURA PARASITOLÓGICA

Para realização da cultura parasitológica, além dos órgãos genitais, fragmentos teciduais de pele íntegra da escápula, baço e linfonodo foram coletados e previamente mergulhados em solução salina estéril e semeados em meio de cultura bifásico NNN (Novy, MacNeal e Nicolle) / Schneider Medium Insect (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) contendo 10% de soro fetal bovino e incubadas a 26-28°C (Madeira et al., 2009a). Além disso, aspirados de medula óssea coletados foram semeados diretamente. As promastigotas de *Leishmania* isoladas foram identificadas como *L. infantum* por eletroforese enzimática multilocus, utilizando cinco sistemas enzimáticos (Cupolillo et al., 1994).

4.6 HIBRIDIZAÇÃO *in situ*

Cortes de 5 m de espessura dos blocos de parafina, foram colocados em lâminas silanizadas. As lâminas foram então desparafinizadas em xilol e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol. Em seguida, foram lavadas em água corrente durante 3 min e água destilada durante 2 min. Para realização da hibridização *in situ* foi utilizado kit ZytoFastPlus CISH implementation kit AP-NBT/BCIP® (Zytovision, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. O tratamento proteolítico foi feito utilizando-se pepsina durante 5 min a 37° C. A seguir, as lâminas foram lavadas com 2 banhos de 1 min em água destilada e receberam tratamento de condicionamento celular, utilizando tampão citrato de sódio (pH = 6,0) a 98 °C durante 30 min em banho-maria. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com 2 banhos de 1 min em água destilada, desidratadas em concentrações crescentes de etanol e secas em estufa a 37° durante 10 min. Em seguida, as lâminas foram colocadas no aparelho hibridizador Thermobrite (StatSpin), incubadas com sonda de oligonucleotídeos específica para *L. infantum* (5'-GCCCTACCCGAGGACCAGAA AAGTT-3') ligada à digoxigenina na extremidade 5', segundo Menezes et al. (2013) na diluição de 1:500, utilizando a

solução tampão de hibridização HybridizationSolution 2x concentrate, buffered with SSC- H7140 (Sigma-Aldrich, EUA), e então cobertas com lamínula plástica Hybrislips (Sigma-Aldrich, EUA) e seladas com cola (Fixo Gum®, Marabu, Alemanha). No hibridizador, foi realizada desnaturação a 75°C por 5 min e, logo a seguir, hibridização a 37°C *overnight*. No dia seguinte, foi retirado o selante e as lamínulas, e as lâminas foram submetidas a três banhos de estringência, um a temperatura ambiente durante 5 min, o segundo a 55°C durante 5 min e o terceiro a temperatura ambiente durante 5 min. Foi utilizada solução salina tamponada com TRIS (TBS) na concentração de 1X para cada banho. Após os banhos de estringência, as lâminas foram incubadas com anticorpos anti-digoxigenina produzidos em coelhos por 30 min a 37°C. Após três banhos de 1min em TBS 1X a temperatura ambiente, as lâminas foram incubadas com anticorpo anti-anticorpo de coelhos conjugado com polímero e fosfatase alcalina por 30 min a 37°C. Após três banhos de 1min em TBS 1X a temperatura ambiente, foi feita revelação do sinal com 5-bromo-4-cloro-3 indolil fosfato (BCIP) e 4-nitro blue cloreto de tetrazolium (NBT) por 30 min a 37°C no escuro. Após 3 banhos em água destilada durante 2 min, as lâminas foram contracoradas com corante nuclear vermelho rápido durante 5 min, lavadas em água destilada durante 1 min, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e montadas em entellan (Merck).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por meio do software Statistical Package for Social Sciences (versão 16.0) para Windows. Foram descritas frequências simples da classificação clínica (sintomáticos e assintomáticos), sinais clínicos, positividade nas técnicas de diagnóstico, carga parasitária, alterações histológicas células inflamatórias e classificação de infiltrado inflamatório. Para avaliar a concordância entre os diferentes órgãos quanto à positividade nas técnicas de diagnóstico foi utilizado o índice *Kappa*. O grau de concordância foi classificado segundo Landis; Koch (1977): K= 0 a 0,19 fraco; 0,20 a 0,39 razoável; 0,40 a 0,59 moderado; 0,60 a 0,79 substancial; 0,80 a 1,00 quase perfeito.

5. RESULTADOS

Após realização do exame físico, 82,5% (n=33) dos cães foram classificados como sintomáticos e 17,5% (n=7) como assintomáticos. As principais alterações clínicas observadas nos cães sintomáticos foram esplenomegalia (n=17, 42,5%), linfadenite (n=16, 40%), emagrecimento (n=12, 30%), onicogribose (n=9, 22,5%), descamação cutânea furfurácea (n=8, 20%), alopecia (n=8, 20%) e mucosas hipocoradas (n=4, 10%).

No trato genital, 85% dos cães (n=34, 18 machos e 16 fêmeas), sendo 79% (n=27) sintomáticos e 20% (n=7) assintomáticos, foram positivos para *Leishmania* em pelo menos uma das técnicas de diagnóstico utilizadas. Nas amostras de líquido seminal, 15% (n=3) dos machos foram positivos na cultura parasitológica e quatro amostras sofreram contaminação microbiológica. As frequências de positividade obtidas pelas técnicas histológicas e de cultura parasitológica nos diferentes órgãos do trato genital masculino e feminino examinados estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 Frequência de positividade para *Leishmania* nas técnicas de imunohistoquímica (IHC), histopatologia (HP), hibridização *in situ* (ISH) e cultura parasitológica (CP) em amostras do trato genital e glândula mamária de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, janeiro a julho de 2013 (Barra Mansa, Brasil)

Sexo	Amostras	Frequência de Positividade									
		IHC		HP		ISH		CP		Total	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Macho	Prepúcio	12	60	7	35	13	65
	Glande	12	60	9	45	13	65
	Epidídimo	11	55	5	25	4	20	11	55
	Testículo	8	40	5	25	7	28	8	40	9	45
	Próstata	3	15	0	0	3	15
Fêmea	Vulva	14	70	10	50	14	70
	Glândula mamária	13	65	9	45	13	65
	Vagina	7	35	8	40	9	45
	Ovário	2	10	2	10	2	10
	Tubas uterinas *	2	11	1	6	2	11
	Útero	1	5	1	5	1	5	3	15	3	15

n: Número de amostras positivas para *Leishmania*, considerando um total de 20; ... Teste não realizado; * Foram avaliadas 18 amostras.

Formas amastigotas detectadas na técnica de hibridização *in situ* são apresentadas na Figura 2.

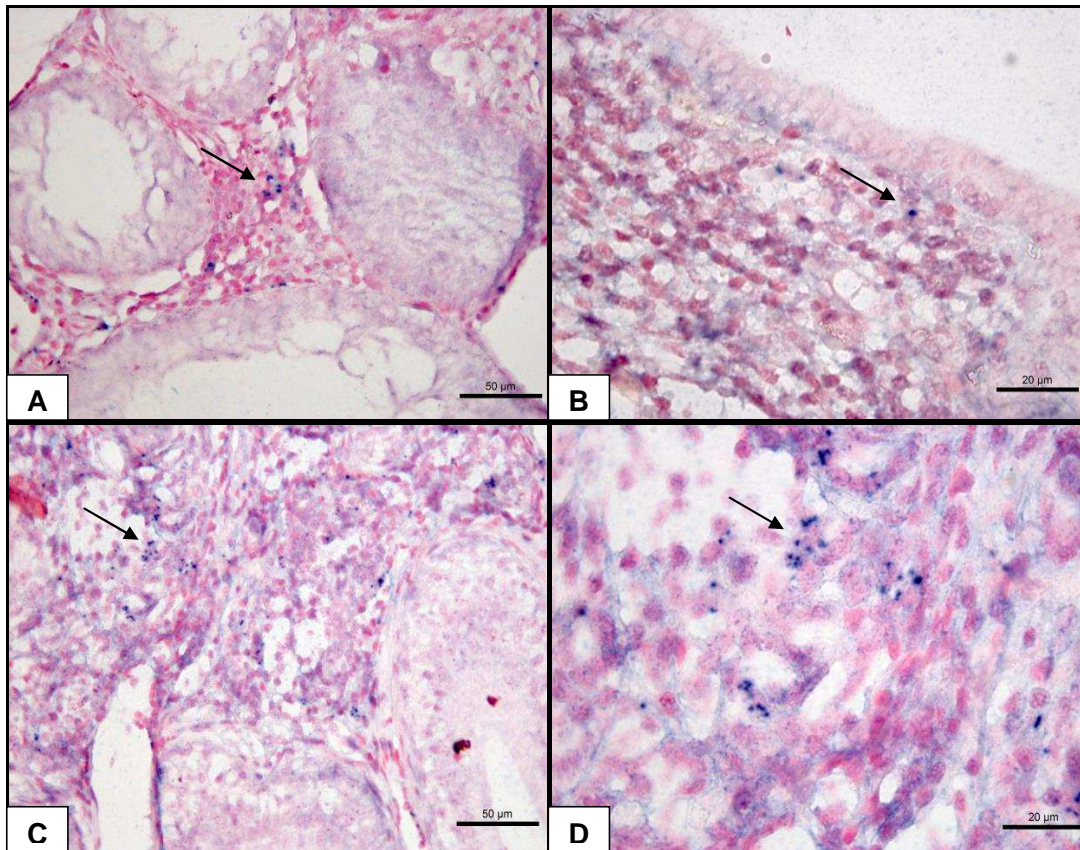


Figura 2- (A-D) Hibridização *in situ* em caninos infectados por *L. infantum*, apresentando formas amastigotas no interstício do testículo (A), no endométrio (B) e no interstício do epidídimo (C,D).

A relação entre as frequências de positividade nos órgãos genitais e glândula mamária em pelo menos uma das técnicas de diagnóstico e a classificação clínica, estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 Frequência de positividade para *Leishmania* em amostras do trato genital e glândula mamária de cães naturalmente infectados por *L. infantum* e a classificação clínica correspondente, janeiro a julho de 2013 (Barra Mansa, Brasil).

Sexo	Amostras	Frequência de Positividade					
		Sintomáticos		Assintomáticos		Total	
		n	%	n	%	n	%
Macho	Prepúcio	11	55	2	10	13	65
	Glande	10	50	3	15	13	65
	Epidídimo	9	45	2	10	11	55
	Testículo	8	40	1	5	9	45
	Próstata	2	10	1	5	3	15
Fêmea	Vulva	11	55	3	15	14	70
	Glândula mamária	12	60	1	5	13	65
	Vagina	7	35	2	10	9	45
	Ovário	1	5	1	5	2	10
	Tubas uterinas *	2	11	0	0	2	11
	Útero	3	15	0	0	3	15

n: Número de amostras positivas para *Leishmania*, considerando um total de 20; * Foram avaliadas 18 amostras.

De todos os cães que apresentaram positividade no trato genital, apenas um cão não apresentou positividade visceral (medula óssea ou baço) ou nos linfonodos, mas sim, na glândula e pele da escápula.

Foi verificada concordância moderada dos resultados de positividade para *Leishmania* entre testículo e epidídimo ($k=0,40$) e entre testículo e glândula ($k=0,42$). Concordância razoável foi verificada entre epidídimo e prepúcio ($k=0,38$), prepúcio e glândula ($k=0,34$), vulva e vagina ($k=0,32$) e entre útero e tubas uterinas ($k=0,31$). No restante das comparações os resultados foram discordantes ou com fraca concordância.

A carga parasitária encontrada em cada órgão está descrita na Tabela 3.

Tabela 3 Frequência da carga parasitária nos órgãos genitais e glândula mamária pela técnica de imuno-histoquímica em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, janeiro a julho de 2013 (Barra Mansa, Brasil).

