

NATHALIA FRIGO DE ALMEIDA PAULA

**Estudo molecular dos sistemas reprodutores de gatos infectados  
por *Leishmania* spp.**

São Paulo

2023

NATHALIA FRIGO DE ALMEIDA PAULA

**Estudo molecular dos sistemas reprodutores de gatos infectados  
por *Leishmania* spp.**

**VERSÃO CORRIGIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Departamento:**

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

**Área de concentração:**

Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses

**Orientador:**

**Profa. Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira**

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

#### Catálogo na Publicação

Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade de São Paulo

Ficha catalográfica gerada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Paula, Nathalia Frigo de Almeida  
Estudo molecular dos sistemas reprodutores de gatos infectados  
por *Leishmania* spp. / Nathalia Frigo de Almeida Paula ; orientador  
Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira .-- Pirassununga, 2023.  
45 f. : il.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia  
Experimental e Aplicada às Zoonoses - Departamento de Medicina  
Veterinária Preventiva e Saúde Animal) - Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2023.

1. Leishmaniose. 2. Felino. 3. Órgãos Reprodutivos. I. Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura de catalogação  
na publicação: Maria Aparecida Laet - CRB 5673-8.

---



### CERTIFICADO : EMENDA v19/05/2023

Certificamos que a EMENDA (versão de 19/05/2023) da proposta intitulada "Estudo molecular e histológico dos sistemas reprodutores de gatos infectados por *Leishmania* spp.", CEUA nº 5132160522 (ID 023154), sob a responsabilidade de **Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira e equipe; Nathália Frigo de Almeida** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) em 30/06/2023.

Pedido apresentado à CEUA: O número de animais a ser analisado será maior devido à disponibilidade do CCZ e de veterinários parceiros do CCZ de Ilha Solteira em coletar suabe conjuntival e doar os órgãos reprodutivos dos gatos que foram castrados em mutirão do CCZ do município. Ao todos três veterinários e o CCZ doaram os órgãos reprodutivos de gatos castrados em mutirão do município (TCLEs em anexo) e também coletaram amostras de suabe conjuntival dos animais durante o procedimento de castração realizado por eles. Portanto, os pesquisadores não farão nenhum tipo de cirurgia ou coleta nos gatos (como na proposta inicial). Apenas vamos receber os órgãos e amostras de suabe coletados pelos veterinários e CCZ de Ilha Solteira em 302 gatos.

Término previsto: 04/2024

Origem:	Centro de Controle de Zoonoses de Ilha Solteira			
Espécie:	Gatos	sexo: Machos e Fêmeas	idade: 1 a 240 meses	Quantidade solicitada: 302
Linhagem:	SRD		Peso: 100 a 1000 g	
Origem:	Centro de Controle de Zoonoses de Ilha Solteira			
Espécie:	Gatos	sexo: Machos e Fêmeas	idade: 1 a 20 anos	Quantidade mantida: 0
Linhagem:	Sem raça		Peso: 1 a 10 kg	
Origem:	Associação Protetora de Animais de Ilha Solteira (APAISA) CNPJ 03.915.542/0001-82			
Espécie:	Gatos	sexo: Machos e Fêmeas	idade: 1 a 20 anos	Quantidade mantida: 0
Linhagem:	Sem raça		Peso: 1 a 10 kg	

#### ANIMAIS UTILIZADOS

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Gatos	Machos e Fêmeas	6	0
Gatos	Machos e Fêmeas	308	0

Pirassununga, 01 de julho de 2023



## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PAULA, Nathalia Frigo de Almeida

Título: Estudo molecular dos sistemas reprodutores de gatos naturalmente infectados por *Leishmania* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof.Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

—

Prof.Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

—

Prof.Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho ao meu amigo e parceiro de trabalho Diogo Tiago da Silva e aos meus pais Sandra Marcia Frigo Paula e Edson Benedito de Almeida Paula.*

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora Profa. Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira;

Aos meus colegas de trabalho Diogo, Maria Fernanda, Maria Luana, João Augusto, Mayara, Andreina e Julia;

A Profa. Dra. Wilma Aparecida Starke Buzetti, que me introduziu na pesquisa;

As instituições de ensino e pesquisa Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), a Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), ambas da Universidade de São Paulo (USP), a Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FEIS/ UNESP);

A todos os veterinários que doaram os materiais que possibilitaram a realização da presente pesquisa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que financiou o presente estudo, número de Processo: 161578/2021-7;

Aos meus pais Sandra Márcia e Edson, assim como toda a minha família;

Aos meus amigos Alexsander, Beatriz Silva, Beatriz Schenaide, Clara, João Marcos, Isabella, Luiz Fernando, Luiz Henrique, Mariana, Maurício, Mayara, Myllena, Odair Junior, Patrícia, Priscila;

Obrigada por me apoiarem ao longo destes anos.

