

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DO APARELHO
REPRODUTOR MASCULINO EM CÃES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Andrea Lantieri Correa de Barros

CAMPO GRANDE, MS
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DO APARELHO
REPRODUTOR MASCULINO EM CÃES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Histopathological changes in the reproductive tract of male dogs with visceral leishmaniasis

Andrea Lantieri Correa de Barros

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.
Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE, MS 2013

Aos meus pais, Gerson e Giovanna
e ao meu filho Bernardo. Amo
vocês imensamente.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Carlos Eurico Fernandes, por ter aceitado ser meu orientador, pela paciência e compreensão durante o período do mestrado e pelos ensinamentos que me foi passado.

À toda equipe do laboratório de Patologia Geral do CCBS/UFMS, principalmente as minhas colegas e amigas Adriane Lermen Zart, Débora Carvalho Meldau e Kethleen Mesquita da Silva, pelo auxílio na realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pelo apoio técnico, administrativo e pessoal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico pela bolsa de mestrado.

*“A verdadeira viagem de descobrimento não
consiste em procurar novas paisagens, mas em
ter novos olhos”.*

Marcel Proust

Resumo

BARROS. A.L.C. Alterações histopatológicas do aparelho reprodutor masculino em cães com leishmaniose. 2013. 31 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose causada pelo protozoário intracelular *Leishmania* sp. e o cão é considerado o principal hospedeiro doméstico dessa doença. A transmissão entre os hospedeiros vertebrados é feita durante o repasto sanguíneo do díptero do gênero *Lutzomyia* sp. Contudo, outras formas de transmissão, sem a participação de vetor, já foram relatadas. A presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em diferentes órgãos podem causar diversas alterações que variam com a imunidade do animal e carga parasitária. O objetivo desse estudo foi avaliar as alterações histopatológicas encontradas no aparelho reprodutivo masculino de cães. Amostras de testículo, epidídimo e próstata de 70 animais foram utilizadas. Os cães foram divididos de acordo com a sorologia e sintomatologia clínica em três grupos experimentais: animais sorologicamente positivos assintomáticos; sorologicamente positivos sintomáticos e animais sorologicamente negativos para leishmaniose visceral, considerados como grupo controle. Os resultados observados sugerem que as alterações da próstata ocorrem independentemente dos animais serem sorologicamente positivos ou não e, no testículo e epidídimo as lesões como frequência de infiltrado inflamatório intersticial, degeneração e fibrose foram mais frequentes e intensas em animais positivos quando comparados ao grupo controle. As alterações encontradas são inespecíficas, porém a LV pode intensificar processos inflamatórios pré-existentes no aparelho reprodutor masculino de cães.

Palavras-chave: Testículo; epidídimo; próstata, *Leishmania* sp.; amastigotas.

Abstract

BARROS. A.L.C. Histopathological changes in the male reproductive system of dogs with leishmaniasis. 2013. 31 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

Visceral Leishmaniasis (VL) is a zoonotic disease caused by the intracellular protozoan *Leishmania* sp. and the dog is considered the main domestic host of this disease. The transmission between vertebrate hosts is done during blood feeding by *Lutzomyia* sp., a genus of phlebotomine sand flies. However, other forms of transmission, with no vector, have been reported. Presence of amastigotes of *Leishmania* sp. in different organs may cause several pathologies depending on the animal's immunity and parasite load. The aim of this study was to evaluate histopathological changes found in the male reproductive tract of dogs. Samples of testis, epididymis and prostate of 70 animals, divided according to serology and clinical symptoms, in three experimental groups: animals seropositive asymptomatic, seropositive symptomatic and oligosymptomatic and animals seronegative for visceral leishmaniasis, as a control group. Prostatic changes occurs independently of animals were serologically positive or not, however they are more intense in symptomatic animal. In the testis and epididymis, lesions such as frequency of interstitial infiltrate, degeneration and fibrosis, were more frequent and intense in positive animals compared to the control group. These results demonstrate that dogs infected with *Leishmania* sp. may develop nonspecific changes in the reproductive tract, which are more intense mainly in symptomatic animals.

Keywords: Testis, epididymis, prostate, *Leishmania* sp., amastigotes.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Frequência (%) de infiltrado linfomononuclear e fibrose intersticial em diferentes regiões epididimais de cães sorologicamente positivos assintomáticos, sorologicamente positivos sintomáticos e sorologicamente negativos (controle) para LVC, oriundos do CCZ de Campo Grande, MS.

Lista de quadros

- Quadro 1 - Frequência de alterações histopatológicas encontradas na próstata de animais sorologicamente positivos assintomáticos, sorologicamente positivos sintomáticos e sorologicamente negativos (controle) para LVC, oriundos do CCZ de Campo Grande, MS. 18
- Quadro 2 - Frequência de alterações histopatológicas encontradas no testículo de animais sorologicamente positivos assintomáticos, sorologicamente positivos sintomáticos e sorologicamente negativos (controle) para LVC, oriundos do CCZ de Campo Grande, MS. 18
- Quadro 3 - Efeito interativo para as frequências observadas (%) de casos positivos e negativos de acordo com alterações histológicas prostáticas, exame parasitológico e grupo experimental em cães com Leishmaniose Visceral. 19
- Quadro 4 - Efeito interativo para as frequências observadas (%) de casos positivos e negativos de acordo com alterações histológicas testiculares, exame parasitológico e grupo experimental em cães com Leishmaniose Visceral. 20

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
Ciclo biológico.....	2
Sinais clínicos e resposta imunológica.....	3
Alterações histopatológicas	4
Alterações histopatológicas no aparelho reprodutor masculino.....	6
Referências.....	8
ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DO APARELHO REPRODUTOR MASCULINO DE CÃES COM LEISHMANIOSE	13
Resumo.....	13
Abstract.....	13
Introdução.....	14
Material e métodos.....	14
Animais e grupos experimentais.....	14
Histopatologia.....	14
Análise estatística.....	15
Resultados.....	15
Discussão.....	15
Conclusão.....	16
Referências.....	17
Quadros.....	18
Figura.....	21

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral (LV) é zoonose que causa uma doença grave em pessoas de qualquer idade e imunodeprimidos e, quando não tratada, pode apresentar letalidade de 95% (Alves & Bevilaqua, 2004). É endêmica em 88 países, e aproximadamente 90% dos casos mundialmente notificados ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (Who, 2009). No Brasil, esta distribuída em 21 estados e o número de casos corresponde a 90% do total dos ocorridos nas Américas (Silva, 2007).

Primeiramente exclusiva de ambientes rurais, a expansão urbana desordenada para áreas recém-desflorestadas, com acúmulo de matéria orgânica associada a más condições sanitárias, contribuiu para emergência da doença no meio urbano (Werneck et al., 2007). Considerada uma doença reemergente e negligenciada, muitos estudos são realizados com intuito de se conhecer melhor sobre a epidemiologia, formas de controle e tratamento.

A doença é causada pelo protozoário intracelular *Leishmania* da família Trypanosomatidae, classe Zoomastigofora, e ordem Cinetoplastidae (Tesh, 1995; França-Silva et al., 2003). *Leishmania donovani* e *L. infantum* são exemplos de espécies causadoras da LV na África, Europa e Ásia e *L. chagasi* (atualmente também chamado de *L. infantum*) é o agente etiológico encontrado nas Américas (Silva, 2007). Outras espécies podem causar leishmaniose cutânea ou mucocutânea, porém essas duas formas da doença não são fatais apesar de apresentarem considerável morbidade (Gramiccia, 2011).

O vetor responsável pela transmissão do agente da LV, nas Américas, é um díptero do gênero *Lutzomyia* spp. Esse inseto se prolifera em matéria orgânica em decomposição, o que dificulta bastante seu controle em certas regiões. Está bem adaptado ao ambiente peridomiciliar alimentando-se em uma grande variedade de hospedeiros, como aves, o homem e outros animais silvestres e domésticos (Oliveira et al., 2000). *L. infantum* já foi encontrada em raposas, marsupiais, gato e cavalos, mas, na área urbana, o cão é conhecido como o principal hospedeiro doméstico dessa parasitose (Gramiccia & Gradoni, 2005).

No Brasil, as estratégias de controle da doença estão baseadas no diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos, no controle dos vetores por meio do uso de inseticidas e na detecção dos cães infectados por análises parasitológicas e sorológicas (Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI e ensaio imunoenzimático – ELISA) com posterior eutanásia dos animais positivos (Brasil, 2006). Não se sabe ao certo o verdadeiro papel do cão como transmissor da doença para o homem, e a eutanásia dos cães ainda é um assunto muito polêmico e controverso. Existem dúvidas da eficiência dos testes utilizados na detecção da doença, principalmente, em áreas endêmicas. O período de incubação nos cães pode variar de três meses a vários anos, mas em média fica entre seis e sete meses

(Brasil, 2006) e, a sensibilidade e especificidade dos testes podem variar dependendo dos sinais clínicos desses animais.