Sexo	Amostras	Carga Parasitária					
		Intensa		Leve a moderada		Ausente	
		n	%	n	%	n	%
Macho	Prepúcio	3	15	9	45	8	40
	Glande	3	15	9	45	8	40
	Epidídimo	0	0	11	55	9	45
	Testículo	1	5	7	35	12	60
	Próstata	0	0	3	15	17	85
	Glândula mamária	2	10	11	55	7	35
Fêmea	Vulva	5	25	9	45	6	30
	Vagina	3	15	4	20	13	65
	Ovário	0	0	2	10	18	90
	Tubas uterinas *	0	0	2	11	16	89
	Útero	0	0	1	5	19	95

n: número de amostras, considerando um total de 20; * Foram avaliadas 18 amostras. Carga parasitária Intensa: média de mais de 10 macrófagos parasitados; Leve a moderada: média de 0,2 a 10 macrófagos parasitados.

Formas amastigotas detectadas em órgãos com carga parasitária intensa são apresentadas na Figura 3.

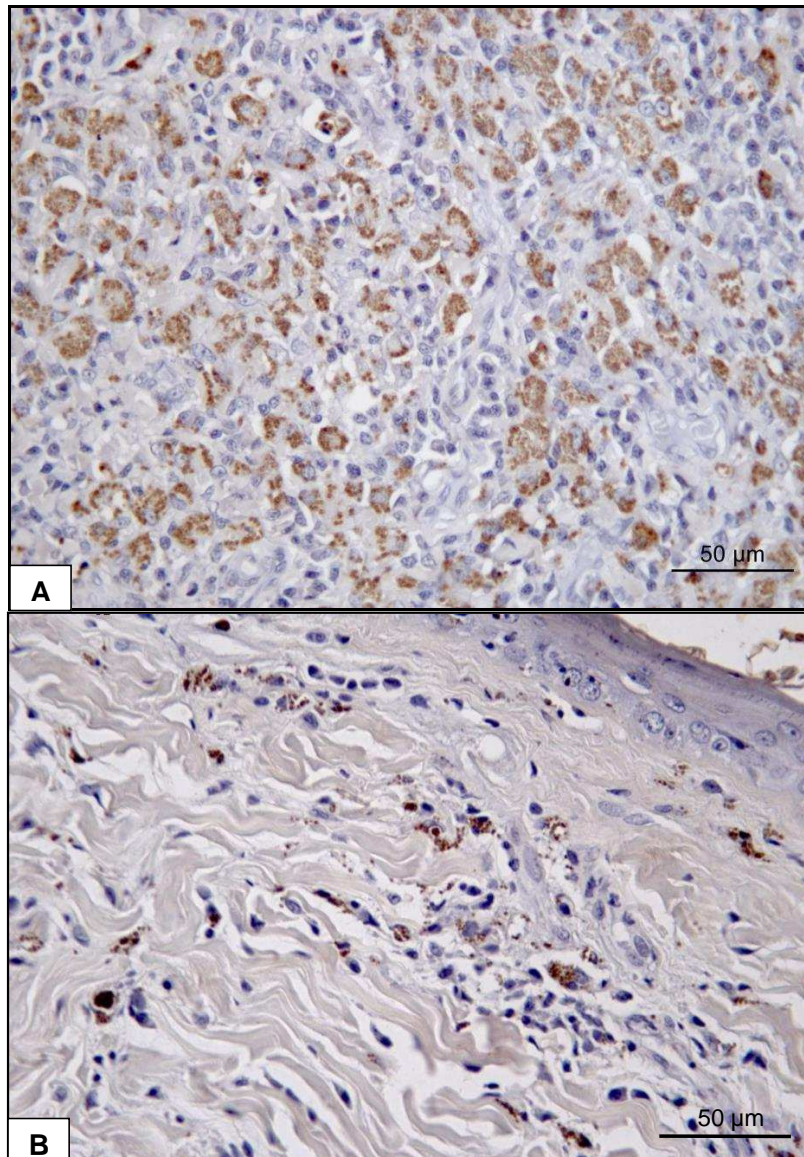


Figura 3 - Órgãos genitais caninos com carga parasitária intensa; A- Glânde, apresentando formas amastigotas de *Leishmania* marcadas em castanho no interior de macrófagos na lâmina própria da uretra; B- Vulva, apresentando formas amastigotas de *Leishmania* marcadas em castanho no interior de macrófagos na derme. Imuno-histoquímica.

5.1 ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS

Considerando os resultados das técnicas de histopatologia e imuno-histoquímica, nos machos, orquite intersticial ocorreu em dez cães (Figura 4A),

acompanhada de epididimite, sendo que oito apresentaram formas amastigotas associadas (Figura 4B). Degeneração e atrofia ocorreram em 10 cães, ausência de espermatogênese em 5 e necrose em 1. Epididimite intersticial (Figura 5A) ocorreu em 15 cães, sendo que 11 apresentaram formas amastigotas associadas (Figura 5B). Balanite com infiltrado inflamatório na lâmina própria (Figura 6A) ou corpo esponjoso ocorreu em 17 cães, 12 apresentaram formas amastigotas associadas, sendo que 2 cães apresentaram amastigotas no epitélio uretral (Figura 6B) e em 1, foi observado úlcera no epitélio. Todos apresentaram postite na lâmina própria e/ou derme e 12 apresentaram formas amastigotas associadas. Prostatite intersticial ocorreu em dez cães e três apresentaram formas amastigotas associadas.

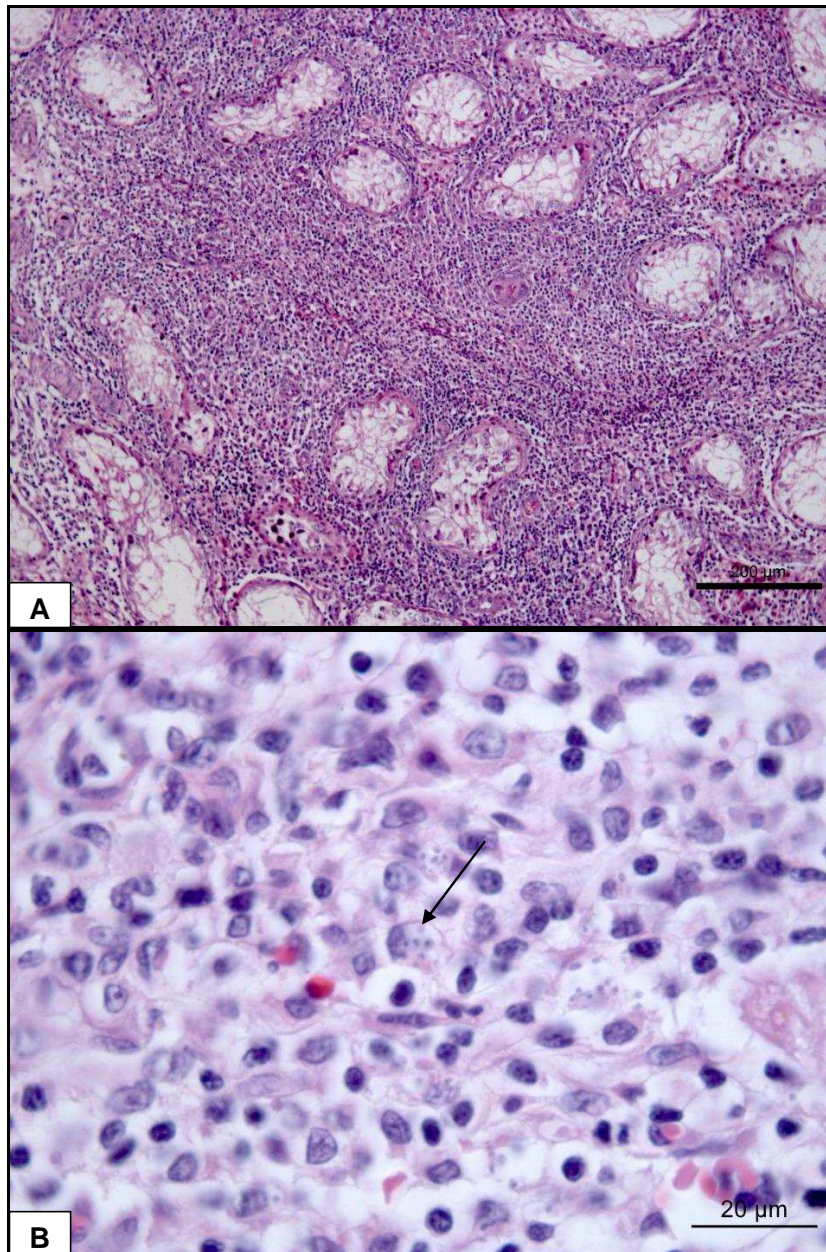


Figura 4- (A-B) Achados histológicos em cães infectados por *L. infantum*; A- Orquite, apresentando infiltrado inflamatório intersticial, difuso e intenso; B- Orquite granulomatosa com presença de linfócitos, plasmócitos e formas amastigotas (seta) no citoplasma de macrófagos; (A,B) Coloração Hematoxilina-eosina.

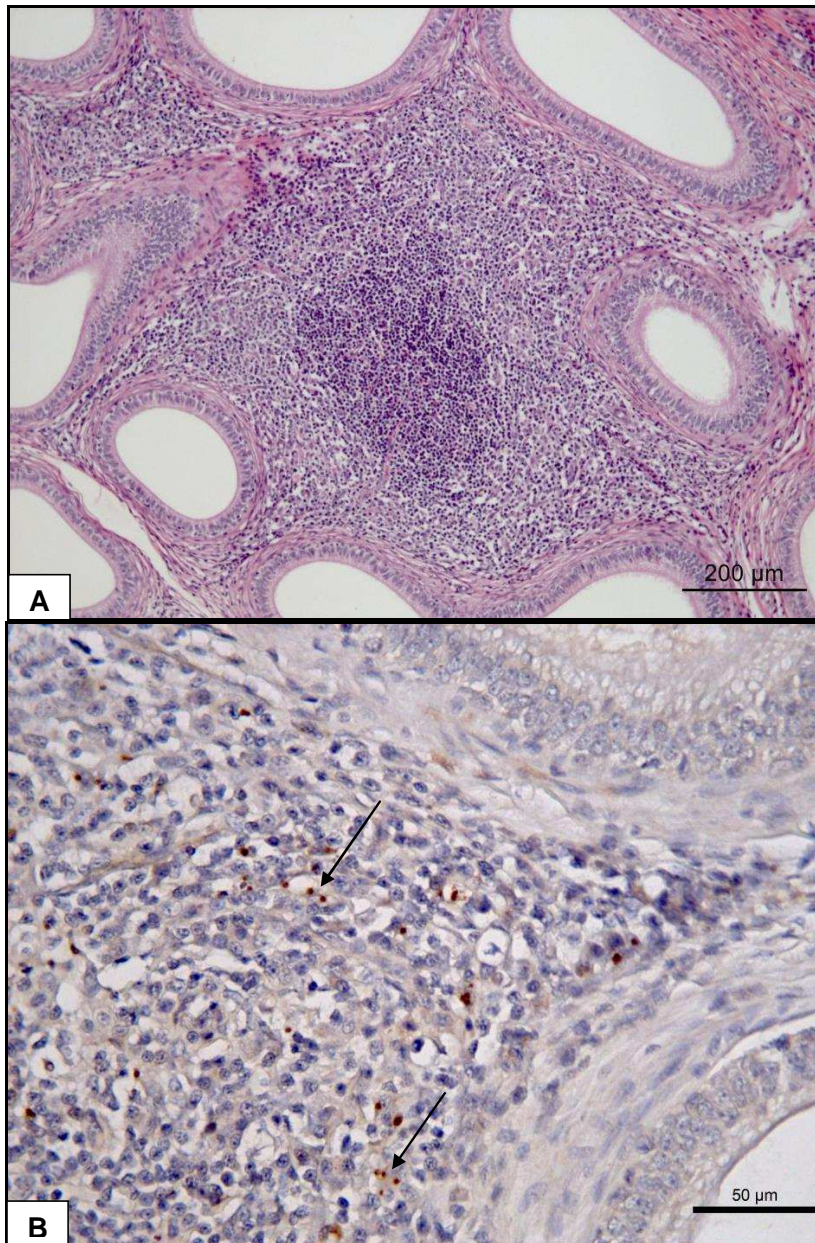


Figura 5- A- Epididimite, apresentando foco inflamatório intersticial acentuado, coloração Hematoxilina-eosina; B- Formas amastigotas (setas) marcadas em castanho no interior de citoplasma de macrófagos, Imuno-histoquímica.