## **RESUMO**

PAULA, N. F. A. Estudo molecular dos sistemas reprodutores de gatos infectados por *Leishmania* spp. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

*Leishmania* é um protozoário parasito causador de importantes doenças zoonóticas, conhecidas como leishmanioses. A principal forma de transmissão desse parasito é por meio da picada de insetos flebotomíneos infectados. Contudo, outras formas de transmissão têm sido estudadas, como a infecção vertical e venérea, relatadas anteriormente em seres humanos e cães. Sabendo-se que os gatos também são reservatórios do parasito, capazes de transmitir *Leishmania* ao vetor e participando na manutenção de seu ciclo e que a infecção por *Leishmania* spp. já foi relatada em diversos tecidos de gatos, se faz relevante a investigação da possibilidade da transmissão vertical e venérea nessas espécies. O presente estudo verificou a presença de DNA do parasito *Leishmania* no sistema reprodutor de gatos advindos de uma região endêmica para leishmaniose visceral. Um total de 302 gatos tiveram o suabe conjuntival coletado e a presença de DNA de *Leishmania* avaliada nessas amostras. Desses 302, 40 eram de um estudo anterior e passaram por exames sorológicos, PCR de suabe conjuntival e sangue. O sistema reprodutor de 41 gatos machos e fêmeas foi avaliado e o DNA de *Leishmania* spp. foi detectado em três deles, sendo os órgãos positivos o testículo, epidídimo, ovário e útero. O sequenciamento genético de duas amostras confirmou que em dois casos a espécie infectante era *Leishmania infantum*. Essa descoberta reforça a preocupação com infecções verticais e venéreas por esse parasito, nessa espécie de hospedeiro.

Palavras-chave: Leishmaniose, felino, órgãos reprodutivos

## ABSTRACT

PAULA, N. F. A. Molecular study of the reproductive systems of cats infected by *Leishmania* spp. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

*Leishmania* is a protozoan parasite that causes important zoonotic diseases known as leishmaniasis. The main route of transmission of this parasite is the bite of infected phlebotomine insects. However, other transmission routes have been studied, such as vertical and venereal infection, previously reported in humans and dogs. Knowing that cats are also reservoirs of the parasite, capable of transmitting *Leishmania* to the vector and participating in the maintenance of its cycle, and that *Leishmania* spp. infection has already been reported in various cat tissues, it is important to investigate the possibility of vertical and venereal transmission in this species. This study verified the presence of *Leishmania* DNA in the reproductive system of cats from a visceral leishmaniasis endemic area. To this end, a total of 302 cats had their conjunctival swabs collected and the presence of *Leishmania* DNA assessed in these samples. Of these 302, 40 were from a previous study and were subjected to serological tests, PCR of conjunctival swabs and blood. The reproductive system of 41 male and female cats was evaluated and *Leishmania* spp. DNA was detected in three of them. The testicle, epididymis, ovary and uterus were positive. Genetic sequencing of two samples confirmed that, in two cases, the infecting species was *Leishmania infantum*. This finding reinforces the concern about vertical and venereal infections in cats.