Cães positivos, principalmente os assintomáticos, podem apresentar resultado falso-negativo em testes sorológicos e continuar na população e outros negativos, ou com alguma outra doença que apresente reação cruzada com o teste, podem ser eutanasiados.

1.1 CICLO BIOLÓGICO

A transmissão do protozoário é feita por várias espécies de flebotomíneos. Nas Américas, os insetos responsáveis pela transmissão são do gênero *Lutzomyia*, família Psychodidae, sub-classe Phlebotominae, ordem Díptera (Galati et al., 1997), sendo a principal espécie *Lu. Longipalpis*.

A *Leishmania* é um parasita heteroxeno que durante seu ciclo de vida possui apenas dois hospedeiros, um vertebrado (canídeos, roedores e humanos) e outro invertebrado (díptero) (Grimaldi & Tesh, 1993; Vassilios, 2003; Lainson & Rangel, 2005). São organismos pleomórficos apresentando-se de duas formas: promastigotas, que são formas flageladas e móveis, presentes no trato digestivo desse hospedeiro; e amastigotas, forma aflagelar, encontrada dentro de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (Mauel, 1990).

A principal transmissão se faz a partir dos reservatórios animais, enquanto persistir o parasitismo na pele ou no sangue circulante (Lima et al., 2003). O hospedeiro invertebrado, durante o repasto sanguíneo, ingere as formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania sp.* que serão inoculadas em outro hospedeiro vertebrado durante um novo repasto. Após fagocitose por macrófagos, as promastigotas transformam-se na forma amastigota, multiplicando-se intracelularmente até que a célula hospedeira se rompa liberando o parasita, que irá infectar outras células do sistema fagocítico (Chang, 1990; Killick-Kendrick & Killick-Kendrick, 1999; Bueno et al., 2005). Dependendo da resposta do hospedeiro, as formas amastigotas podem se disseminar, através dos macrófagos, para outros órgãos como baço, medula óssea, fígado, causando infecção crônica (Silva, 2007).

Contudo, existem relatos que descrevem a presença de um vetor alternativo, transmissão direta ou transmissão vertical como possíveis rotas de infecção. Casos caninos autóctones de LV foram descritos nos Estados Unidos (Gaskin et al., 2002) e no Reino Unido (Harris, 1994), onde o vetor biológico adequado não foi reconhecido. Um caso de transmissão venérea entre um homem e uma mulher em uma área livre da doença e na ausência do vetor foi bem documentado (Symmers, 1960). Transmissão direta por meio de transfusão sanguínea já foi documentada em um cão (Owens et al. 2001). Casos de transmissão vertical em cães foram relatados por Masucci et al. (2003), Dubey et al. (2005) e Rosypal et al. (2005). Em 2009, Silva et al. comprovaram que a *Leishmania infantum* pode

ser sexualmente transmissível de cães machos naturalmente infectados para fêmeas susceptíveis, na ausência do vetor biológico.

1.2 SINAIS CLÍNICOS E RESPOSTA IMUNOLÓGICA

De acordo com os sinais clínicos, Mancianti et al. (1988) classificou os cães infectados em: assintomáticos, ou seja, aparentemente saudáveis; oligossintomáticos, de um a três sinais clínicos, como úlceras cutâneas localizadas principalmente em orelha e região periorbital, moderada perda de peso e alopecia localizada; e sintomáticos, aqueles que apresentam mais de três sinais clínicos, geralmente úlceras cutâneas, alopecia e dermatite generalizada, ceratoconjuntivite, anorexia, onicogribose, podendo levar a morte do animal. As diferentes manifestações clínicas da doença são determinadas pela espécie do agente envolvido bem como da condição imune do hospedeiro (Chang, 1990).

Normalmente os sinais clínicos são variáveis e inespecíficos e a imunossupressão, causada pela doença, favorece as infecções oportunistas dificultando ainda mais a caracterização dos sintomas. A partir da infecção cutânea localizada, o parasita é fagocitado por macrófagos, que se disseminam pela via linfática ou vasos sanguíneos, e migram para medula óssea, linfonodos, fígado e baço, assim como nos rins e trato gastrointestinal (Tryphomas et al. 1977, Keenan et al. 1984). Inicialmente, observa-se hipertrofia de linfonodo, dermatite periorbital e nasal que, posteriormente se alastram para todo o corpo do animal, com alopecia, onicogribose e edema de membros. Outros sinais como febre, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, emagrecimento progressivo, hepatomegalia e esplenomegalia, hiperqueratose, ulcerações cutâneas, particularmente no focinho, orelha, são frequentes, apesar de não estarem presentes em todos os animais (Genaro et al. 1988; Dias et al. 1999).

Segundo Reis et al. (2006), animais sintomáticos apresentam maior parasitismo, principalmente na pele, baço e medula óssea, quando comparados com animais assintomáticos e estudos demonstram que cães assintomáticos com leishmaniose visceral desenvolvem um perfil de resposta imunológica TH1, enquanto que cães oligossintomáticos e sintomáticos um perfil principalmente TH2 (Lage et al., 2007).

Na resposta imune protetora (TH1), existe uma forte resposta proliferativa das células mononucleares que realizam a fagocitose e destruição das formas amastigotas pela ativação de macrófagos (Reis et al., 2009). A produção de interferon-gama ($\text{INF-}\gamma$) estimula a proliferação de linfócitos T CD4+ e T CD8+, que são células apresentadoras de antígenos e produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-2 e fator de necrose tumoral ($\text{TNF-}\alpha$). Estudos sugerem que a via do óxido nítrico (ON), ativada pela resposta TH1, inicia a rota do controle da doença em cães (Melby et al.,

1998; Bogdan et al., 2000). A infecção de macrófagos caninos por *Leishmania* ativados por INF- γ *in vitro* expressam ON (Sisto et al., 2001). Cães com macrófagos infectados, incubados com linfócitos autólogos de cães imunizados ativam a INF- γ com aumento na produção de ON e apoptose de células parasitadas (Holzmuller et al., 2005; Holzmuller et al., 2006).

Nos cães sintomáticos, há depressão das funções mediadas pelas células T e altos níveis de anticorpos específicos (Pinelli et al., 1995). Na resposta TH2, ocorre diminuição das células T CD4+ e assim ativação de macrófagos. As principais citocinas produzidas são anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10, relacionadas com a produção de anticorpos. Contudo, anticorpos são eficientes na proteção contra antígenos circulantes, mas não contra patógenos intracelulares como a *Leishmania* sp. Esse quadro imunológico favorece o aparecimento de lesões em diversos órgãos, afetando outros sistemas importantes do organismo e causando grande variedade de sinais clínicos.

Lage et al. (2007) avaliaram a expressão de citocinas nos esplenócitos de cães naturalmente infectados por *L. infantum* e não detectaram diferenças nos níveis de TNF- α , IL-12, IL-4, IFN- γ e IL-10 quando os cães foram classificados pelas diferentes formas clínicas. Entretanto, quando os cães foram categorizados pelos níveis de carga parasitária, os autores observaram que 100% dos cães com alto parasitismo expressam IL-10 quando comparados com aqueles com baixo e médio parasitismo. Esses dados sugerem que a LVC é marcada por um equilíbrio na produção de citocinas TH1/TH2, com predomínio do acúmulo de IL-10, provavelmente como consequência do acréscimo na carga parasitária com a progressão da doença. Estes resultados podem demonstrar a possibilidade da ligação entre a intensidade do parasitismo no baço com a evolução das manifestações clínicas da LVC.

1.3 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS

Na Leishmaniose Visceral, devido à ativação do sistema imune, as lesões em órgãos não linfoides acontecem não somente pela deposição de imuno-complexo, como também pela participação de macrófagos, células T, citocinas e imunoglobulinas, por mecanismos ainda não muito claros (Rigo et al., 2013). Normalmente a principal alteração relatada é a presença de infiltrado mononuclear nos tecidos sendo que a diferença da intensidade varia de acordo com a resposta imune do hospedeiro.

As formas amastigotas, e assim as alterações histológicas como hipertrofia e hiperplasia, são encontradas principalmente em órgãos do sistema linfóide (linfonodos, baço, medula óssea e fígado) independente dos sintomas clínicos nos animais. A presença do protozoário em outros órgãos varia com a sintomatologia clínica da doença. Lima et al. (2010) encontraram diferença significativa no parasitismo de vísceras entre animais sintomáticos e assintomáticos enquanto na pele e no linfonodo

essa diferença não ocorreu. O parasitismo das vísceras de animais sintomáticos chega a ser quatro vezes maior que de animais assintomáticos (Sanchez et al., 2004).

Nos linfonodos de animais sintomáticos e assintomáticos é possível encontrar profundas mudanças estruturais com alteração nos componentes da matriz extracelular, depleção linfocitária, principalmente na região cortical, com substituição dos linfócitos por macrófagos repletos de formas amastigotas e hiperplasia folicular na área medular com aumento das células plasmáticas (Kennan et al., 1984; Xavier et al., 2006; Kondo et al., 2009).