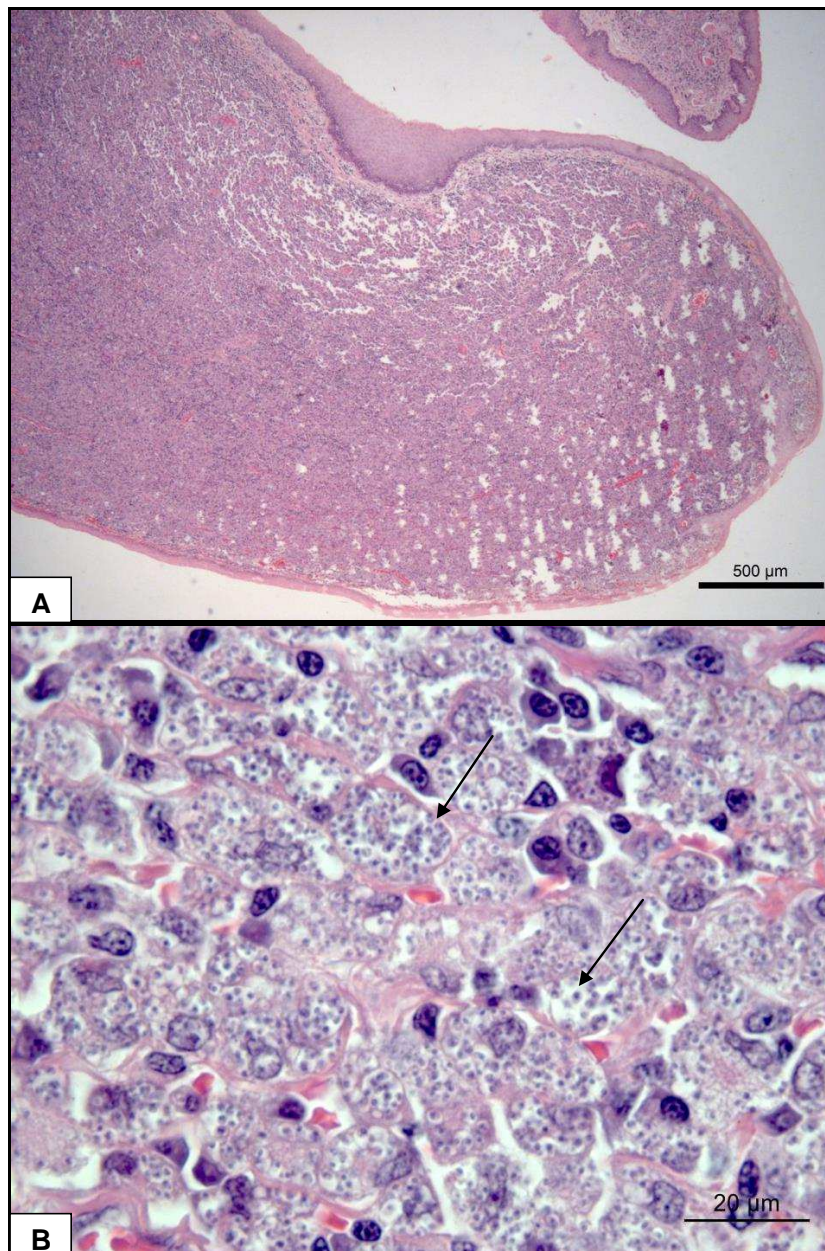


Figura 6- A- Balanite, apresentando infiltrado inflamatório intenso e difuso na lâmina própria da uretra; B- Numerosas formas amastigotas no citoplasma de macrófagos (setas) na lâmina própria da uretra; (A,B) Coloração Hematoxilina-eosina.

Nas fêmeas, inflamação do útero no perimétrio, miométrio e endométrio (Figura 7A) ocorreu em três cadelas e uma apresentou formas amastigotas associadas no endométrio (Figura 7B), sendo as outras duas positivas na cultura. Ooforite no corpo lúteo ocorreu em três cadelas (Figura 8A), duas apresentaram

formas amastigotas associadas (Figura 8B). Salpingite na lâmina própria ocorreu em duas cadelas e duas apresentaram formas amastigotas associadas. Vaginite na derme (Figura 9A) ou lâmina própria ocorreu em 14 cadelas, sendo que 8 apresentaram formas amastigotas associadas (Figura 9B). Vulvite na derme e lâmina própria ocorreu em 18 cadelas e 14 apresentaram formas amastigotas associadas (Figura 10A). Todas apresentaram mamite na derme e/ou no tecido conjuntivo interlobular e intralobular (Figura 10B) ou em torno do seio lactífero da teta, além de exsudato inflamatório no lúmen do seio (Figura 11A). Três cadelas apresentaram macrófagos parasitados por formas amastigotas no lúmen dos seios lactíferos (Figura 11B). Treze cadelas apresentaram formas amastigotas associadas.

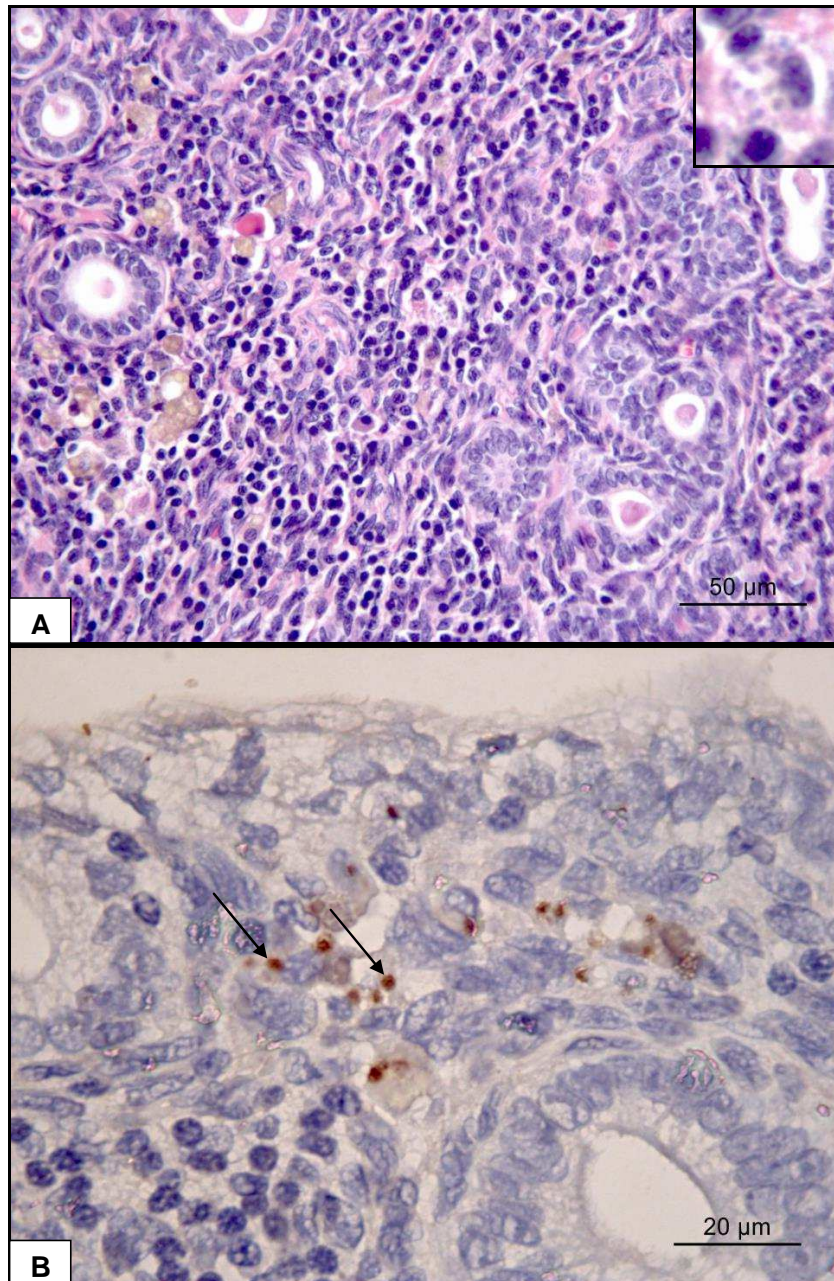


Figura 7- (A,B) Achados histológicos em cadelas infectadas por *L. infantum*; A- Endometrite, apresentando reação inflamatória granulomatosa composta por plasmócitos, linfócitos e macrófagos, contendo formas amastigotas de *Leishmania* (no detalhe), coloração Hematoxilina-eosina; B- Formas amastigotas (setas) marcadas em castanho no citoplasma de macrófagos no endométrio, Imuno-histoquímica.

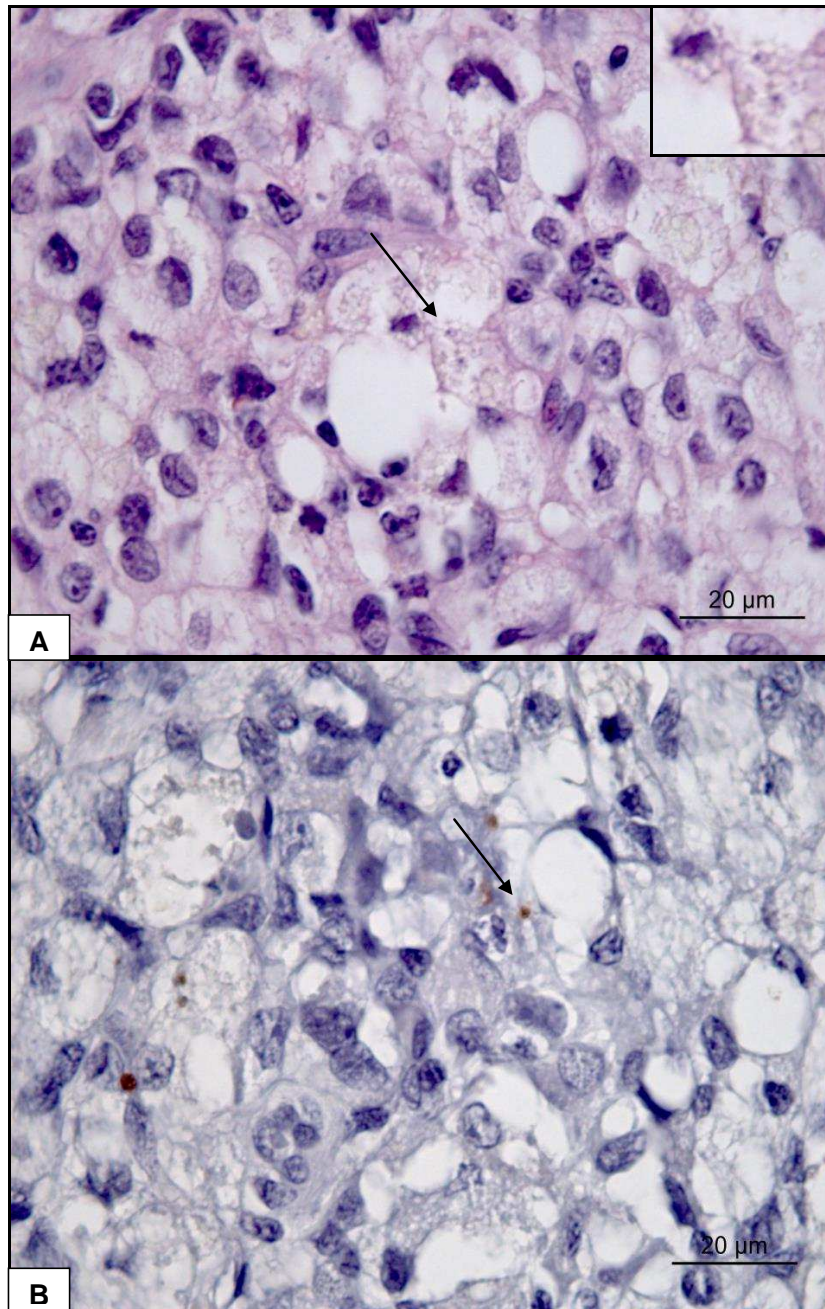


Figura 8- (A,B) Achados histológicos em cadelas infectadas por *L. infantum*; A- Ooforite composta por macrófagos e linfócitos e formas amastigotas de *Leishmania* (seta e detalhe) no corpo lúteo, coloração Hematoxilina-eosina; B- Formas amastigotas (seta) marcadas em castanho no citoplasma de macrófagos no ovário, Imuno-histoquímica.