Keywords: Leishmaniasis, feline, reproductive organs

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Gatos que foram positivos para PCR 13A/13B do sistema reprodutor. pág. 36

# SUMÁRIO

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	13
<b>2. Revisão de literatura</b> .....	15
<b>2.1. Leishmanioses</b> .....	15
<b>2.2. Gatos como reservatório da <i>Leishmania</i></b> .....	16
<b>2.3. Diagnóstico de leishmaniose felina</b> .....	17
<b>2.4. Transmissão vertical e venérea da leishmaniose</b> .....	19
<b>3. Objetivo</b> .....	21
<b>4. Referências Bibliográficas</b> .....	21
<b>Resumo</b> .....	30
<b>Abstract</b> .....	31
<b>1. Introdução</b> .....	31
<b>2. Material e métodos</b> .....	33
<b>2.1. Área de estudo</b> .....	33
<b>2.2. Seleção dos animais</b> .....	33
<b>2.3. Amostras</b> .....	33
<b>2.4. Ensaio moleculares</b> .....	34
<b>3. Resultados</b> .....	35
<b>3.1. PCR das amostras dos suabes conjuntivais e amostras doadas de pesquisas anteriores</b> .....	35
<b>3.2. PCR das amostras dos tecidos do sistema reprodutor</b> .....	35
<b>4. Discussão</b> .....	37
<b>5. Conclusão</b> .....	39
<b>Agradecimentos</b> .....	39
<b>Referências</b> .....	39

## 1. Introdução

A saúde humana e a animal são elementos interligados. Os seres humanos dependem dos animais para sua nutrição, companhia, desenvolvimento tecnológico, socioeconômico e científico, o que fortalece a preocupação referente às enfermidades transmitidas naturalmente, comuns a seres humanos e animais, chamadas de zoonoses. Mais de 200 zoonoses são conhecidas e uma das mais relevantes para a saúde pública no Brasil são as leishmanioses (Andrade, 2002; Who, 2021).

A Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), em 2018, aprovou o Plano de ação sobre entomologia e controle de vetores 2018- 2023 e, em 2021, Saúde Única: um enfoque integral para abordar as ameaças à saúde na interface homem-animal-ambiente, assim dando apoio a iniciativas de monitoramento e controle das leishmanioses nas sub-regiões das américas, do Sul e Central. Com isso, no período de 2001 a 2021, 17 países da Região notificaram à OPAS 1.105.545 casos de leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LM), com uma média de 52.645 casos ao ano. A região andina e o Brasil registraram 896.790 casos, correspondendo respectivamente a 40,79% e 37,60% dos casos na região. Houve 69.665 casos novos de leishmaniose visceral (LV) na Região das Américas, com uma média anual de 2.488 casos. No ano de 2021, 93,5% dos casos de LV foram registrados no Brasil (Opas, 2022).

As leishmanioses podem ser classificadas dentro das zoonoses como protozoonoses, visto que são doenças infecciosas crônicas, causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), pertencente ao reino Protozoa, filo Euglenozoa, classe Kinetoplasta, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae (Taylor; Coop; Wall, 2017).

A forma de transmissão do parasito é por meio da picada da fêmea do mosquito-palha infectado. Esses mosquitos são da subfamília Phlebotominae, também chamados de flebotomíneos. Dentre os flebotomíneos, o vetor principal das leishmanioses no Brasil é o gênero *Lutzomyia*, e a principal espécie é a *Lutzomyia longipalpis* (Lewis, 1974; Santos, 1998; Rangel & Lainson, 2003). O flebotomíneo se infecta ingerindo os macrófagos com amastigotas de *Leishmania* do mamífero infectado. Essas amastigotas, dentro do flebotomíneo, se transformam em promastigotas, a forma infectante da *Leishmania*. O flebotomíneo, ao realizar um novo repasto sanguíneo, acabará depositando as promastigotas no próximo mamífero. Os macrófagos desse mamífero irão fagocitar as promastigotas e as

carregar por todo o corpo do animal na forma de amastigotas (Pearson; Steigbigel, 1981; Laskay et al., 2003; Oliveira, 2003).

No entanto, outras formas de transmissão também já foram descritas. Em humanos já foram relatadas transmissões, por transfusão sanguínea, compartilhamento de seringas, acidentes de laboratórios e transmissões congênitas (Burza; Croft; Boelaert, 2018). Em humanos a transmissão vertical da leishmaniose tem sido relatada em diversos estudos. A detecção do DNA de *Leishmania* spp. no sangue do cordão umbilical, no sangue total e medula óssea do recém-nascido, são os indicativos que a mãe infectada pelo parasito o transmitiu de forma congênita (Mescouto-Borges et al., 2013; Argy et al., 2020; Elarabi et al., 2020).