Alterações como: presença de pequenos granulomas intralobulares compostos por macrófagos intensamente parasitados, plasmócitos e raros linfócitos no fígado; depressão da polpa branca e substituição do folículo linfóide por macrófagos parasitados por *Leishmania* sp. ; e reação inflamatória crônica e difusa com exsudato celular composto por macrófagos, plasmócitos e linfócitos na pele, foi observada em animais assintomáticos (Xavier et al, 2006). As alterações encontradas em baço e linfonodos são sugestivas de supressão da imunidade mediada por células e imunidade humoral ativa (Kennan et al., 1984).

De acordo com Brito et al. (2010), lesões oculares, tanto em cães quanto em humanos com LV, são comuns. Na avaliação de estruturas oculares de cães, observou-se que somente nervo óptico, retina e coróide não foi encontrado *Leshmania* sp. , através de técnica de imunohistoquímica, enquanto na conjuntiva da terceira pálpebra foi encontrado alto parasitismo. Presença de infiltrado inflamatório composto por linfócitos, macrófagos, células plasmáticas e perivasculite difusa, foram alterações encontradas nas estruturas oculares avaliadas.

Pinto et al. (2011) relatam leves alterações no aparelho digestório de animais positivos sintomáticos e assintomáticos, sugerindo alguma vantagem do parasita na resposta imunoregulatória intestinal. Exudato celular crônico, composto predominantemente por macrófagos, células plasmáticas e linfócitos com raros neutrófilos ou eosinófilos, foi observado na lamina própria e nas camadas muscular, mucosa e submucosa do trato gastrointestinal. Ainda, macrófagos contendo muitas amastigostas foram facilmente encontrados na lamina própria da mucosa e submucosa, na maioria dos casos, principalmente em ceco e cólon.

Os rins são frequentemente afetados pela LV. Rigo et al. (2013) relatam alterações inflamatórias presentes em 25,3% dos túbulos, em 67,0% do interstício e em 52,0% dos glomérulos dos rins de cães positivos. As glomerulonefrites mais frequentes foram as do tipo membranosas e membranoproliferativas, sem diferença significativa entre animais sintomáticos e oligosintomáticos.

Alteração pulmonar em animais infectados naturalmente foi caracterizada por pneumonite intersticial, com três tipos de acometimento de acordo com a presença de tipos celulares, parecendo um processo evolutivo sequencial: celular, fibrótico celular e fibrótico (Duarte et al., 1986). Sabe-se, que o processo de reparação tecidual após uma injúria pode ser a regeneração do tecido ou a

cicatrização. Assim, a LV pode causar uma inflamação crônica do parênquima pulmonar levando a fibrose desse tecido.

1.4 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E RESPOSTA IMUNE NO APARELHO REPRODUTOR MASCULINO

O aparelho reprodutivo de cães sorologicamente positivos para LV pode ser um reservatório para formas amastigotas de *Leishmania* sp (Benites et al., 2011). Mas, poucos trabalhos relatam as alterações encontradas no aparelho reprodutivo masculino de cães com LV. Ainda, os mecanismos e a relação entre as alterações e a presença das formas amastigotas no aparelho reprodutivo não são claros.

No aparelho reprodutivo de cães machos, a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. é relatada principalmente no prepúcio, epidídimo e glande, com maior frequência em animais sintomáticos, existindo uma correlação entre o número de amastigotas e o score de inflamação nesses locais (Diniz et al., 2005). Ainda, no prepúcio pode ser encontrada em cães positivos, dermatite granulomatosa com grande número de histiócitos difusamente distribuídos por toda mucosa, com áreas de erosão e ulceração com intensa infiltração de neutrófilos (Diniz et al., 2005).

Na próstata, a presença de infiltrado linfoplasmocítico em animais sorologicamente negativos e positivos, sintomáticos ou não, sem diferença estatística entre os diferentes grupos sugere que a prostatite em cães não está relacionada com a LV (Diniz et al., 2005).

No testículo, lesões macroscópicas relacionadas à doença não são relatadas, ao contrário de alterações microscópicas evidenciadas pela histologia (Amara et al., 2009). Estudo realizado por Diniz et al. (2005) demonstra orquite intersticial linfoplasmocítica multifocal ou difusa associada à degeneração testicular, de grau leve a severo, e epididimite histiolinfocítica em animais sorologicamente positivos, com reação inflamatória mais forte em animais sintomáticos. Contudo, não houve correlação entre o score de inflamação e o número de amastigotas nesses órgãos, apesar da frequência dessas formas evidenciadas pela imunohistoquímica serem diferentes estatisticamente entre animais positivos sintomáticos e assintomáticos (Diniz et al., 2005). Um caso de orquite em um cão associada à leishmaniose desencadeada pela presença de formas amastigotas no testículo foi descrito sendo que o infiltrado inflamatório era composto de neutrófilos, linfócitos, células plasmáticas, macrófagos contendo formas amastigotas e alterações degenerativas. Porém, após tratamento da LV, ocorreu diminuição da carga parasitária e, na avaliação citológica, ausência de células inflamatórias no testículo (Manna et al., 2012). Em cães sintomáticos existe probabilidade de aproximadamente 69% da ocorrência de formas infectantes no testículo. Este fato demonstra a

importância da manutenção de formas infectantes nos testículos e a disseminação dessas formas para os segmentos extragonadais (Benites et al., 2011).

Sabe-se que andrógenos e outros esteróides, assim como proteínas e neuropeptídeos produzidos pelo testículo podem modificar a função das células imunes no testículo e nos linfonodos que drenam a região. Ainda, o testículo apresenta peculiaridades como a barreira hemato testicular, falta de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) pelas células espermatogênicas, macrófagos intersticiais com função antiinflamatória e imunossupressores e locais de produção de citocinas imunoreguladoras e supressoras (células de Leydig e Sertoli), que podem favorecer a permanência das formas amastigotas nesse órgão (Hedger & Haler, 2006).

No epidídimo, a transmigração leucocitária, principalmente de macrófagos é maior e mais ativa. Macrófagos expressam MHC II no interstício e no epitélio epididimal linfócitos CD8⁺ são predominantes (Hedger & Haler, 2006). Embora a função exata dessas células não seja totalmente conhecida, sua presença está relacionada à fagocitose seletiva nos diferentes segmentos epididimais (Serre & Robaire, 2002). Dessa maneira, é possível que macrófagos parasitados migrem para o epidídimo, exacerbando a resposta inflamatória nesse órgão (Benites et al., 2011). Percebe-se que a resposta imune do epidídimo é claramente diferente da que ocorre no testículo.

A partir da análise do perfil leucocitário do aparelho reprodutor masculino em cães, sugere-se que existem no mínimo, respostas diferenciadas em ambiente diferente frente às formas amastigotas caracterizados pelo maior número de neutrófilos, macrófagos e linfócitos (Benites et al., 2011).

Assim, considerando a importância do cão na epidemiologia da LV, o objetivo do artigo apresentado a seguir é caracterizar as alterações histopatológicas encontradas na próstata, testículo e epidídimo (cabeça, corpo e cauda) de cães soropositivos com e sem sintomatologia clínica para LV.

REFERÊNCIAS

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, A. P. D. Reflexões sobre a qualidade o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Caderno de Saúde Pública do Rio de Janeiro*, v. 20, n.1, p. 259-265, 2004.

AMARA A.; MRAD, I.; MELKI, M.K.; MRAD, M.B.; REJEB, A. Etude histologique des lésions testiculaires les chiens leishmaniens. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v. 160, n. 1, p. 54-60, 2009.

BENITES, A.P.; FERNANDES, C.E.; BRUM, K.B.; MARIA AUXILIADORA, G.S.; ABDO, M.A.G.S. Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.31, n. 1, p. 72-77, 2011.

BRASIL. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância epidemiológica.* – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120p.

BRITO, F.L.C.; LAUS, J.L.; TAFURI, W.L.; FIGUEIREDO, M.M.; JUNIOR, V.A.S.; MAIA, F.C.L.; ALVES, L.C. Histopathological findings and detection of parasites in the eyes of dogs infected naturally with *Leishmania chagasi*. *Ciência Rural, Santa Maria*, v.40, n.5, p.1141-1147, 2010.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current Opinion in Immunology*.v. 12, p. 64-72, 2000.

BUENO, R.; MELLO, M.N.; MENEZES, C.A.S.; DUTRA, W.O.; SANTOS, R.L. Phenotypic, functional, and quantitative characterization of canine peripheral blood monocytederived macrophages. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.v. 100, p. 521-524, 2005.

CHANG, K.P. *Modern biology: cell biology of Leishmania*. 2nd edition. New York: Farman. 1990.

DIAS, D.V.; da COSTA, C.A.; TOLEDO, V.P.C.P.; BAMBIRRA, E.; GENARO, O.; MICHALICK, M.S.M.; COSTA, R.T.; MAYRINK, W.; ORÉFICE, F. Leishmaniose visceral canina – Estudo parasitológico e histológico em olhos de cães – Parte I. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, v.58, n. 5, p. 331–337,1999.