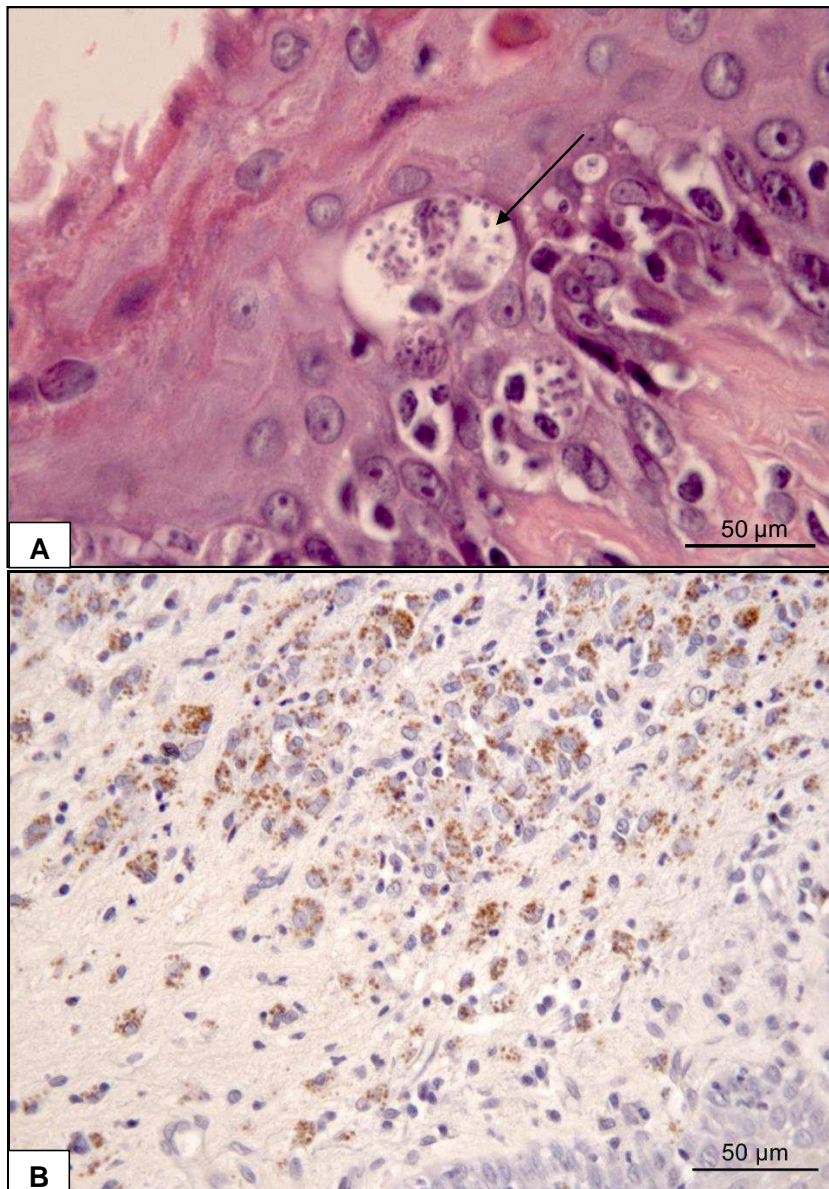


Figura 9- (A,B) Achados histológicos em cadelas infectadas por *L. infantum*; A- Vaginite, apresentando infiltrado inflamatório epitelial e formas amastigotas de *Leishmania* no citoplasma de macrófagos (seta), coloração Hematoxilina-eosina; B- Formas amastigotas marcadas em castanho no citoplasma de macrófagos na vagina, Imuno-histoquímica.

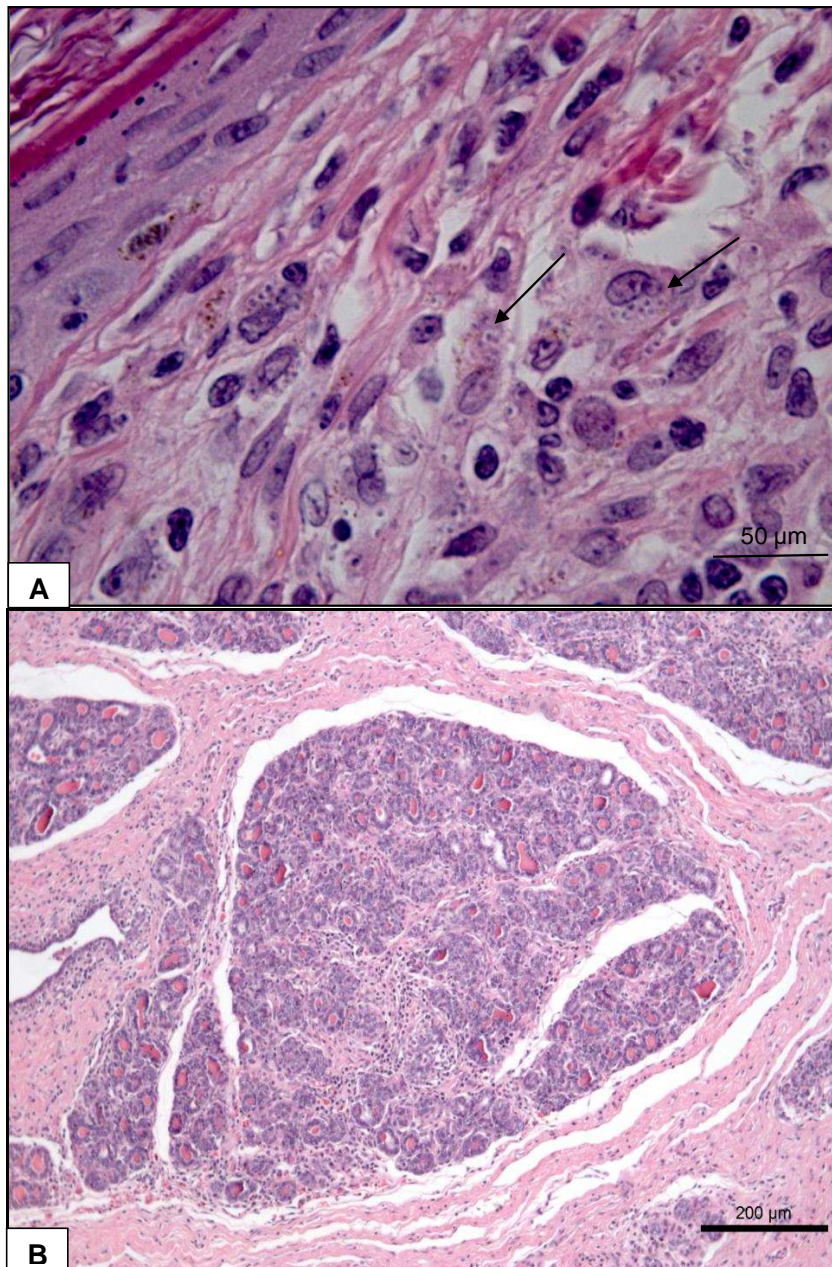


Figura 10- (A,B) Achados histológicos em cadelas infectadas por *L. infantum*; A- Vulvite, apresentando infiltrado inflamatório na derme, composto por macrófagos e linfócitos e numerosas formas amastigotas (setas); B- Mamite, apresentando reação inflamatória no tecido conjuntivo intralobular; (A,B) Coloração Hematoxilina-eosina.

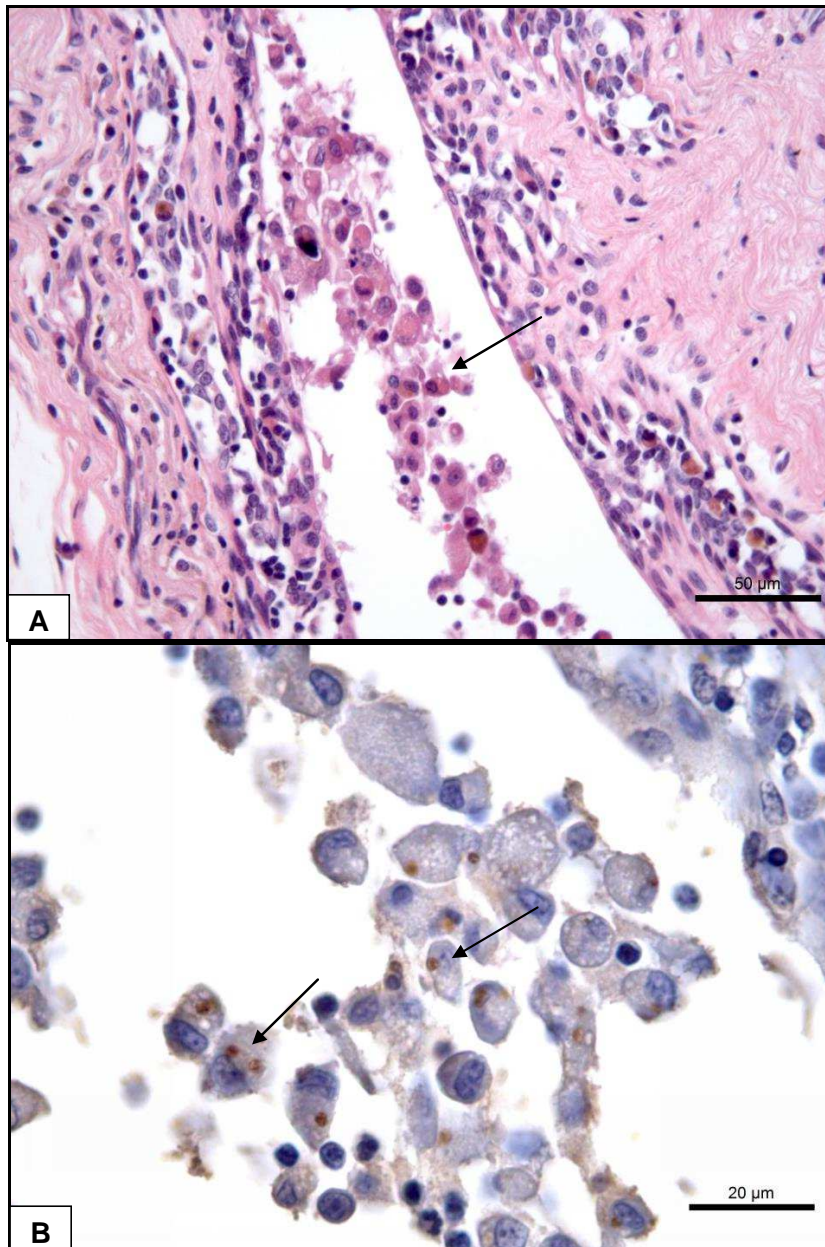


Figura 11- (A,B) Achados histológicos em cadelas infectadas por *L. infantum*; A- Exsudato inflamatório no seio lactífero da glândula mamária, coloração Hematoxilina-eosina; B- Formas amastigotas marcadas em castanho no citoplasma de macrófagos no lúmen do seio lactífero da glândula mamária, Imuno-histoquímica.