Em cães, há relatos de transmissão por transfusão sanguínea, via transplacentária e venérea (Owens et al., 2001; Rosypal et al., 2005; Silva et al., 2009). A transmissão vertical em cães tem sido muito estudada, principalmente nos Estados Unidos, devido às detecções de cães infectados por *Leishmania* spp. na ausência de vetor (Toepp et al., 2017). Em trabalhos consecutivos, foi descoberto que mães infectadas têm grande probabilidade de infectar os seus filhos, contudo, tais filhotes podem ter diferentes respostas biológicas ao parasito, podendo evoluir para doença oligossintomática, ou sendo assintomático com sorologia positiva, ou até mesmo ser completamente saudável (Vida et al., 2016; Ozanne, et al., 2019; Toepp, et al., 2019).

Com mais relatos ao longo do tempo sobre essas formas de transmissão que não são feitas pelo vetor biológico da *Leishmania*, surge a preocupação da ocorrência de transmissão vertical e venérea em populações de outros animais que também são reservatórios do parasita. O gato doméstico teve seu papel como reservatório confirmado, transmitindo o parasito aos vetores em ensaios de xenodiagnóstico (Maroli et al., 2007, Silva et al., 2010, Mendonça et al., 2020; Vioti et al., 2021). Dessa forma, o presente trabalho é um estudo sobre a presença do DNA de *Leishmania* spp. em órgãos do sistema reprodutor de gatos, o que pode indicar a possibilidade da transmissão venérea e vertical também nesta espécie

## 2. Revisão de literatura

### 2.1. Leishmanioses

*Leishmania* é o gênero de protozoários parasitos causadores das doenças denominadas leishmanioses. O parasita, inicialmente descrito em um paciente da Índia em 1903 (ROSS, 1903), também vinha sendo estudado na América do Sul, e o primeiro caso de leishmaniose relatado no Brasil, mais especificamente um caso de leishmaniose tegumentar, foi em 1913, diagnosticado pelo médico paraguaio Migone Mieres em um morador do Mato Grosso. Alguns anos depois, a LV apareceu como problema de saúde pública no Brasil. Em 1934, em meio às análises de fígado de pacientes do Norte e Nordeste do país, relacionadas a outras doenças, o patologista Henrique Penna identificou protozoários do gênero *Leishmania*. A partir disso, 41 óbitos foram relacionados à LV. O estudo da epidemiologia da doença passou a ser de grande importância em todas as regiões do nosso país (Migone, 1913; Penna, 1934; Benchimol, et al. 2019).

Contudo, os humanos não seriam os únicos afetados por essa infecção parasitária, à medida que estudavam o ciclo biológico da *Leishmania* e analisavam casos veterinários, foi-se compreendendo que havia vários mamíferos reservatórios do protozoário.

A principal forma de transmissão do parasito para o ser humano e outros hospedeiros mamíferos é pela picada da fêmea infectada de insetos hematófagos da ordem Díptera; família Psychodidae; subfamília Phlebotominae, conhecidos popularmente como mosquitos palha, Birigui ou tatuquiras, e que consistem em várias espécies de tamanho bastante reduzido, cerca de 2 a 3 mm, dentre as quais a espécie *Lu. Longipalpis* é a principal transmissora de *Leishmania infantum*, (Silva et al, 2014; Vianna et al, 2016; Brasil, 2020a). A atividade desses vetores é crepuscular e noturna, sendo que, no intra e peridomicílio, o *Lu. longipalpis* é encontrado principalmente próximo a uma fonte de alimento (BRASIL, 2006). As fêmeas realizam o repasto sanguíneo no período noturno, iniciando-o cerca de uma hora após o crepúsculo (Castro, 1996). Realiza seu ciclo larval na matéria orgânica úmida e de baixa incidência luminosa, fato que dificulta o combate desses vetores (Santa Rosa; Oliveira, 1997).

Ao repousar sobre o hospedeiro vertebrado infectado, o mosquito pica-o através da pele e ingere com o sangue as formas amastigotas de *Leishmania*, onde no intestino médio do inseto sofrem divisão binária, modificam-se em promastigotas e migram para o intestino anterior. Na parede do intestino anterior, fixadas pelo flagelo, sofrem multiplicação e diferenciação, transformando-se em promastigotas metacíclicas infectantes que são

inoculadas na pele de outro hospedeiro pela probóscide do flebotomíneo durante um novo repasto sanguíneo (Killick-Kendrick, 2002).