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

DUARTE, M.I.S.; LAURENT, M D.; BRANDÃO NINES, V.L.; REGO JR, A. F.; OSHIRO, E.T.; CORBETT, C.E.P. Interstitial pneumonitis in canine visceral leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 28, n.6, p. 431-436, 1986.

DUBEY, J.P.; ROSYPAL, A.C.; PIERCE, V.; SCHEINBERG, S.N.; LINDSAY, D.S. Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.227, p.1266–1269, 2005.

FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A.M.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E.P.; COSTA, J.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State. Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 111, p. 161-173, 2003.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, v. 181, n.1, p.23-30, 2011.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, v. 35, n. 11-12, p. 1169–1180, 2005.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; REGO JR, F. A.; OSHIRO, E. T.; CHANG, M. R. Estudo de flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 31, n. 4, p. 378-390, 1997.

GASKIN, A.A.; SCHANTZ, P.; JACKSON, J.; BIRKENHEUER, A.; TOMLINSON, L.; GRAMICCIA, M.; LEVY, M.; STEURER, F.; KOLLMAR, E.; HEGARTY, B.C.; AHN, A.; BREITSCHWERDT E.B. Visceral leishmaniasis in a New York foxhoundkennel. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.16 p. 34–44, 2002.

GENARO, O.; MAYRINK, W.; MICHALICK, M.S.M.; DIAS, M.; DA COSTA, C.A.; MELO, M.N. Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinica aspects. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.*, v.83, p. 43, 1988.

GRIMALDI, JR.G.; TESH R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for the future research. *Clinical Microbiology Reviews*. v.6, p. 230-250, 1993.

HEDGER, M. P.; HALER, D. B. Immunophysiology of the male reproductive tract. IN: Knobil & Neill's, *Physiology of Reproduction*, 3^a Edition, p.1195 – 1285, 2006.

HARRIS, M.P. Suspected transmission of leishmaniasis. *Veterinary Records.*, v. 135, p. 339, 1994.

HOLZMULLER, P.; BRAS-GONÇALVES, R.; LEMESTRE, J.L. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. *Parasitology*. v. 132, p. 19-32, 2006.

HOLZMULLER, P.; CAVALEYRA, M., MOREAUX, J.; KOVACIC, R.; VINCENDEAU, P.; PAPIEROK, G.; LEMESRE, J.L. Lymphocytes of dogs immunized with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. *Veterinary Immunology Immunopathology*, v. 106, p. 247-257, 2005.

KEENAN, C.M.; HENDRICKS, L.D.; LIGHTNER, L.; WEBSTER, H.K.; JOHNSON, A.J. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Veterinary Pathology*, v. 21, p. 74–79, 1984.

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M. Biology of sandfly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. In: Killick-Kendrick, R., ed. *Canine Leishmaniasis: An update*. Romainville cedex. France: Hoechst Roussel Vet, p. 26-31, 1999.

KONDO, K.R.J.; FONSECA, C.C.; MATTA, S.L.P.; VITORIA, M.I. V. Análise histomorfométrica da matriz extracelular do linfonodo poplíteo de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, n.8, p. 610-616, 2009.

LAGE, R.S.; OLIVEIRA, G.C.; BUSEK, S.U.; GUERRA, L.L.; GIUNCHETTI, R.C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; REIS A. B. Analysis of cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Veterinary Immunology Immunopathology*, v. 115, p. 135-145, 2007.

- LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.v. 100, p. 811-827, 2005.
- LIMA, L.V.R.; CARNEIRO, L.A.; CAMPOS, M.B.; CHAGAS, E.J.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.P.; LAINSON, R. & SILVEIRA, F.T. - Canine visceral leishmaniasis due to *Leishmania (L.) infantum chagasi* in Amazonian Brazil: comparison of the parasite density from the skin, lymph node and visceral tissues between symptomatic and asymptomatic, seropositive dogs. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 52, n.5, p. 259-65, 2010.
- LIMA, V.M.F.; GONÇALVES, M.E.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; FEITOSA, M.M. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*., v. 36, n.4, p. 485-489, 2003.
- MANNA, L.; PACIELLO, O.; MORTE, R.D.; GRAVINO, A.E. Detection of *Leishmania* parasites in the testis of a dog affected by orchitis: case report. *Parasites & Vectors*, v.5, p. 216, 2012.
- MANCIANTI, F.; GRAMICCIA M.; GRADONI L.; PIERI S. Studies on canine control. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, p. 566-567, 1988.
- MASUCCI, M.; DE MAJO, M.; CONTARINO, R.B.; BORRUTO, G.; VITALE, F.; PENNISI, M.G. Canine leishmaniasis in the newborn puppy. *Veterinary Research Communications*, v.27, p. 771–774, 2003.
- MAUEL, J. Macrophage-parasite interactions in *Leishmania* infections. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 47, p. 187-193, 1990.
- MELBY, P. C.; YANG, Y.Z.; CHENG, J.; ZHAO, W. Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. *Infection and Immunity*, v.66, p. 18-27, 1998.
- OWENS, S.D.; OAKLEY, D.A.; MARRYOTT, K.; HATCHETT, W.; WALTON, R.; NOLAN T.J.; NEWTON A.; STEURER F.; SCHANTZ P.; GIGER U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*,v.219, p. 1076–1083, 2001.
- OLIVEIRA, A. G.; FALCÃO, A. L.; BRAZILB, R. P. Primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) na área urbana de Campo Grande, MS, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.34, n. 6, p. 654-655, 2000.
- PINELLI, E.; GONZALO, R.M.; BOGO, C.J.; RUTTEN, V.P.; GEBHARD, D.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, E.J. *Leishmania infantum* -specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *European Journal of Immunology*, v. 25, p. 1594-1600, 1995.
- PINTO, A.J.W.; FIGUEIREDO, M.M.;MICHALICK, M.S.M.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W. L. Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.53, n.67, 2011.

- REIS, A. B; MARTIN- FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GRINCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; CORREA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.128, p.87-95, 2009.
- REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK W.; FRANÇA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.* 81:68-75, 2006.
- RIGO, R.S.; CARVALHO, C.M.E.; HONER, M.R.; ANDREADE, G.B. de; SILVA, I. S.; RIGO, L.; FIGUEIREDO, H.R.; BARRETO, W.T.G. Renal histopathological findings in dogs with visceral leishmaniasis. *Revista do Insituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 55, n. 2, p. 113-116, 2013.
- ROSYPAL, A.C.; TROY, G.C.; ZAJAC, A.M.; FRANK, G.; LINDSAY, D.S. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in a experimentally infected beagle. *Journal Parasitology*, v.91, p. 970–972, 2005.
- SANCHEZ, M.A.; DIAZ, N.L.; ZERPA, O.; NEGRON, E.; CONVIT, J.; TAPIA, F.J. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*, v.70, p.618-624, 2004.
- SERRE, V.; ROBAIRE, B. Interations of the immune system and the epididymis. In.:ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. *The Epididymis from Molecules to Clinical Practice*, Kluwer Academic, New York, USA, p.219-231, 2002.
- SILVA, F.L.; OLIVEIRA, R.G.; SILVA, T.M.A.; XAVIER, M.N.; NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v.160, p.55-59, 2009.
- SILVA, F.S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Revista Tropica – Ciencias Agrarias e Biologicas*, v.1, n.1, p.20, 2007.
- SISTO, M.; BRANDONISIO, O.; PANARO, M.A.; ACQUAFREDDA, A.; LEOGRANDE, D.; FASANELLA, A.; TROTTA, T.; FUMAROLA, L.; MITOLO, V. Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v.24, p.247-254, 2001.
- SYMMERS, W.S.C. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. *The Lancet*, v.16, p.127–132, 1960.
- TESH, R.B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.52, p.287-92, 1995.
- TRYPHOMAS, L.; ZAWDZKA, Z.; BERNARD, M.A.; JANZEN, E.A. Visceral leishmaniasis in a dog: clinical hematological and pathological observations. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v.41, p.1–12, 1977.
- VASSILIOS, J.K. Old World canine leishmaniasis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v.15, p.941-949, 2003.

WERNECK, G. L.; PEREIRA, T. J. C. F.; FARIAS, G. C.; SILVA, F. O.; CHAVES, F. C.; GOUVEA, M. V.; COSTA, C. H. N.; CARVALHO, F. A. A. Avaliação da efetividade das estratégias de controle da leishmaniose visceral na cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil: resultados do inquérito inicial – 2004. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v.17, n.2, p.87-96, 2007.

WHO – World Health Organization – Leishmaniasis - Geographical distribution. 2009. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/magnitude>.

XAVIER, S.C.; CHIARELLI, I.M.; LIMA, W.G.; GONÇALVES, R.; TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.6, p.994-1000, 2006.

Trabalho.....