Células inflamatórias foram observadas em todos os órgãos avaliados, sendo a mediana e valores mínimo e máximo de cada uma delas descrita na Tabela 4.

Tabela 4 Intensidade dos diferentes tipos de células inflamatórias observados nos órgãos do trato genital e glândula mamária de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, janeiro a julho de 2013 (Barra Mansa, Brasil).

Amostras	Intensidade de células inflamatórias/ mm ²											
	Macrófagos		Plasmócitos		Linfócitos		Neutrófilos		Eosinófilos		TOTAL	
	Med	Min-Max	Med	Min-Max	Med	Min-Max	Med	Min-Max	Med	Min-Max	Med	Min-Max
Testículo	0,5	0-206	0	0-17	14,5	0-321	0	0-13	0	0-0	30,5	0-368
Epidídimo	71	0-200	4,5	0-3	95	0-376	0	0-12	0	0-6	221	0-522
Prepúcio	69	0-174	16,5	2-182	48	6-146	0	0-252	0	0-2	145,5	78-351
Glande	42,5	0-160	13,5	0-95	57	0-160	2,5	0-126	0	0-0	135	0-332
Próstata	0	0-105	0	0-22	8	0-554	0	0-12	0	0-0	17	0-684
Útero	0	0-228	0	0-7	0	0-566	0	0-0	0	0-0	0	0-796
Ovário	0	0-33	0	0-12	0	0-52	0	0-0	0	0-0	0	0-85
Tuba *	0	0-32	0	0-0	0	0-31	0	0-0	0	0-0	0	0-63
Vulva	83	0-153	6,5	0-40	48	0-154	1,5	0-9	0	0-0	153,5	0-327
Vagina	38	0-200	2,5	0-45	24	0-223	0	0-250	0	0-0	79,5	0-374
Mama	68,5	0-213	10	1-161	34	13-145	0	0-4	0	0-39	105	57-337

Med: Mediana; Min-Max: Valores Mínimo-Máximo; * Foram avaliadas 18 amostras.

As frequências da classificação quanto ao tipo e distribuição do infiltrado inflamatório detectado nos diferentes órgãos do trato genital e glândula mamária são descritos na Tabela 5. Um cão classificado como sintomático apresentou infiltrado inflamatório granulomatoso intratubular no testículo.

Tabela 5 Classificação do infiltrado inflamatório nos órgãos do trato genital de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, janeiro a julho de 2013 (Barra Mansa, Brasil).

Amostras	Infiltrado inflamatório					
	Granulomatoso		Não Granulomatoso		Ausente	
	n	%	n	%	n	%
Testículo	9	90	1	10	10	50
Prepúcio	17	85	3	15	0	0
Epidídimo	15	100	0	0	5	25
Glande	11	65	6	35	3	15
Próstata	1	10	9	90	10	50
Útero	3	100	0	0	17	85
Ovário	2	67	1	33	17	85
Tubas Uterinas*	1	50	1	50	16	89
Vulva	17	94	1	6	2	10
Vagina	12	86	2	14	6	30
Mama	18	90	2	10	0	0

n: Número de amostras, considerando um total de 20; * Foram avaliadas 18 amostras.

6. DISCUSSÃO

Os cães estudados classificados como sintomáticos, apresentaram na sua maioria uma elevada ocorrência de *Leishmania* no trato genital, em oposição à ocorrência observada nos assintomáticos, que embora seja inferior foi comprovado que ocorre como já relatado anteriormente (Diniz et al., 2005; Benites et al., 2011). A elevada ocorrência de *Leishmania* no trato genital ocorreu em ambos os sexos, sugerindo que não há tropismo por sexo. Porém, contrariando os achados do presente estudo, os poucos trabalhos publicados sobre o assunto relatam a ocorrência desse parasito como elevada nos machos (Diniz et al., 2005; Benites et al., 2011) e baixa nas fêmeas (Silva et al., 2008, 2009), sugerindo um tropismo de *Leishmania* pelos machos e uma transmissão venérea unidirecional. A baixa frequência de *Leishmania* observada nas fêmeas por Silva et al. (2008, 2009) pode ser explicada pela ocorrência de uma baixa carga parasitária na região genital feminina e a inclusão nesses estudos de cães positivos diagnosticados exclusivamente por métodos sorológicos. Portanto, parte dos cães desses estudos poderia ser falso positiva, uma vez que os métodos sorológicos apresentam falhas de especificidade, podendo haver reações cruzadas com outros tripanosomatídeos como *L. (Viannia) braziliensis*, *Trypanosoma cruzi* (Rosypal et al., 2005b; Troncarelli et al., 2009; Zanette et al., 2013) e *Trypanosoma caninum* (Madeira et al., 2009b).

Nossos resultados indicam que no trato genital masculino, o prepúcio, epidídimo e glande foram as localizações com maior frequência de formas amastigotas e alterações inflamatórias, havendo um predomínio de macrófagos, plasmócitos e linfócitos, como relatado em estudo anterior (Diniz et al., 2005). Além disso, todos os cães com orquite apresentaram quadro de epididimite associado, que é considerado um evento comum, podendo ser explicado em virtude da proximidade anatômica e da continuidade do sistema de ductos destes órgãos (Feldman; Nelson, 1987, Jubb et al., 1993 citados por Thomé et al., 2007, p. 752). Tanto a epididimite quanto a orquite, ocorrem com frequência na maioria das espécies animais, seja por infecção ascendente secundária através do ducto deferente, por meio dos vasos linfáticos do cordão espermático, por disseminação hematogênica e/ou em conjunto com infecção primária do trato urinário. Entretanto, as alterações inflamatórias no epidídimo são consideradas mais comuns do que no

testículo (Thomé et al., 2007; Foster, 2012). Em concordância com esses relatos, no presente estudo foi observada uma menor frequência e intensidade de processo inflamatório testicular em relação ao epididimário, provavelmente devido ao ambiente imunológico diferenciado, que é anti-inflamatório nos testículos. Os macrófagos que são recrutados e mantidos pelas células intersticiais endócrinas (células de Leydig dos testículos) inibem a resposta imune, as respostas mediadas por células, tais como células natural killer, células killer ativadas por linfócito e linfócitos T citotóxicos (Foster, 2013a).

No nosso estudo, é possível que a reação inflamatória testicular, ocorrida pela presença de formas amastigotas, tenha gerado uma obstrução do fluxo de espermatozoides, ocasionando degeneração e atrofia dos túbulos seminíferos. Essas lesões foram observadas na maioria dos cães infectados, estando de acordo com achados anteriores em cães (Diniz et al., 2005; Amara et al., 2009) e em hamsters inoculados experimentalmente com *L. donovani* (Gonzalez et al., 1983). Além disso, essas lesões causadas no testículo, associadas a *L. infantum*, podem causar alterações espermáticas, degeneração de espermatogônia e até azoospermia, sendo possíveis causas de comprometimento reprodutivo dos cães com LV (Gonzalez et al., 1983; Labat et al., 2010). Adicionalmente, após tratamento da leishmaniose, cães infectados apresentam uma melhoria na motilidade dos espermatozoides, concentração e morfologia, provavelmente pela resolução da orquite, restaurando a espermatogênese normal (Assis et al., 2010; Mir et al., 2012).

A concordância moderada de infecção entre testículo e glândula e testículo e epidídimo, sugere a ocorrência de LVC por infecção hematogênica. Entretanto, não deve ser descartada a possibilidade de infecção ascendente por transmissão venérea, que explica possivelmente a ocorrência da orquite intratubular, que por sua vez, não foi detectada por outros autores (Diniz et al., 2005; Amara et al., 2009; Manna et al., 2012). Na literatura, infecção ascendente por algum agente é considerada uma provável causa de orquite intratubular (Foster; Ladds, 2007). Além disso, na cópula com fêmea infectada, infecção ascendente a partir da glândula via uretra associado ao elevado aporte sanguíneo para os corpos cavernosos, é uma possibilidade. A concordância razoável de infecção entre epidídimo e prepúcio e prepúcio e glândula indica que nos cães infectados, geralmente o tecido cutâneo está envolvido, o que explica o acometimento de prepúcio.

Prepúcio e glânde foram os órgãos que apresentaram carga parasitária mais intensa, ainda que em poucos cães, confirmando a razoável concordância de infecção entre os mesmos. A elevada carga observada pode ser devida ao prepúcio ser recoberto por tecido cutâneo, que constitui um sítio frequentemente parasitado na LVC (Madeira et al., 2009a; Verçosa et al., 2012). Além disso, não podemos deixar de mencionar que essa região está exposta a possíveis picadas de flebotomíneos infectados. Além disso, há um estreito contato do prepúcio com a glânde, que por sua vez, pode ter sua elevada carga relacionada ao grande fluxo de sangue que preenche os espaços cavernosos, mantendo o pênis alongado e dilatado durante a cópula (Brinsko, 2004).

A elevada frequência de alterações inflamatórias e intensa carga de macrófagos, contendo amastigotas na glânde e prepúcio associadas à presença de ulcerações e amastigotas no epitélio uretral, podem ter contribuído para a eliminação de *Leishmania* no sêmen.

O isolamento de *L. infantum* no líquido seminal pela cultura parasitológica no presente estudo e no sêmen de cães experimentalmente infectados (Riera; Valladares, 1996) indica a viabilidade do parasito nesses fluidos, sugerindo a possibilidade de transmissão venérea. Além desses achados, DNA de *Leishmania* sp. foi detectado no sêmen de cães naturalmente infectados (Diniz et al., 2005). A reprodução natural em cães pode gerar feridas traumáticas de tipos e gravidade variados, resultantes de lesões durante a cópula, aumentando a possibilidade de transferência de amastigotas de órgãos genitais externos, além de formas amastigotas eliminadas a partir do sêmen (Diniz et al., 2005; Foster, 2013a). A frequência do achado no líquido seminal pode ter sido subestimada por conta da contaminação microbiológica da cultura parasitológica de alguns animais. A ocorrência de contaminação da cultura é uma das desvantagens dessa técnica e pode estar relacionada a falhas de assepsia durante a coleta (Maia et al., 2008).

No presente estudo, a próstata foi o órgão menos parasitado no trato genital masculino, com visualização de raras formas amastigotas pela técnica de imunohistoquímica, estando de acordo com outros autores (Diniz et al., 2005). Além disso, o infiltrado do tipo granulomatoso ocorreu em apenas um cão, provavelmente pela baixa carga parasitária. Estudos anteriores não associaram prostatite a LV em cães (Diniz et al., 2005; Benites et al., 2011). Entretanto, foi relatado um cão com

prostatite intersticial macrofágica e plasmocítica associada à presença de raras amastigotas consistentes com *Leishmania* e com sorologia negativa para *B. canis* como diagnóstico diferencial (Mir et al., 2012). Neste caso, a prostatite foi considerada secundária a infecção por *L. infantum* diagnosticada por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR). No nosso estudo, a elevada frequência de prostatite não granulomatosa com predominância de linfócitos, associada à baixa frequência do parasitismo podem ser devidos a outros agentes, possivelmente os envolvidos em infecções bacterianas como *Escherichia coli* e *B. canis* (Corrente et al., 2010; Barsanti, 2012). Refluxo de urina para glândula prostática causando uma reação inflamatória por ação de substâncias químicas, pode ser uma possível causa de prostatite, sem envolvimento bacteriano (Barsanti, 2012).