Na epiderme do hospedeiro, durante o repasto sanguíneo do inseto infectado, ocorre a inoculação das formas promastigotas e da saliva que pode modular a resposta imune local. Uma vez inseridas, as formas promastigotas são fagocitadas inicialmente por neutrófilos que são capazes de eliminar o parasita por uma série de mecanismos leishmanicidas. Contudo, uma pequena população parasitária pode sobreviver em seu interior e levar a perpetuação do parasita por uma importante via de escape da resposta imune inata. (Pearson; Steigbigel, 1981; Laskay et al., 2003). Quando as promastigotas são fagocitadas por neutrófilos e macrófagos, elas se diferenciam rapidamente em formas amastigotas, com formato arredondado e sem flagelo. Estes parasitos multiplicam-se até que ocorra o rompimento dos macrófagos e neutrófilos inicialmente infectados, e então, as formas amastigotas liberadas infectam novos macrófagos, resultando no desenvolvimento da doença (Oliveira, 2003).

No ambiente silvestre as raposas, cachorro-do-mato (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) são incriminados como reservatórios (Brasil, 2020a). Em uma revisão e metanálise realizada por Ratzlaff e seus colaboradores (2023), no período de 2001 a 2021, estudos relatam um total de 13.905 animais avaliados quanto à presença de protozoários pertencentes à *Leishmania* e dentre todos os animais avaliados, 25% estavam infectados por uma ou mais espécies de *Leishmania*. Animais das ordens Perissodactyla (cavalos, burros, pôneis), Carnívora (gatos, cachorro-do-mato, lobo-guará, quati rabo anelado, raposa brasileira), Rodentia (ratos), Didelphimorphia (gambás) e Chiroptera (morcegos), tiveram a presença de *Leishmania* spp. detectadas. Tais animais pertenciam a 229 espécies.

Já no ambiente urbano, o cão é considerado o principal reservatório da LV (Brasil, 2022). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, a LV afeta mais de 3.500 pessoas anualmente e para cada humano afetado, a estimativa é que haja 200 cães infectados (Brasil, 2020b). Sendo assim, são considerados de extrema importantes na epidemiologia da doença.

## **2.2. Gatos como reservatório da *Leishmania***

Os gatos eram inicialmente considerados hospedeiros acidentais de parasitos do gênero *Leishmania* (PENNISI, 2002). Com a capacidade de transmissão de *L. infantum* aos

vetores desse parasito no Brasil e na Europa confirmados em ensaios de xenodiagnóstico (Silva et al., 2010; Maroli et al., 2007), passaram a ser mais estudados como possíveis reservatórios do parasito (Maia; Campino, 2011). Casos de Leishmaniose Felina (LF) foram descritos em países da América do Sul, América do norte, Sul da Europa e Ásia Ocidental, e o número de casos notificados de LF tem aumentado nos últimos anos (Pereira et al., 2019 ; Costa-Val et al., 2020; Fernández-Gallego et al., 2020; Carneiro et al., 2020; Hopke et al., 2021; Baneth et al., 2022; Aguiar et al., 2023; Kleinerman et al., 2023). Sete espécies de *Leishmania* já foram identificadas infectando esses animais: *L. (Leishmania) infantum*, *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (Leishmania) venezuelensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Leishmania) amazonensis* (Pennisi et al., 2015), *L. (Leishmania) major* e *L. (Leishmania) tropica* (Paşa et al., 2015).

Mesmo o gato doméstico podendo ser infectado por diversas espécies de *Leishmania*, este pode ou não apresentar sinais clínicos (Dantas-Torres, 2006). A falta de diagnóstico precoce da LF pode implicar com que o animal continue a representar risco potencial de transmissão de leishmanias aos vetores, pois estudos demonstram que a infecção em gatos pode permanecer por longos períodos, mantendo o risco de transmissão aos flebotomíneos (Maia; Campino, 2011).