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DO APARELHO REPRODUTOR MASCULINO DE CÃES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Andrea L. C. de Barros^{1*}, Carlos E.S. Fernandes², Ariane P. Benites³

ABSTRACT.- Barros A.L.C; Fernandes C.E.S. & Benites, A. 2012. [**Histopathological changes in the reproductive tract of male dogs with leishmaniasis**] Alterações histopatológicas do aparelho reprodutor masculino de cães com leishmaniose. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Av. Felinto Muller, 2443, Campo Grande, MS 79070-900, Brazil. E-mail: andrealcb@hotmail.com

Visceral Leishmaniasis (VL) is a zoonotic disease caused by the intracellular protozoan *Leishmania infantum* and the dog is considered the main domestic host of this disease. The transmission between vertebrate hosts is done during blood feeding by *Lutzomyia* sp., a genus of phlebotomine sand flies. However, other forms of transmission, with no vector, have been reported. Presence of amastigotes of *Leishmania* sp. in different organs may cause several pathologies depending on the animal's immunity and parasite load. The aim of this study was to evaluate histopathological changes found in the male reproductive tract of dogs. Samples of testis, epididymis and prostate of 70 animals, divided according to serology and clinical symptoms, in three experimental groups: animals seropositive asymptomatic, seropositive symptomatic and oligosymptomatic and animals seronegative for visceral leishmaniasis, as a control group. Prostatic changes occurs independently of animals were serologically positive or not, however they are more intense in symptomatic animal. In the testis and epididymis, lesions such as frequency of interstitial infiltrate, degeneration and fibrosis, were more frequent and intense in positive animals compared to the control group. These results demonstrate that dogs infected with *Leishmania* sp. may develop nonspecific changes in the reproductive tract, which are more intense mainly in symptomatic animals.

INDEX TERMS: Testis, epididymis, prostate, *Leishmania* sp., amastigotes.

RESUMO.-A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e o cão é considerado o principal hospedeiro doméstico dessa doença. A transmissão entre os hospedeiros vertebrados é feita durante o repasto sanguíneo do díptero do gênero *Lutzomyia* sp. Contudo, outras formas de transmissão, sem presença de vetor já foram relatadas. A presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em diferentes órgãos pode causar diversas alterações que variam com a imunidade do animal e carga parasitária. O objetivo desse estudo foi avaliar as alterações histopatológicas encontradas no aparelho reprodutivo masculino de cães infectados pela *Leishmania* sp. Foram utilizadas amostras de testículo, epidídimo e próstata de 70 animais, divididos, de acordo com a sorologia e sintomatologia clínica, em três grupos experimentais: animais sorologicamente positivos assintomáticos; sorologicamente positivos sintomáticos e animais sorologicamente negativos para leishmaniose visceral, considerados como grupo controle. Os resultados sugerem que as alterações da próstata ocorrem independentemente dos animais serem sorologicamente positivos ou não e, no testículo e epidídimo o infiltrado inflamatório intersticial, degeneração e fibrose foram mais prevalentes e intensas nos animais positivos, quando comparados ao grupo controle. Não houve relação entre a presença de amastigotas e lesões histológicas nos diferentes segmentos do aparelho reprodutivo. As alterações histopatológicas encontradas no aparelho reprodutivo foram inespecíficas, estando associadas à presença ou não de sinais clínicos sistêmicos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Testículo, epidídimo, próstata, *Leishmania* sp., amastigotas.

Recebido em

Aceito para publicação em

¹Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Felinto Muller, 2443, Campo Grande, MS 79070-900, Brasil. *Autor para correspondência: andrealcb@hotmail.com

²Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, MS 79070-900, Brasil. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Av. Costa e Silva, s/n, Campo Grande.

³Médica Veterinária, Av. Tiradentes, 485. Bl. 03, Apto 202, Campo Grande, MS 79090-000.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV), humana e canina, é a doença emergente mais importante, e com maior prevalência nos países da América Latina (Reis et al. 2009). Primeiramente exclusiva de ambientes rurais, a expansão urbana desordenada para áreas desflorestadas, com acúmulo de matéria orgânica associada a más condições sanitárias, contribuiu para aumento da incidência da doença no meio urbano (Werneck et al. 2007).

O cão é conhecido por ser o principal hospedeiro doméstico do protozoário *Leishmania sp.* (Gramiccia & Gradoni 2005) e, nas Américas, incluindo o Brasil, o parasito envolvido é a *Leishmania infantum* (Deane & Deane 1962). O vetor responsável pela transmissão da LV é um díptero do gênero *Lutzomyia spp.* A principal espécie é a *Lu. longipalpis*. Usualmente, a infecção acontece de um hospedeiro invertebrado para um hospedeiro vertebrado, mas existem relatos de transmissão direta através de transfusão sanguínea em cães (Owens et al. 2001) e Silva et al. (2009) comprovaram que a *L. infantum* pode ser sexualmente transmissível de cães machos naturalmente infectados para fêmeas susceptíveis na ausência do vetor biológico.

Estudos demonstraram que o aparelho reprodutivo de cães sorologicamente positivos para LV pode ser um reservatório para formas infectantes de *Leishmania sp.* (Diniz et al. 2005, Benites et al. 2011). Epididimite associada com LVC pode resultar em achados de formas amastigotas no sêmen, favorecendo a transmissão venérea, assim como descrito em humanos (Symmers 1960, Cabello & Caraballo & Millán 2002). A cobertura natural em cães muitas vezes resulta em traumas tanto no macho como na fêmea, aumentando a chance de transferência de amastigotas da parte externa da genitália e do sistema reprodutor interno do cão. Estes aspectos aumentam ainda mais a possibilidade da transmissão venérea (Diniz et al. 2005).

Embora os aspectos ligados à patogenia, imunopatologia, manifestação clínica e patológica da LVC estejam relativamente compreendidos, a presença de formas amastigotas no aparelho reprodutivo e as lesões específicas associadas, ainda não foram totalmente esclarecidas. Assim, considerando a importância epidemiológica do cão, o objetivo desse trabalho foi caracterizar as alterações histopatológicas encontradas na próstata, testículo e epidídimo de cães soropositivos com e sem sintomatologia clínica para LVC e a relação dessas com a presença de formas amastigotas nos órgãos avaliados.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e grupos experimentais

Foram utilizadas amostras de 70 cães, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), do município de Campo Grande, MS. Os animais foram selecionados de acordo com a sorologia (teste de ELISA – ensaio imunoenzimático e RIFI – imunofluorescência indireta) e sintomatologia clínica em três grupos experimentais: Grupo 0 (n=25), sorologicamente positivos sem manifestação clínica (assintomáticos); Grupo 1 (n=25), sorologicamente positivos e com manifestação clínica (sintomáticos e oligossintomáticos), independente do aparelho reprodutivo e Grupo 2 (n=20), animais sorologicamente negativos para LVC, considerados como grupo controle. Em seguida os cães foram submetidos à eutanásia realizada pela administração endovenosa do anestésico tiopental e, posteriormente de cloreto de potássio (conforme parecer da CEUA/UFMS, protocolo nº 203/2009). Considerando a procedência dos animais utilizados, não se obteve informações sobre idade ou doenças anteriores. A raça dos animais não foi considerada.

Exame parasitológico e histopatologia

Após a eutanásia, foram retiradas a glândula prostática e o conjunto testículo/epidídimo do lado direito de cada cão. Em seguida, os órgãos foram seccionados longitudinalmente. Um fragmento, obtido ao acaso, foi usado para preparar um *imprint* corado com corante citológico rápido para realização do exame parasitológico (Benites et al. 2011). Em seguida, esse mesmo fragmento, quando da próstata e testículo, foi fixado em solução de Bouin por 24h e posteriormente embebido em álcool 70% (Russel et al. 1990). Fragmentos das regiões epididimais foram fixados em solução de formol-salina 10% tamponada. As amostras foram desidratadas e emblocadas em parafina, cortadas com espessura máxima de 4,0 µm e coradas com hematoxilina-eosina (Tolosa et al. 2003).

Para análise histopatológica da glândula prostática, considerou-se a presença ou ausência de atrofia do parênquima glandular, fibrose e infiltrado inflamatório no espaço intersticial. No testículo, foram consideradas a presença ou ausência de degeneração testicular e hipoplasia dos túbulos seminíferos, edema, infiltrado inflamatório e fibrose intersticial. No epidídimo, a ausência ou presença de infiltrado inflamatório assim como a fibrose intertubular foi determinada por região (cabeça, corpo e cauda). Em todas as análises, a intensidade dos infiltrados inflamatórios e a presença da fibrose, foram classificadas em discretas, moderadas ou severas (Slauson & Cooper, 2002).

Análise estatística

Foram adotados dois conjuntos de procedimentos estatísticos para análise dos dados. No primeiro, verificou-se o efeito do grupo experimental sobre os diferentes achados histopatológicos na próstata, testículo, cabeça, corpo e cauda do epidídimo. Utilizou-se o teste do Qui-quadrado de Pearson, para tabelas de contingência, corrigido para o teste de Phi & Cramer's V e teste Exato de Fisher, para tabelas 2 x2. Para os resultantes das análises de intensidade (infiltrado e fibrose) adotou-se o teste de Kruskal Wallis. No segundo procedimento, adicionaram-se os resultados obtidos para o exame parasitológico (presença ou ausência de amastigotas) aos grupos experimentais previamente adotados, para análise dos efeitos interativos entre essas duas variáveis preditivas. Para isso, utilizou-se a análise de dados categóricos Loglinear, modelo não hierárquico (*backward*) saturado. As análises foram realizadas no pacote estatístico SPSS 17.0.