Nas fêmeas, todos os segmentos do trato genital apresentaram positividade para *Leishmania* nas técnicas histológicas. Outros autores observaram formas amastigotas exclusivamente na vulva e vagina (Silva et al., 2008), porém DNA de *Leishmania* foi detectado a partir de todos os segmentos do trato genital (Silva et al., 2008; Silva et al., 2009). Em nosso estudo, a vulva foi o tecido com maior frequência de formas amastigotas, intensidade do infiltrado inflamatório e carga parasitária mais intensa do trato genital feminino, provavelmente por ser coberta por tecido cutâneo, que é frequentemente parasitado em cães com LV (Madeira et al., 2009a; Verçosa et al., 2012). A vagina também teve uma alta frequência de parasitismo com infiltrado inflamatório granulomatoso associado. Esses resultados sugerem que a reação inflamatória desses órgãos foi causada por *L. infantum*, sugerindo a possibilidade de transmissão venérea, diferindo dos resultados de Silva et al. (2008). Esses autores encontraram uma carga parasitária de leve a moderada na vulva e leve na vagina, com uma baixa frequência de parasitismo, sugerindo que a reação inflamatória observada nesses órgãos não foi causada por *Leishmania*. Ademais, o elevado parasitismo detectado na vulva e vagina sugere que a possível transmissão venérea provavelmente não seja unidirecional, discordando de outros autores que propõem que a transmissão seja dos machos para as fêmeas susceptíveis (Silva et al., 2009).

No útero, foi pela primeira vez isolado o parasito *L. infantum* e detectadas suas formas amastigotas nesse órgão pelas técnicas histológicas. Outros autores já haviam reportado apenas a detecção de DNA de *Leishmania* sp. nesse órgão

(Rosypal et al., 2005a; Silva et al., 2008). Em outros relatos, não foram detectadas amastigotas e nem DNA de *Leishmania* no útero de cadelas natural e experimentalmente infectadas (Andrade et al., 2002; Da Silva et al., 2009; Silva et al., 2009). A frequência de parasitismo e a intensidade do infiltrado inflamatório nesse órgão foram baixas e um infiltrado inflamatório granulomatoso esteve presente em um útero parasitado, sugerindo a associação dessas lesões com o parasitismo por *Leishmania*. Nos outros dois casos, onde o útero foi positivo somente na cultura, sem observação de infiltrado inflamatório, sugere uma baixa carga parasitária e uma maior sensibilidade presente na cultura comparada às técnicas histológicas (Madeira et al., 2006). No presente estudo, a detecção de *L. infantum* no útero indica a possibilidade de transmissão vertical de LVC, particularmente nos animais da área estudada. A transmissão vertical de *L. infantum* já foi comprovada experimental e naturalmente (Rosypal et al., 2005a; Da Silva et al., 2009; Pangrazio et al., 2009, Ben Slimane et al., 2014).

No ovário e tubas uterinas, foram detectadas pela primeira vez formas amastigotas pelas técnicas histológicas. Outros autores não observaram formas amastigotas nesses órgãos (Silva et al., 2008; Silva et al., 2009), porém DNA de *Leishmania* já foi detectado (Silva et al., 2008). A ocorrência de ooforite e a presença de formas amastigotas somente no corpo lúteo sugere uma possível predileção da *Leishmania* por essa estrutura no ovário. Tal hipótese pode ser devida ao sistema vascular que é formado após ruptura folicular, sustentando o crescimento e a diferenciação celular ocorrida no corpo lúteo, sendo um local propício à permanência de formas amastigotas (Stabenfeldt; Davidson, 2004).

A concordância razoável de infecção entre vulva e vagina pode ser devido à proximidade destas estruturas, e indica assim como nos machos, que em cadelas infectadas, geralmente o tecido cutâneo está envolvido, o que explica o acometimento da vulva. E a concordância razoável de infecção entre útero e tubas uterinas, pode ser devida também à proximidade destas estruturas, além de qualquer infecção uterina geralmente ser acompanhada do envolvimento das tubas uterinas (Foster, 2013b).

No nosso estudo, mamite foi uma constante nas cadelas e a maioria apresentou formas amastigotas associadas e a sua presença no interior de macrófagos dos seios lactíferos indica a possibilidade de eliminação pelo leite. Há

somente um relato da descrição de formas amastigotas na glândula mamária, no qual o parasitismo foi detectado de secreção mamária pelas técnicas de citologia e imuno-histoquímica, sendo a espécie identificada como *L. infantum* por PCR (Metzdorf et al., 2014), reforçando a hipótese de eliminação desse parasito no leite. Nos humanos, em raros casos de LV pode ocorrer o envolvimento da mama, ocasionando nódulos mamários (Geramizadeh; Vasei, 2007; Alimoglu et al., 2009). Esses achados são importantes, pois levantam a hipótese sobre uma possível transmissão transmamária, sendo necessários estudos mais aprofundados sobre essa forma de transmissão, já suposta por outros autores (Gibson-Corley et al., 2008; Boggiatto et al., 2011), e sua relevância na epidemiologia da LV.

A ocorrência de um cão com positividade apenas na glândula e pele da escápula, sugere que a infecção do trato genital pode ocorrer sem o envolvimento visceral ou sistêmico, ou pelo menos com uma carga parasitária baixa no baço, medula óssea e linfonodos, que não permitiu a detecção pela cultura parasitológica. Nesse cão, a infecção pode ter ocorrido por picadas de flebotômíneos infectados diretamente na glândula, quando essa estava exposta, ou por transmissão venérea pelo contato da glândula com a mucosa vaginal de cadela infectada durante a cópula.

No geral, os tipos celulares predominantes nos infiltrados inflamatórios presentes no trato genital dos cães infectados foram macrófagos, plasmócitos e linfócitos, estando de acordo com outros autores (Diniz et al., 2005; Benites et al., 2011). Neutrófilos foram poucos, tendo sido detectados com maior frequência no prepúcio, glândula e vagina, não estando possivelmente associados à infecção por *Leishmania* e sim, a uma susceptibilidade a coinfeções bacterianas. Os eosinófilos foram raros, sendo detectados no epidídimo, prepúcio e predominando na glândula mamária que é considerado um achado comum em lesões mamárias e durante resposta alérgica a algum corpo estranho (Sangha; Singh, 2012).

Em relação às técnicas de diagnóstico utilizadas, a imuno-histoquímica se mostrou mais sensível, sendo a melhor técnica para a detecção de formas amastigotas no trato genital e glândula mamária em comparação a histopatologia, como era esperado, estando de acordo com outros autores (Diniz et al., 2005; Silva et al., 2008). A hibridização *in situ* foi uma técnica útil para detecção de formas amastigotas no útero e testículos, porém apresentou um mau desempenho no epidídimo se comparado a imuno-histoquímica e histopatologia, podendo ser

explicado pelo dano tecidual observado especificamente nesse órgão. Esse dano tecidual pode ter sido causado pelas etapas de tratamento proteolítico e pela elevada temperatura do condicionamento celular, além das características histológicas do epidídimo, que é composto por uma rede de ductos envolvidos por tecido conjuntivo. Na imuno-histoquímica, devido a ausência de tratamento proteolítico e pela recuperação antigênica ser realizada à temperatura de 65°C, o tecido fica mais preservado. Portanto, o protocolo da hibridização *in situ* para epidídimo deve ser revisto, visando uma menor destruição tecidual. Apesar dessa desvantagem, a hibridização *in situ* é mais específica do que a imuno-histoquímica, permitindo identificar a espécie *L. infantum* com o uso de sonda específica.

Os achados desse estudo dão suporte para novos desafios e considerações sobre o controle da transmissão de LVC. Dessa forma, o potencial epidemiológico da transmissão venérea e vertical deve ser considerado, principalmente em áreas endêmicas. Cães dessas regiões, uma vez utilizados na reprodução podem favorecer a disseminação da doença. Além disso, a disseminação, inclusive para áreas livres da doença, pode ser facilitada pela permanência de cães infectados em canis, importação de cadelas matrizes reprodutoras infectadas e pela utilização de sêmen infectado na inseminação artificial. Portanto, a castração de cães errantes e a realização de exames para diagnóstico e monitoramento da infecção por *L. infantum* em cães de canis voltados para reprodução, assim como no sêmen desses cães, são medidas que devem ser adotadas, visando um melhor controle da doença.

7. CONCLUSÕES

☐ Cães sintomáticos apresentaram uma maior ocorrência de parasitismo no trato genital, se comparado aos assintomáticos;

☐ Foi comprovada a presença de formas viáveis de *L. infantum* no líquido seminal, testículo e útero pela primeira vez em cães naturalmente infectados;

☐ Todos os segmentos do trato genital masculino e feminino além da glândula mamária feminina apresentaram formas amastigotas de *Leishmania* em pelo menos uma das técnicas histológicas;

☐ Formas amastigotas foram descritas pela primeira vez no útero, ovário, tuba uterina e glândula mamária;

☐ A imuno-histoquímica foi o método mais efetivo para a detecção de formas amastigotas no trato genital e glândula mamária em comparação a histopatologia;

☐ A hibridização *in situ* apesar do mau desempenho nas amostras de epidídimo se mostrou útil na detecção de formas amastigotas nas amostras de testículo e útero, permitindo identificar a espécie *L. infantum* com o uso de sonda específica;

☐ A histopatologia ainda que pouco sensível para a detecção das formas amastigotas, foi fundamental para identificar as lesões associadas e correlacioná-las com o parasitismo;

☐ Prepúcio e glande e vulva, seguida da vagina foram os órgãos que apresentaram carga parasitária mais intensa no trato genital masculino e feminino, respectivamente;

☐ Alterações inflamatórias no trato genital feminino ocorreram principalmente na vulva, seguida da vagina;

☐ No trato genital masculino, os principais locais da ocorrência de alterações inflamatórias foram o epidídimo, glândula e prepúcio;

☐ No trato genital feminino, o grau de concordância de infecção foi razoável entre vulva e vagina e útero e tubas;

☐ No trato genital masculino, o grau de concordância de infecção foi moderado entre testículo e glândula e testículo e epidídimo;

☐ A ocorrência de *Leishmania* no trato genital de cães de ambos os sexos foi bastante elevada na área estudada, não havendo tropismo por sexo e indicando a possibilidade de transmissão venérea bidirecional e vertical;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alimoglu E, Ceken K, Cassano E, Durum Y, Pestereli E. Breast involvement in visceral leishmaniasis. *J Clin Ultrasound*. 2009; 37(9): 531-3.
- Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML, Alves LC, Berne ME, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol*. 2005; 127(3-4):227-32.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012; 7(5):e35671.
- Amara A, Mrad I, Melki MK, Mrad MB, Rejeb A. Etude histologique des lésions testiculaires chez les chiens leishmaniens. *Revue Méd Vét*. 2009; 160(1): 54-60.
- Andrade HM, de Toledo Vde P, Marques MJ, França Silva JC, Tafuri WL, Mayrink W, et al. *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. *Vet Parasitol*. 2002; 103(1-2):71-81.
- Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*. 2000; 12-13:1269-81.
- Assis VP, Ribeiro VM, Rachid MA, Castro AC, Valle GR. Dogs with *Leishmania chagasi* infection have semen abnormalities that partially revert during 150 days of Allopurinol and Amphotericin B therapy. *Anim Reprod Sci*. 2010; 117(1-2):183-6.
- Aste N, Pau M, Aste N, Biggio P. Leishmaniasis of the prepuce. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2002; 16(1): 93-4.
- Baneth G, Solano-Gallego L. Leishmaniasis. In: Greene CE, editor. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4th ed. St Louis, MO: Elsevier/Saunders; 2012. p. 734-49.
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*. 2008; 24(7):324-30.
- Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol*. 2007; 64:1-109.
- Barata RA, Peixoto JC, Tanure A, Gomes ME, Apolinário EC, Bodevan EC, et al. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in a Reemerging Focus of Intense Transmission in Minas Gerais State, Brazil. *BioMed Res Int*. 2013; 2013(2013):1-6.