### **2.3. Diagnóstico de leishmaniose felina**

Nos gatos infectados com *Leishmania* spp. os sinais clínicos incluem perda de peso, lesões cutâneas no nariz, nas orelhas, no corpo, alopecia, descamação da pele, aumento nos linfonodos, lesões oculares. Entre as alterações hematológicas estão a baixa de plaquetas com aumento da proteína total e baixa albumina sérica (Vioti et al., 2022; Silva et al., 2023).

Entre os testes laboratoriais mais utilizados para detecção da LF estão os testes indiretos como os sorológicos, que demonstram a resposta imune do hospedeiro à infecção e os testes diretos como citologia, histologia, imuno-histoquímica, cultura e PCR, que demonstram a presença do parasita ou do seu DNA no hospedeiro (Pereira; Maia, 2021).

Os testes sorológicos mais comuns utilizados para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em gatos são o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o teste de anticorpos imunofluorescentes (RIFI). Para cães, também é utilizado o imunoensaio cromatográfico Dual Path Platform (DPP®), que é um teste rápido de triagem. Estes são considerados testes de referência para o sorodiagnóstico da leishmaniose canina e humana (OPAS, 2023).

Estudos recentes também utilizaram estes testes para avaliar a exposição de gatos a *Leishmania*, como o de Leonel et al. (2020) e o de Alves et al. (2022), que detectaram uma alta soroprevalência para *Leishmania* spp. em gatos de abrigos em área endêmica para LC e LV no Brasil. Alves e colaboradores (2022) também observaram que a maioria dos gatos infectados do estudo tinha um ponto de corte de 1:40 na RIFI, diferente do 1:80 recomendado na literatura (Pennisi et al., 2015; Persichetti et al., 2017).

A citologia para detecção de *Leishmania* spp. é recomendada em gatos com doenças de pele erosivas, lesões nodulares e/ou linfadenomegalia. O material pode ser obtido por biópsia com agulha fina (Brianti et al., 2019; Headley et al., 2019; Silva et al., 2020; Fernandez-Gallego et al., 2020). Já a histologia pode fornecer mais informações diagnósticas sobre o tecido do hospedeiro, permitindo entender se os parasitas estão associados às lesões. Para confirmação da presença do parasito nas amostras biológicas também pode ser realizada a imunohistoquímica. Com base nessas técnicas foi possível observar a invasão da *Leishmania* em diversos tecidos de gatos, como: pele, olhos, baço (Fernandez-Gallego et al., 2020), fígado, medula óssea, linfonodos (Silva et al., 2020), mucosa nasal, oral, nasofaringe (Leal et al., 2018) e aparato gastrointestinal (Tabar et al., 2022).

*Leishmania* spp. já foi isolada a partir de sangue total (Alves, 2021), fígado, baço, linfonodos e medula óssea (Silva et al., 2020) de gatos. O isolamento do parasito em cultura é um teste de maior precisão, que é capaz de fornecer diagnóstico conclusivo de uma infecção. Contudo, este teste não é recomendado para diagnóstico rápido e necessita de laboratórios especializados. É um teste indicado para identificação e caracterização do parasito (Costa-Val et al., 2020).

A reação em cadeia da polimerase (PCR), visando o DNA do minicírculo do cinetoplasto (kDNA) utilizando os primers 13A/13B, MC-1/MC-2 e LEISH-1/LEISH-2, assim como a região genômica do ribossomo (rDNA), mais especificamente o interno transcrito 1 (ITS-1) e a subunidade pequena (SSU rDNA) do parasito, têm sido muito utilizados em práticas diagnósticas rotineiras e estudos epidemiológicos sobre a infecção por *Leishmania* em gatos (Pereira; Maia, 2021; Fernandes et al., 2019).

O DNA de *Leishmania* já foi detectado pela PCR em diversas amostras felinas, como: sangue total (Silva et al., 2023), pele, fígado, baço, linfonodos, medula óssea (Silva et al., 2020), biópsias nasais e nasofaríngeas (Leal et al., 2018) e suabe conjuntival (Costa-Val et al., 2020; Alves-Martin et al., 2023).

Assim sugere-se que apenas exames clínicos e/ou sorológicos não são suficientes para concluir o diagnóstico, deve ser considerado também a combinação de diversos testes

diagnósticos juntamente com o contexto epidemiológico do animal para a conclusão do caso (Alves-Martin et al., 2023).