RESULTADOS

No primeiro conjunto, as análises dos achados histopatológicos nas diferentes porções do aparelho reprodutor revelaram que houve diferenças na frequência e, principalmente, na intensidade das alterações entre os grupos experimentais. Em todas as regiões, o infiltrado encontrado foi predominantemente linfomononuclear. Não foram encontradas formações granulomatosas. Apenas duas amostras do tecido prostático apresentaram infiltrado agudo em associação à necrose liquefativa, no grupo sintomático. Testículos e epidídimos não apresentaram infiltrado neutrofílico.

A frequência das alterações encontradas na próstata e testículo estão representados nos Quadros 1 e 2, respectivamente. Houve diferença ($p < 0,05$) entre os grupos assintomático e sintomático para presença de atrofia, intensidade de fibrose e infiltrado. O grupo controle diferiu do sintomático para intensidade de fibrose e de infiltrado. No testículo, não houve diferença para as alterações de degeneração, hipoplasia, presença e intensidade de infiltrado inflamatório entre os grupos sintomáticos e assintomáticos. No grupo controle, embora presentes, foram inferiores em relação aos demais. A presença de fibrose foi observada apenas nos animais sintomáticos. Não houve diferença entre os grupos para a presença de edema.

As frequências de infiltrado linfomononuclear e fibrose encontradas nas três regiões do epidídimo estão apresentados nas Figuras 1. Quanto à presença do infiltrado, não houve diferença entre os grupos controle e assintomático para as classificações ausente, discreto, moderado e intenso, em nenhuma das regiões do epidídimo. No geral, os animais sintomáticos apresentaram frequências inferiores de classificação ausente e frequências superiores das classificações discreta, moderada e intensa, quando comparados aos assintomáticos e controle.

Os resultados do segundo conjunto estão representados nos Quadros 3 e 4. Não houve interação significativa nas diferentes regiões epidimais (grupo experimental X parasitológico X lesão) e para a intensidade do infiltrado inflamatório, tanto prostático quanto testicular. Na glândula prostática, os demais achados histopatológicos também não revelaram interação significativa (Quadro 3). Ao contrário, no testículo (Quadro 4), as interações significativas de segunda ordem resultaram para degeneração testicular (parasitológico X grupo experimental), infiltrado linfomononuclear (infiltrado X grupo experimental; parasitológico X grupo experimental) e fibrose (parasitológico X grupo experimental; fibrose X grupo experimental).

DISCUSSÃO

Poucos trabalhos relatam as alterações encontradas no aparelho reprodutivo masculino de cães com LV. Ainda, os mecanismos e a relação entre as alterações e a presença das formas amastigotas no aparelho reprodutivo não são claros.

Estudos revelam que 84,6% a 100% das próstatas de cães apresentam algum tipo de alteração sendo as mais frequentes prostatite e hiperplasia, principalmente em cães de meia-idade (Oliveira et al. 1996, Oliveira et al. 2007). No presente estudo, a frequência de infiltrado e a deposição de tecido conjuntivo fibroso não foram diferentes entre os grupos, contudo, a intensidade de ambos os processos foi maior no grupo de animais positivos sintomáticos. Na ocorrência de algum tipo de lesão tecidual, o processo reparador pode acontecer por regeneração ou por cicatrização (substituição por tecido conjuntivo fibroso) geralmente associada a infiltrado crônico inespecífico. Lee et al. (1997) demonstraram que a infiltração prostática por linfócitos e macrófagos aumenta com o avançar da idade e isto pode ocorrer sem haver infecção. Na leishmaniose, existem diferenças entre as respostas inflamatórias de acordo com a carga parasitária do animal e manifestação clínica da doença, um efeito tipicamente associado às características imunológicas dos grupos experimentais (Reis et al. 2006, Reis et al. 2009). Acredita-se assim, que a densidade de formas amastigotas em animais sintomáticos seja maior que em animais assintomáticos e com chance maior de macrófagos infectados migrarem para a próstata e intensificarem a resposta inflamatória que já ocorria naquele local. Porém, Diniz et al. (2005) não encontraram essa relação em cães com leishmaniose visceral. Houve diferença significativa entre os grupos sintomáticos e assintomáticos, na presença de atrofia prostática, contudo não houve diferença entre estes e o grupo controle. Essa alteração pode ocorrer em resposta à alteração da produção de andrógenos ou pela presença de inflamação que afeta diretamente o epitélio glandular. De acordo com Toledo et al. (2010), há influência da inflamação, principalmente do tipo mononuclear

(linfócitos, alguns plasmócitos e macrófagos) especialmente na região intersticial dos segmentos tubuloalveolares na presença de atrofia do epitélio glandular (*Proliferative Inflammatory Atrophy*- PIA). Como não existem dados sobre as idades dos animais utilizados no experimento, a influência da idade e estímulos hormonais na próstata desses animais possivelmente esteja presente. Dessa maneira, a hiperplasia não foi considerada como relevante na comparação entre os grupos experimentais porque é uma alteração comum em cães com mais de três anos de idade em decorrência da alteração na razão entre andrógeno e estrógeno secretado pelos testículos (Smith 2008).

Orquite e epididimite ocorrem com frequência na maioria das espécies animais por diferentes fatores (Thomé et al. 2007). As lesões inflamatórias são mais comuns no epidídimo do que no testículo e podem ocorrer por infecção ascendente secundária através do ducto deferente, por meio dos vasos linfáticos do cordão espermático, disseminação hematogênica e/ou em conjunto com infecção primária do trato urinário (Foster 2012). Animais positivos para LVC, sintomáticos ou não, apresentam formas amastigotas na maioria dos linfonodos sendo que a densidade dos parasitas varia de acordo com os níveis de anticorpos circulantes (Lima et al. 2010). Considerando que os testículos apresentam rica vascularização e rede linfática, seria possível inferir que as alterações testiculares encontradas fossem causadas pela presença de formas amastigotas oriundas dos linfonodos regionais que drenam o órgão ou por algum mecanismo ainda não conhecido (Diniz et al. 2005). Contudo, no estudo proposto, essa hipótese não foi confirmada, ou seja, a presença de formas amastigotas nos mesmos fragmentos analisados pela histopatologia, não foi associada às lesões no aparelho reprodutivo. A análise empregada para o efeito interativo entre as variáveis preditivas (exame parasitológico, grupo experimental e lesão) revelou que as lesões encontradas nos cães não foram decorrentes da presença das amastigotas nos órgãos (glândula prostática e testículo) e sim pelo efeito intrínseco à condição clínica, possivelmente de acordo com a debilidade individual predominante entre os grupos assintomático e sintomático. Alguns aspectos poderiam ser considerados em relação a esse achado. O primeiro envolve a possibilidade de que as amastigotas sejam um achado circunstancial nos *imprinting* no momento da colheita; o segundo, devido a dinâmica e transmigração leucocitária vascular no aparelho reprodutivo, especialmente dos macrófagos testiculares. Essas células além de fagocitarem as amastigotas, atuam como moduladoras do processo inflamatório possivelmente dependente da carga parasitária local (Reis et al. 2009, Winnall & Hedger, 2013). Por outro lado, sabe-se que, *in vitro*, as células de Sertoli secretam moléculas imunossupressoras, capazes de inibir a proliferação e atividade específica de linfócitos B e T, assim como a redução da secreção de Interleucina 2 (De Cesaris et al. 1992). Um exemplo da dificuldade de estabelecer essa relação está na ocorrência do processo degenerativo testicular. Essa patologia, além de ser prevalentemente comum nos caninos (Nascimento & Santos 1997) é multifatorial, estando associada a processos sistêmicos que envolvam febre, doenças metabólicas e traumáticas, além das infecciosas (Foster 2012). No caso da leishmaniose, é possível que a presença das formas amastigotas no ambiente testicular desencadeie uma resposta inflamatória que, dependendo do grau, resulte em degeneração do epitélio germinativo e azoospermia de forma lenta e progressiva (Amara et al. 2009, Labat et al. 2010). No entanto, é possível que tais alterações já estejam presentes antes do processo invasivo das formas parasitárias, induzindo a respostas variáveis do ponto de vista inflamatório e regenerativo cicatricial.

No epidídimo, devido a baixa prevalência de formas amastigotas (apenas três cães foram positivos, dois assintomáticos e um sintomático) não foi possível avaliar a interação entre este exame e os grupos experimentais, embora as lesões tenham sido distintas entre as regiões. Nos achados estão de acordo com outros estudos que reportam a epididimite como o processo patológico mais importante. Usualmente, as lesões envolvem a cauda e, mais raramente, o corpo e cabeça do epidídimo (Foster & Ladds, 2007, Foster 2012). No presente estudo, observou-se que a fibrose foi mais frequente que a presença do infiltrado linfomononuclear, sugerindo a presença de processos mais cronificados nesse órgão. O efeito da LVC na função epididimal ainda é controverso. Animais sorologicamente positivos podem apresentar qualidade seminal insatisfatória e, quando tratados, as alterações podem ser revertidas parcialmente, melhorando a qualidade seminal (Assis et al. 2010). Além disso, os perfis leucocitários no aparelho reprodutivo de cães sorologicamente negativos e positivos, sintomáticos e assintomáticos, são diferentes de acordo com o local e respostas frente às formas amastigotas, caracterizados pelo maior número de neutrófilos, macrófagos e linfócitos (Benites et al. 2011).