Barbosa-de-Deus R, Mares-Guia ML, Nunes AZ, Costa KM, Junqueira RG, Mayrink W, et al. Leishmania major-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol. 2002; 9(6): 1356–61.

Barsanti JA. Genitourinary Infections. In: Greene CE, editor. Infectious Diseases of the Dog and Cat. 4th ed. St Louis, MO: Elsevier/Saunders; 2012. p. 1031-32.

Benites AP, Fernandes CE, Brum KB, Abdo MAGS. Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de cães. Pesq Vet Bras. 2011; 31(1): 72-7.

Ben Slimane T, Chouih E, Ben Hadj Ahmed S, Chelbi I, Barhoumi W, Cherni S, et al. An investigation on vertical transmission of *Leishmania infantum* in experimentally infected dogs and assessment of offspring's infectiousness potential by xenodiagnosis. Vet Parasitol. 2014; 206(3-4): 282-6.

Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, Gallup JM, Hostetter JM, Mullin K, et al. Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5(4): e1019.

Boraschi CSS, Nunes CM. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. Clin Vet. 2007; 71(1): 44-8.

Brinsko SP. Fisiologia reprodutiva do macho. In: Cunningham JG, editor. Tratado de Fisiologia Veterinária. 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 432-34.

Cabrera MAA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Silva AVM, et al. Canine Visceral Leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. Rev Inst Med trop S Paulo. 2003; 45(2): 79-83.

Camargo-Neves VL, Katz G, Rodas LA, Poletto DW, Lage LC, Spínola RMF et al. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana, Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. Cad de Saúde Pública. 2001; 17(5): 1263-7.

Cardim MFM, Rodas LAC, Dibo MR, Guirado MM, Oliveira AM, Chiaravalloti-Neto F. Introdução e expansão da Leishmaniose visceral americana em humanos no estado de São Paulo, 1999-2011. Rev Saúde Pública. 2013; 47(4):691-700.

Carson FL, Hladick C. Histotechnology: a self instructional text, 3 rd ed. ASCP Press Chicago, IL. 2009.

Castro-Júnior JG, ML Freire, Campos SPS, Scopel KKG, Porrozzi R, Da Silva ED, et al. Evidence of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs from Juiz de Fora, Minas Gerais state, Brazil, based on immunochromatographic dual-path platform (DPP®) and PCR assays. Rev Inst Med trop S Paulo. 2014; 56(3): 225-29.

Corrente M, Franchini D, Decaro N, Greco G, D'Abramo M, Greco MF, et al. Detection of *Brucella canis* in a dog in Italy. New Microbiol. 2010; 33(4):337-41.

Coura-Vital W, Marques MJ, Veloso VM, Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, Reis LES, et al. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5(8): e1291.

Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. Am J Trop Med Hyg. 1994; 50:296-311.

Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. Parasit Vectors. 2009; 2(1):S1.

Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Vet Parasitol. 2007; 149: 139–46.

Da Silva AS, França RT, Richini-Pereira VB, Langoni H, Monteiro SG, Lopes STA. First Autochthonous Case of Canine Visceral Leishmaniasis in the Center of Rio Grande do Sul State, Brazil. Acta Sci Vet. 2011; 39(2): 1-4.

Da Silva SM, Ribeiro VM, Ribeiro RR, Tafuri WL, Melo MN, Michalick MS. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. Vet Parasitol. 2009; 166(1-2):159-62.

De Almeida ME, Steurer FJ, Koru O, Herwaldt BL, Pieniazek NJ, Silva AJ. Identification of *Leishmania* spp. by molecular amplification and DNA sequencing analysis of a fragment of rRNA internal transcribed spacer 2. J Clin Microbiol. 2011; 49(9): 3143–9.

De Campos MP, da Silva DA, Madeira MF, Júnior AAMV, Figueiredo FB. First autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in Volta Redonda, Rio de Janeiro, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2013; 22(3):424-6.

De Freitas E, Melo MN, da Costa-Val AP, Michalick MS. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. Vet Parasitol. 2006; 137(1-2):159-67.

Delgado O, Castes M, White AC, Kreutzer RD. *Leishmania colombiensis* in Venezuela. Am J Trop Med Hyg. 1993; 48: 145–7.

De Paula CC, Figueiredo FB, Menezes RC, Mouta-Confort E, Bogio A, Madeira MF. Leishmaniose visceral canina em Maricá, Estado do Rio de Janeiro: relato do primeiro caso autóctone. Rev Soc Bras MedTrop. 2009; 42(1): 77-8.

Dereure J, Espinel I, Barrera C, Guerrini F, Martini A, Echeverria R, et al. Leishmaniasis in Ecuador. 4. Natural infestation of the dog by *Leishmania panamensis*. Ann Soc Belg Med Trop. 1994; 74(1): 29-33.

Dinhopl N, Mostegl MM, Richter B, Nedorost N, Maderner A, Fagner K, Weissenböck H. In situ hybridisation for the detection of *Leishmania* species in

paraffin wax-embedded canine tissues using a digoxigenin-labelled oligonucleotide probe. *Vet Rec.* 2011; 169(20):525.

Diniz SA, Melo MS, Borges AM, Bueno R, Reis BP, Tafuri WL, et al. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Vet Pathol.* 2005; 42(6): 650-8.

Dubey JP, Rosypal AC, Pierce V, Scheinberg SN, Lindsay DS, Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 2005; 227(8): 1266-69.

Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA, Kirchhoff LV, Jackson JE, Rowton ED, et al. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12(3):440-6.

Erdtmann-Vourliotis M, Mayer P, Riechert U, Händel M, Kriebitzsch J, Höllt V. Rational design of oligonucleotide probes to avoid optimization steps in in situ hybridization. *Brain Res Brain Res Protoc.* 1999; 4: 82-91.

Faria AR, Andrade HM. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Rev Pan-Amaz Saúde.* 2012; 3(2):47-57.

Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Perri SHV. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba-SP (Brasil). *Clín Vet.* 2000; 5(28):36-44.

Ferreira SA, Leite RS, Ituassu LT, Almeida GG, Souza DM, Fujiwara RT, et al. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(4): e1596.

Figueiredo FB, Filho CJLB, Schubach EYP, Pereira SA, Nascimento LD, Madeira MF. Relato de caso autóctone de leishmaniose visceral canina na zona sul do município do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010a; 43(1):98-9.

Figueiredo FB, Madeira MF, Menezes RC, Pacheco RS, Pires MQ, Furtado MC, et al. Efficacy of an indirect immunofluorescence test in the diagnosis of canine leishmaniosis. *Vet J.* 2010b; 186(1):123-124.

Figueiredo FB, Madeira MF, Nascimento LD, Abrantes TR, Mouta-Confort E, Passos SRL, et al. Canine visceral leishmaniasis: study of methods for the detection of igg in serum and eluate samples. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2010c; 52(4):193-96.

Foster RA. Sistema reprodutor do macho. In: Zachary JF, McGavin MD, editors. *Bases da patologia em veterinária.* 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013a. p. 1132-34.

Foster RA. Sistema reprodutor da fêmea e glândula mamária. In: Zachary JF, McGavin MD, editors. Bases da patologia em veterinária. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013b. p. 1090-95.

Foster RA. Common lesions in the male reproductive tract of cats and dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2012; 42(3):527-45.

Foster RA, Ladds PW. Male genital system. In: Maxie MG, editor. *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals.* 5th ed. Toronto: Saunders Ltd; 2007. v. 3, p. 584-89.

Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2006; 137(3-4): 214–21.

Galletti E, Bonilauri P, Bardasi L, Fontana MC, Ramini M, Renzi M, et al. Development of a minor groove binding probe based real-time PCR for the diagnosis and quantification of *Leishmania infantum* in dog specimens. *Res Vet Sci.* 2011; 91(2): 243-5.

Gaskin AA, Schantz P, Jackson J, Birkenheuer A, Tomlinson L, Gramiccia M, et al. Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. *J Vet Intern Med.* 2002; 16(1): 34-44.

Geramizadeh B, Vasei M. Fine needle aspiration of a breast mass in visceral leishmaniasis. *Acta Cytol.* 2007; 51(3):499-500.

Gibson-Corley KN, Hostetter JM, Hostetter SJ, Mullin K, Ramer-Tait AE, Boggiatto PM, et al. Disseminated *Leishmania infantum* infection in two sibling foxhounds due to possible vertical transmission. *Can Vet J.* 2008; 49: 1005-8.

Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA, et al. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol.* 2006; 135: 100–7.

Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FGC, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J.* 2008; 175(1):45-52.

Gontijo CM, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev bras epidemiol.* 2004; 7(3):1-12.

Gonzalez JL, Gallego E, Castaño M, Rueda A. Testicular amyloidosis in hamsters experimentally infected with *Leishmania donovani*. *Br J Exp Pathol.* 1983; 64(5):518-23.

Gradoni L. The diagnosis of canine leishmaniasis. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Seville, Spain. 2002; 7–14.

Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol.* 2005; 35: 1169-80.

Grimaldi Jr G, Teva A, Ferreira AL, Santos CB, Souza Pinto I, Azevedo CT, et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP[®] CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012; 106(1): 54-59.

Gyuranecz M, Szeredi L, Rónai Z, Dénes B, Dencsó L, Dán A, et al. Detection of *Brucella canis*-induced reproductive diseases in a kennel. *J Vet Diagn Invest.* 2011; 23:143-7.

Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CH. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol.* 2011; 27(9): 403-9.

Harris MP. Suspected transmission of leishmaniasis. *Vet Rec.* 1994; 135(14): 339.

Hollett RB. Canine brucellosis: outbreaks and compliance. *Theriogenology.* 2006; 66:575-87.

Kapila K, Prakash MB, Mehrota R, Verma K. Testicular leishmaniasis in a boy with acute lymphoblastic leukemia. *Acta Cytol.* 1994; 38(5): 878-9.

Karkamo V, Kaistinen A, Näreaho A, Dillard K, Vainio-Siukola K, Vidgrén G, et al. The first report of autochthonous non-vector-borne transmission of canine leishmaniosis in the Nordic countries. *Acta Vet Scand.* 2014; 56(1):84.

Koutinas AF, Koutinas CK. Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Vet Pathol.* 2014; 51(2): 527-38.

Labat É, Carreira JT, Matsukuma BH, Martins MTA, Lima VMF, Bomfim SEM, et al. Qualidade espermática de sêmen de cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2010; 62(3): 609-14.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editores. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press; 1987. v. 1, p. 1-120.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977; 33: 159-74.

Levy E, Mylonakis ME, Saridomichelakis MN, Polizopoulou ZS, Psychogios V, Koutinas AF. Nasal and oral masses in a dog. *Vet Clin Pathol.* 2006; 35(1):115-8.

Lombardo G, Pennisi MG, Lupo T, Migliazzo A, Capri A, Solano-Gallego L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. *Vet Parasitol.* 2012; 184(1): 10-17.

Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AGS, Nascimento LD, Furtado M, Mouta-Confort E, et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? *Res Vet Sci.* 2009a; 87(2): 260-2.

Madeira MF, Sousa MA, Barros JH, Figueiredo FB, Fagundes A, Schubach A, et al. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil *Parasitology.* 2009b; 136: 411–23.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Pereira AS, Figueiredo FB, Baptista C, et al. *Post mortem* parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol.* 2006; 138(3-4):366- 70.

Maia C, Campino L. Cytokine and Phenotypic Cell Profiles of *Leishmania infantum* Infection in the Dog. *J Trop Med.* 2012; 2012: 1-7.

Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol.* 2008; 158(4):274-87.

Maia C, Nunes M, Campino L. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008; 8(4):555-60.

Maia-Elkyhoury ANS, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saúde Pública.* 2008; 24(12):2941-47.

Mancianti F, Pedonese F, Poli A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Vet Parasitol.* 1996; 65 (1-2): 1-9.

Manna L, Paciello O, Morte RD, Gravino AE. Detection of *Leishmania* parasites in the testis of a dog affected by orchitis: case report. *Parasit Vectors.* 2012; 5:216.

Manna L, Reale S, Vitale F, Gravino AE. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res Vet Sci.* 2009; 87(1): 76–8.

Marchal SA, Marchal T, Moore PF, Magnol JP, Bourdoiseau G. Infection of canine Langerhans cells and interdigitating dendritic cells by *Leishmania infantum* in spontaneous canine leishmaniasis. *Rev Med Vet.* 1997; 148: 29-36.

Martinez V, Quilez J, Sanchez A, Roura X, Francino O, Altet L. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasit Vectors.* 2011; 4(57): 1-5.

Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(11): 5249–55.

Masucci M, De Majo M, Contarino RB, Borruto G, Vitale F, Pennisi MG. Canine leishmaniasis in the newborn puppy. *Vet Res Commun.* 2003; 27(1): 771-4.

Mekuzas Y, Gradoni L, Oliva G, Manzillo VF, Baneth G. *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* co-infection: a 3-year longitudinal study in naturally exposed dogs. Clin Microbiol Infect. 2009;15(suppl 2): 30–1.

Mello CX, Mendes Junior AAV, Furtado MC, Miranda LFC, Figueiredo FB, Madeira MF. Outbreak of canine visceral leishmaniasis in Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2014; 47(6): 1-3.

Menezes RC, Figueiredo FB, Wise AG, Madeira MF, Oliveira RVC, Schubach TMP, et al. Sensitivity and specificity of in situ hybridization for the diagnosis of cutaneous infection by *Leishmania infantum* in dogs. J Clin Microbiol. 2013; 51(1):206-11.

Metzdorf IP, Moura FSV, Franco PA, Correia EL, Lima Junior MSC, Matos MFC, et al. Primeira identificação de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em secreção mamária canina. In: Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária; 2014 out 21-24; Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil.

Ministério da Saúde [homepage na Internet]. Leishmaniose visceral-Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação-Sinan Net. [acesso em 14 jul 2014]. Disponível em: www.saude.gov.br/sinanweb.

Ministério da Saúde [homepage na Internet]. Indicadores epidemiológicos-Leishmaniose visceral. [acesso em 14 jul 2014a]. Disponível em: www.saude.gov.br/sage.

Ministério da Saúde. Nota técnica nº 5/2012 - GDTVZ/DTI/CVE/SVEA/SVS-SES RJ. Intensificação da Vigilância para Leishmaniose Visceral no Estado do Rio de Janeiro. 2012:1-4.

Ministério da Saúde (Brasil). Portaria nº104 de 25 de janeiro de 2011. Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme o disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional e estabelece fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde. Diário Oficial da União. 26 jan 2011; Seção 1.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2ª ed. atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 2010a. 180 p. il. – (Serie A. Normas e Manuais Técnicos).

Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias : guia de bolso / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 8ª ed. rev. Brasília : Ministério da Saúde. 2010b. 444 p. Il. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

Ministério da Saúde (Brasil). Portaria nº 1.426, de 11 de julho de 2008 Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não

registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União. 14 jul 2008; Seção 1.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica: Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde. 2006.120p.

Mir F, Fontaine E, Reyes-Gomez E, Carlus M. Subclinical leishmaniasis associated with infertility and chronic prostatitis in a dog. Fontbonne A. J Small Anim Pract. 2012; 53(7):419-22.

Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. Trends Parasitol. 2008; 24(8):371-7.

Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andres M, Gonzalez F, Castillo JA, et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1994; 88: 491-3.

Momo C, Rocha NA, Moreira PR, Munari DP, Bomfim SR, Rozza DB, et al. Morphological changes and parasite load of the adrenal from dogs with visceral leishmaniasis. Rev Bras Parasitol Vet. 2014; 23(1): 30-5.

Moreira MAB, Luvizotto MCR, Garcia JF, Corbett CEP, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. Vet Parasitol. 2007; 145(3-4):245-52.

Naucke TJ, Lorentz S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. Parasit Vectors. 2012; 5:67.

Noli C. Canine leishmaniasis. Waltham Focus. 1999; 9:16–24.

Otranto D, Paradies P, Caprariis D, Stanneck D, Testini G, Grimm F, et al. Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. Clin Vaccine Immunol. 2009; 16(3):337-43.

Owens SD, Oakley DA, Marryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. J Am Vet Med Assoc. 2001; 219:1076-83.

Panaro MA, Brandonisio O, Cianciulli A, Cavallo P, Lacasella V, Paradies P, et al. Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. Parasitology. 2009;136(8):823-31.

Pangrazio KK, Costa EA, Amarilla SP, Cino AG, Silva TM, Paixao TA, et al. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. Vet Parasitol. 2009; 165(3-4):327-31.

Pimentel MIF, Alves ELM, Silva MHFF, Moza PG, Almeida PMP, Cunha CS et al. High visceral leishmaniasis mortality rate in Barra Mansa, a new area of visceral leishmaniasis transmission in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014; 47(4):521-23.

Pinto AJW, Figueiredo MM, Silva FL, Martins T, Michalick MSM, Tafuri WL, et al. Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Acta Vet Scand.* 2011; 53 (1):67.

Queiroz NMGP, Silveira RCV, Noronha Jr ACF, Oliveira TMFS, Machado RZ, Starke-Buzetti WA. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. *Vet Parasitol.* 2011; 178(1-2):1-8.

Riera C, Valladares JE. Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. *Parasitol Today.* 1996;12(10): 412.

Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol.* 2014; 6:147-54.

Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol.* 2013; 58:227–50.

Reis A, Martins-Filho O, Teixeira-Carvalho A, Carvalho M, Mayrink W, Franca-Silva J, et al. Parasite density and impaired biochemical/ hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci.* 2006; 81(1):68–75.

Rodríguez HJ, Mozos E, Méndez A, Pérez J, Gómez-Villamandos JC. *Leishmania* infection of canine skin fibroblasts in vivo. *Vet Pathol.* 1996; 33(4):469-73.

Rosati S, Ortoffi M, Profiti M, Mannelli A, Mignone W, Bollo E, et al. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10(6):1153-6.

Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G, Lindsay DS. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J Parasitol.* 2005a; 91(4):970-2.

Rosypal AC, Troy GC, Duncan Jr RB, Zajac AM, Lindsay DS. Utility of diagnostic tests used in diagnosis on infection in dogs experimentally inoculated with a North American isolate of *Leishmania infantum*. *J Vet Intern Med.* 2005b; 19:802–9.

Rosypal AC, Lindsay DS. Non-sand fly transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in experimentally infected BALB/c mice. *J Parasitol.* 2005; 91(5):1113-15.

Rotureau B, Ravel C, Aznar C, Carme B, Dedet JP. First report of *Leishmania infantum* in French Guiana: canine visceral leishmaniasis imported from the Old World. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(3):1120-2.

Sangha S, Singh A. Cytopathology of Canine Mammary Gland Affections. In: Martinez EP, editor. Histopathology – Reviews and Recent Advances. Intech; 2012. p. 97-8.

Saridomichelakis MN, Koutinas AF. Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). Vet Dermatol. 2014; 25(2):61-71.

Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro. Boletim Epidemiológico nº2/2013 – Leishmaniose Visceral – GDTVZ – SES/RJ. 2013:1-8.

Segalés J, Ramos-Vara JA, Duran CO, Porter A, Domingo M. Diagnosing infectious diseases using in situ hybridization. Swine Health Prod. 1999; 7(3):125-8.

Silva FS. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. R Trop Ci Agr Biol. 2007; 1(1):20.

Silva FL, Oliveira RG, Silva TM, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. Vet Parasitol. 2009; 160(1-2):55-9.

Silva FL, Rodrigues AA, Rego IO, Santos RL, Oliveira RG, Silva TM, et al. Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. Vet Parasitol. 2008; 151(1):86-90.

Solcà MS, Bastos LA, Guedes CE, Bordoni M, Borja LS, Larangeira DF, et al. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. PLoS One. 2014; 9(7): e103635.

Souza CC, Barreto TO, da Silva SM, Pinto AWJ, Figueiredo MM, Rocha OGF, et al. A potential link among antioxidant enzymes, histopathology and trace elements in canine visceral leishmaniasis. Int J Exp Path. 2014; 95(1):260-70.

Souza MB, Carvalho RW, Machado RNM, Wermelinger ED. Flebotomíneos de áreas com notificações de casos autóctones de leishmaniose visceral canina e leishmaniose tegumentar americana em Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil. Rev Bras Entomol. 2009; 53(1):147-50.

Stabenfeldt GH, Davidson AP. Controle da ovulação e do corpo lúteo. In: Cunningham JG, editor. Tratado de Fisiologia Veterinária. 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 393-95.

Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol. 2002; 9:951-8.

Symmers WS. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. Lancet. 1960; 1(7116):127-32.

Tolezano JE, Uliana SRB, Taniguchi HH, Araújo MF, Barbosa JA, Barbosa JE, et al. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. Vet Parasitol. 2007; 149:280–4.

Tafuri WL, Santos RL, Arantes RME, Gonçalves R, De Melo NM, Michalick MSM, et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods*. 2004; 292 (1-2): 17–23.

Tafuri WL, De Oliveira MR, Melo MN, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol*. 2001; 96(3):203-12.

Thomé HE, DiSantis GW, Moura VMBD, Amorim RL, Bandarra EP. Avaliação histopatológica testicular e epididimária em cães adultos sem raça definida (SRD) da região de São João da Boa Vista, SP. *Ciênc Anim Bras*. 2007; 8 (4):745-55.

Tonini MA, Lemos EM, Reis AB, Vital WC, Dias ES, Dietze R. First description of autochthonous canine visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Vitória, State of Espírito Santo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012; 45(6):754-6.

Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2009; 164:118-23.

Verçosa BL, Melo MN, Puerto HL, Mendonça IL, Vasconcelos AC. Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs: a histomorphometric analysis. *Vet Parasitol*. 2012; 189(2-4):162-70.

Viñuelas J, García-Alonso M, Ferrando L, Navarrete I, Molano I, Mirón C, et al. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Vet Parasitol*. 2001; 101(1):23-7.

Wanke MM. Canine brucellosis. *Anim Reprod Sci*. 2004; 82– 83:195–207.

Werneck GL. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. *Cad Saúde Pública*. 2008; 24(12):2937-40.

World Health Organization (WHO). Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO expert committee. Technical Report Series 949. Geneva: World Health Organization; 22-6 March 2010, 202 p.

Xavier SC, Andrade HM, Monte SJH, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MSM, et al. Comparison of paraffinembedded 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*. 2006; 2:17.

Zanette MF, Lima VMF, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RFC, et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*,

Neospora caninum and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs.
Rev Soc Bras Med Trop. 2013; 47(1):105-7.