CONCLUSÃO

As alterações histopatológicas encontradas no aparelho reprodutivo masculino de cães infectados naturalmente com LVC, são inespecíficas, estando associadas à presença ou não de sinais clínicos sistêmicos. Não há relação entre a presença de amastigotas e lesões histológicas em diferentes segmentos do aparelho reprodutivo. Acredita-se que devido às alterações que a doença causa em todo organismo, a LVC pode intensificar processos inflamatórios pré-existentes no aparelho reprodutivo masculino de cães.

Agradecimentos.- Os autores agradecem a FUNDECT-MS pelo apoio e suporte financeiro para esse estudo.

REFERÊNCIAS

- Amara A., Mrad I., Melki M.K., Mrad M.B. & Rejeb A. 2009. Etude histologique des lésions testiculaires chez les chiens leishmaniens. *Revue Méd. Vét.* 160:54-60.
- Assis V. P., Ribeiro V.M., Rachid M. A., Castro A. C. S. & Valle G.R. 2010. Dogs with *Leishmania chagasi* infection have semen abnormalities that partially revert during 150 days of Allopurinol and Amphotericin B therapy. *Anim. Reprod. Sci.*, 117:183-186.
- Benites A.P., Fernandes C.E., Brum K.B., Maria Auxiliadora G.S. & Abdo M.A.G.S. 2011. Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de cães. *Pesq. Vet. Bras.* 31:72-77.
- Cabello I., Caraballo A. & Millán, Y. 2002. Leishmaniasis in the genital area. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 44: 105-107.
- Deane L.M. & Deane M.P. 1962. Visceral leishmaniasis in Brazil. Geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop.* 4:198.
- De Cesaris P., Filippini A., Cervelli C., Riccioli A., Muci S., Starace G., Stefanini M. & Ziparo E. 1992. Immunosuppressive molecules produced by Sertoli cells cultured in vitro: biological effects on lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186: 1639-1646.
- Diniz S. A., Melo, M. S., Borges, A. M., Bueno, R., Reis, B. P., Tafuri, W. L., Nascimento, E. F. & Santos, R. L. 2005. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Vet. Pathol.*, 42:650-658.
- Foster R. & Ladds P. W. 2007. Male genital system, p. 565-619. In: Maxie G, (Ed). Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. 5ª Edição, vol. 3. Saunders Elsevier, Oxford, England.
- Foster R. A. 2012. Common Lesions in the Male Reproductive Tract of Cats and Dogs. *Vet Clin Small Anim.* 42: 527-545.
- Gramiccia M. & Gradoni, L. 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Intern. Jour. Paras.* 35:11-12:1169-1180.
- Labat É., Carreira J. T., Matsukuma B. H., Martins M.T.A., Lima V.M.F., Bomfim S.R.M., Perri S.H.V. & Koivisto, M.B. 2010. Qualidade espermática de sêmen de cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. [Semen quality of dogs naturally infected by Leishmaniasp.] *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62,3:609-614.
- Lee C., Kozlowski J. M. & Grayhack J. T. 1997. Intrinsic and extrinsic factors controlling benign prostatic growth. *Prost.* 31:131-138
- Lima L.V.R.; Carneiro L.A.; Campos M.B.; Chagas E.J.; Laurenti M.D.; Corbett C.E.P.; Lainson R. & Silveira F.T. 2010. Canine visceral leishmaniasis due to *Leishmania(L.) infantumchagasi* in Amazonian Brazil: comparison of the parasite density from the skin, lymph node and visceral tissues between symptomatic and asymptomatic, seropositive dogs. *Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo.* 52,5:259-65.
- Nascimento, E. F. & Santos, R. L. 1997. Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos. Ed. Guanabara Koogan. 108 p.
- Oliveira E.G., Amorim R. L. & Dias, G. F. 1996. Afecções da próstata em cães na região de Botucatu, estado de São Paulo. In: congresso de iniciação científica da UNESP, 8., 1996, Guaratinguetá. Anais... Guaratinguetá.
- Oliveira K.S., Araújo E.G., Silva L.A.F. & Menezes L.B. 2007. Alterações prostáticas de cães adultos necropsiados na escola de veterinária da universidade federal de Goiás de maio a julho de 2004. *Ciê. Ani. Bras.* 8:267-272.
- Owens S.D., Oakley D.A., Marrayott K., Hatchett W., Walton R., Nolan T.J., Newton A., Steurer F., Schantz P. & Giger U. 2001. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219:1076-1083.
- Reis A.B., Martins-Filho O.A., Teixeira-Carvalho A., Carvalho M.G., Mayrink W., França-Silva J.C., Giunchetti R.C., Genaro O. & Corrêa-Oliveira R. 2006. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.* 81:68-75.
- Reis A.B., Martins-Filho O.A., Teixeira-Carvalho A., Giunchetti R.C., Carneiro C.M., Mayrink W., Tafuri W.L. & Corrêa-Oliveira R. 2009. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128:87-95.
- Russel L, Ettlin R.A., Sinha Hikim A.P. & Clegg E.D. 1990. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Cache River Press, MO, 1ª Ed. 286p.
- Slauson D.O. & Cooper B.J. 2002. Mechanisms of diseases. A textbook of comparative general pathology. 3ª Ed, Mosby, USA. 445p.
- Silva F.L., Oliveira R.G., Silva T.M.A., Xavier M.N., Nascimento E.F. & Santos R.L. 2009. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 160:55-59.
- Smith J. 2008. Canine prostatic disease: A review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. *Theriog.* 70:375-383.
- Symmers W.S.C. 1960. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. *Lancet.* 16:127-132

- Thomé H.E., DiSantis G.W. & Moura V.M.B.D., Amorim R.L., Bandarra E.P. 2007. Avaliação histopatológica testicular e epididimária em cães adultos sem raça definida (SRD) da região de São João da Boa Vista, SP. Ciên. Anim. Bras. 8, 4:745-755.
- Toledo D.C., Faleiro M. B.R., Rodrigues M.M.P., Santis G.W. di, Amorim R.L. & de Moura V.M.B.D. 2010. Caracterização histomorfológica da atrofia inflamatória proliferativa na próstata canina. Ciê. Rur. 40,6:1372-1377.
- Tolosa E.M.C., Rodrigues C.J. & Behmer O.A., Freitas Neto A.G. 2003. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. Editora Manole Ltda., 2a Ed. 331p.
- Werneck, G. L.; Pereira, T. J. C. F.; Farias, G. C.; Silva, F. O.; Chaves, F. C.; Gouvea, M. V.; Costa, C. H. N. & Carvalho, F. A. A. 2007. Avaliação da efetividade das estratégias de controle da leishmaniose visceral na cidade de Teresina, estado do Piauí, Brasil: resultados do inquérito inicial – 2004. Epidemiologia e serviços de saúde, v.17, n.2, p.87-96.
- Winnall, W. R. & Hedger, M. P. 2013. Phenotypic and functional heterogeneity of the testicular macrophage population: a new regulatory model. J. Immunol. Reprod. 97:147-158.

Legendas de Figura

Figura 1. Frequência (%) de infiltrado linfomononuclear e fibrose intersticial em diferentes regiões epididimais de cães sorologicamente positivos assintomáticos, sorologicamente positivos sintomáticos e sorologicamente negativos (controle) para LVC, oriundos do CCZ de Campo Grande, MS. Letras distintas entre colunas representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre grupos.

Os Quadros

Quadro 1. Frequência de alterações histopatológicas encontradas na próstata de animais sorologicamente positivos assintomáticos, sorologicamente positivos sintomáticos e sorologicamente negativos (controle) para LVC, oriundos do CCZ de Campo Grande, MS.

Grupos	Próstata				
	Atrofia	Fibrose	Intensidade Fibrose	Infiltrado	Intensidade Infiltrado
Assintomático (n=25)	14 (20,3%) ^a	18 (26,1%) ^a	1,2 ^a	19 (27,2%) ^a	1,3 ^a
Sintomático (n=25)	20 (29%) ^b	20 (29%) ^a	2,1 ^b	21 (30,4%) ^a	2,0 ^b
Controle (n=20)	16 (23,2%) ^{a,b}	16 (23,2%) ^a	1,4 ^a	18 (26,1%) ^a	1,5 ^a

Letras diferentes entre as linhas indicam diferença estatística ($P \leq 0.05$).

Quadro 2. Frequência de alterações histopatológicas encontradas no testículo de animais sorologicamente positivos assintomáticos, sorologicamente positivos sintomáticos e sorologicamente negativos (controle) para LVC, oriundos do CCZ, Campo Grande, MS.

Grupos	Testículo					
	Degeneração	Hipoplasia	Infiltrado	Fibrose	Intensidade Infiltrado	Edema
Assintomático (n=25)	15 (21,4%) ^a	8 (11,6%) ^a	9 (12,9%) ^a	0 (0%) ^a	0,7 ^a	4 (5,7%) ^a
Sintomático (n=25)	19 (27,1%) ^a	15 (21,7%) ^a	16 (22,9%) ^a	5 (7,1%) ^b	1,6 ^a	3 (4,3%) ^a
Controle (n=20)	10 (14,3%) ^b	1 (1,4%) ^b	0 (0%) ^b	0 (0%) ^a	0 ^b	1 (1,4%) ^a

Letras diferentes entre as linhas indicam diferença estatística ($P \leq 0.05$).

Quadro 3. Efeito interativo para as frequências observadas (%) de casos positivos e negativos de acordo com alterações histológicas prostáticas, exame parasitológico e grupo experimental em cães com Leishmaniose Visceral Canina, Campo Grande, MS.

Parasitológico	Atrofia	Grupo experimental			Efeito interativo*	χ^2	P
		Controle n (%)	Assintomático n (%)	Sintomático n (%)			
(+)	(+)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (4,3)	Atrofia X Grupo	3,904	0,142
(-)	(+)	16 (23,2)	14 (20,3)	16 (23,4)	Paras. ¹ X Grupo	5,328	0,070
(+)	(-)	0 (0,0)	2 (2,9)	0 (0,0)	Paras. X Atrofia	0,444	0,505
(-)	(-)	4 (5,8)	9 (13,0)	4 (5,8)			
		Fibrose					
(+)	(+)	0 (0,0)	1 (1,4)	3 (4,3)	Paras. X Grupo	3,847	0,146
(-)	(+)	16 (23,2)	17 (24,6)	16 (23,2)	Fibrose X Grupo	0,959	0,619
(+)	(-)	0 (0,0)	1 (1,4)	0 (0,0)	Paras. X Fibrose	0,005	0,944
(-)	(-)	4 (5,8)	6 (8,7)	4 (5,8)			
		Infiltrado ²					
(+)	(+)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (4,3)	Paras. X Grupo	3,756	0,153
(-)	(+)	18 (26,1)	19 (27,5)	18 (26,1)	Infiltrado X Grupo	1,804	0,406
(+)	(-)	0 (0,0)	2 (2,9)	0 (0,0)	Paras. X Infiltrado	1,736	0,188
(-)	(-)	2 (2,9)	4 (5,8)	3 (4,3)			

*Estimado pela análise Loglinear, modelo não hierárquico; efeito ordenado interativo de segunda ordem considerando o conjunto de casos observados (n=70)

¹ Exame parasitológico de acordo com a presença de, no mínimo, uma amastigota em *imprinting* de fragmento tecidual

² Infiltrado linfomononuclear

Quadro 4. Efeito interativo para as frequências observadas (%) de casos positivos e negativos de acordo com alterações histológicas testiculares, exame parasitológico e grupo experimental em cães com Leishmaniose Visceral Canina, Campo Grande, MS.

Parasitológico	Degeneração	Grupo experimental			Efeito interativo*	χ^2	P
		Controle n (%)	Assintomático n (%)	Sintomático n (%)			
(+)	(+)	0 (0,0)	10 (14,3)	4 (5,7)	Paras. ¹ X Grupo	25,055	0,000
(-)	(+)	10 (14,3)	9 (12,9)	11 (15,7)	Degen. ² X Grupo	3,497	0,174
(+)	(-)	0 (0,0)	5 (7,1)	1 (1,4)	Paras. X Degen.	0,135	0,713
(-)	(-)	11 (15,7)	1 (1,4)	8 (11,4)			
		Infiltrado ³					
(+)	(+)	0 (0,0)	9 (12,8)	4 (5,7)	Infiltrado X Grupo	25,352	0,000
(-)	(+)	0 (0,0)	7 (10,0)	8 (11,4)	Paras. X Grupo	24,076	0,000
(+)	(-)	0 (0,0)	6 (8,5)	4 (5,7)	Paras. X Infiltrado	0,966	0,326
(-)	(-)	20 (28,6)	3 (4,3)	11 (15,7)			
		Fibrose					
(+)	(+)	0 (0,0)	3 (4,3)	0 (0,0)	Paras. X Grupo	23,222	0,000
(-)	(+)	0 (0,0)	2 (2,8)	8 (11,4)	Fibrose X Grupo	8,683	0,013
(+)	(-)	0 (0,0)	2 (2,8)	0 (0,0)	Paras. X Fibrose	0,000	-
(-)	(-)	20 (28,6)	8 (11,4)	19 (27,1)			

*Estimado pela análise Loglinear, modelo não hierárquico; efeito ordenado interativo de segunda ordem considerando o conjunto de casos observados (n=70)

¹ Exame parasitológico de acordo com a presença de, no mínimo, uma amastigota em *imprinting* de fragmento tecidual

² Degeneração testicular

³ Infiltrado linfomononuclear

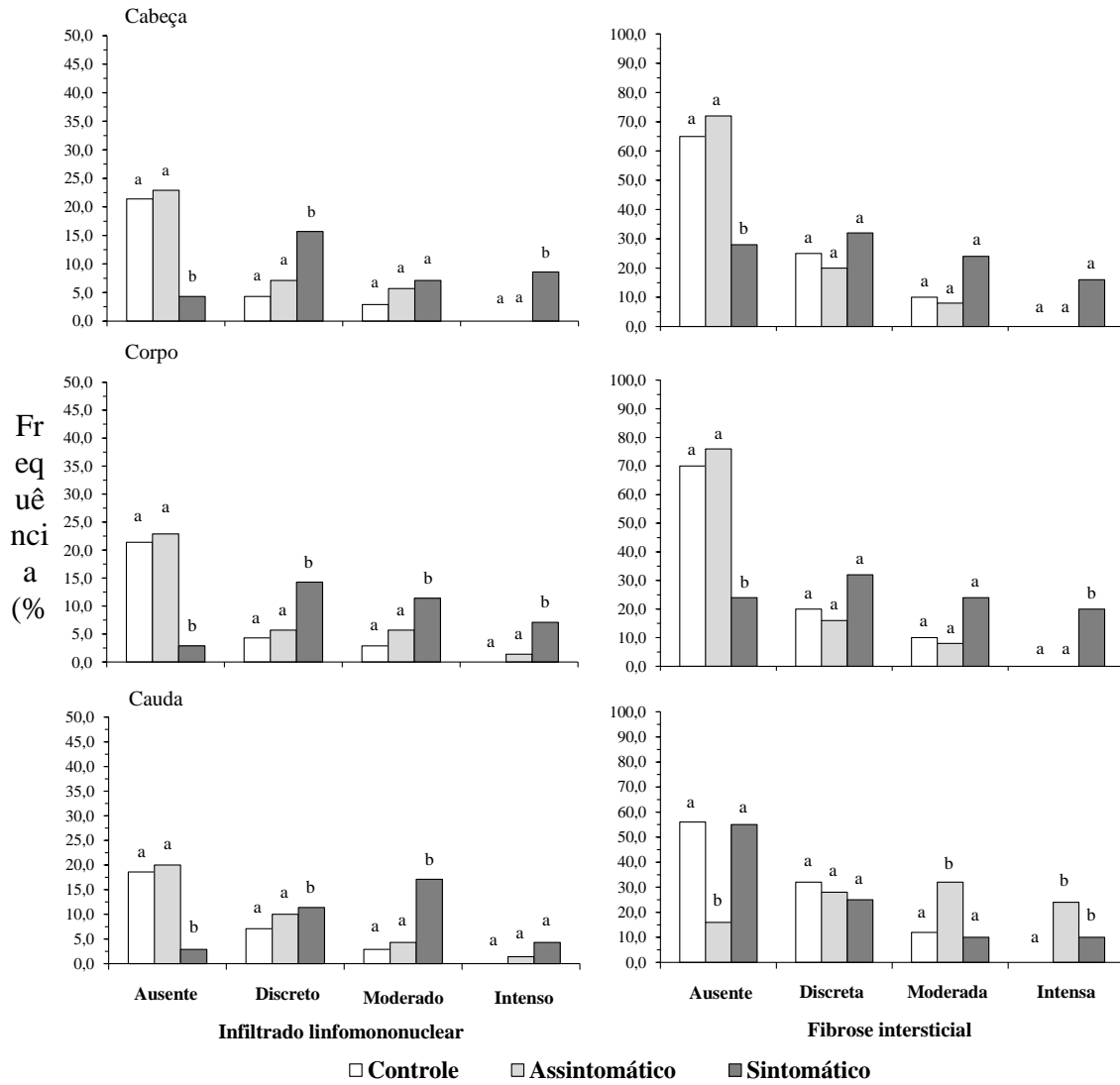


Figura 1.