#### **2.4. Transmissão vertical e venérea da leishmaniose**

Em 1960 surgiu um relato de infecção venérea por *Leishmania* em humanos no Reino Unido, uma região não endêmica para leishmaniose (Symmers, 1960). A *Leishmania* é capaz de infectar o sistema reprodutor dos seres humanos, podendo causar úlceras na região peniana e ser detectada no sêmen (Mosayabi et al., 2019; Gazerani et al., 2022). Há diversos trabalhos que relatam a transmissão vertical em humanos. No estudo de caso realizado por Argy e seus colaboradores (2020), a transmissão vertical da leishmaniose, de uma mãe infectada para seu filho, foi detectada pela presença de DNA de *Leishmania* spp. no sangue do cordão umbilical e no sangue total do recém-nascido ao nascer. Outros casos já haviam sido relatados no Brasil, por meio da amplificação por PCR do kDNA do parasita em amostras de medula óssea de recém-nascidos, sugerindo que o parasito foi transmitido verticalmente (Mescouto-Borges et al., 2013). Mais recentemente foi relatado o primeiro caso de infecção vertical por *L. infantum* na Líbia (Elarabi et al., 2020).

Em humanos entende-se que os fetos infectados antes do final do período de seleção negativa de células T podem reconhecer os antígenos de *Leishmania* como antígenos próprios, fazendo com que as crianças infectadas se tornem células T tolerantes aos antígenos de *Leishmania*, assim mantendo a infecção. Contudo, se o sistema imunológico de uma criança foi infectado após o período de seleção negativa de células T, ele será competente para responder aos antígenos de *Leishmania* e talvez eliminar a infecção. A seleção negativa de células T ocorre na medula tímica humana entre 8 e 9 semanas de gestação, quando os progenitores de células T chegam ao timo, e antes de 15-16 semanas de gestação, enquanto linfócitos T maduros são detectados (Galindo-Sevilla et al., 2019).

Uma implicação para futuros estudos sobre a transmissão vertical é o modelo animal, as diferenças anatômicas placentárias levantam questões sobre a taxa de transmissão vertical em humanos infectados e a observada em estudos caninos, devido a permeabilidade tanto ao parasito quanto a anticorpos (Berger et al., 2017).

Em cães a transmissão venérea já foi relatada em estudos no Brasil. No estudo de Silva et al. (2009), doze cadelas anteriormente negativas para *Leishmania* foram alojadas na ausência do inseto vetor, copularam com múltiplos cães naturalmente infectados que estavam

excretando *Leishmania* no sêmen. Após isso, três cadelas soroconverteram e seis foram PCR positivas ao final do período experimental. O estudo de Boechat e colaboradores (2020), que avaliaram o sistema reprodutor de cães machos e fêmeas, sugeriu que a alta frequência e detecção de infecção ativa e similaridade de carga parasitária da *L. infantum* no trato genital de machos e fêmeas infectados demonstra o potencial de transmissão venérea deste parasita por ambos os sexos e de transmissão vertical na área estudada.

A transmissão vertical de *L. infantum* foi demonstrada previamente em beagles e camundongos experimentalmente infectados, e em cães naturalmente infectados de regiões endêmicas (Rosypal et al., 2005; Pangrazio et al., 2009; Da Silva et al., 2009). Também houve a detecção da transmissão vertical para o embrião de uma cadela grávida por métodos moleculares (Oliveira et al., 2017). Na América do Norte, o DNA do parasita *L. infantum* foi identificado pela PCR em tempo real em filhotes com oito dias de idade, nascidos de uma cadela dos EUA naturalmente infectada, sem histórico de viagens para áreas endêmicas (Boggiatto et al., 2011).

Na placenta de fetos abortados de cadela soropositiva para LV foi observado a placentite como lesão predominante, caracterizada por necrose e infiltração mista de leucócitos. Ao mesmo tempo, numerosas formas amastigotas de *Leishmania* spp. foram identificadas em trofoblasto placentário (Dubey et al., 2005).

O estudo de Silva et al. (2021) demonstrou a presença de amastigotas e DNA de *Leishmania* em tecidos testiculares e uterinos de cães machos e fêmeas respectivamente, sugerindo que esses órgãos podem abrigar o parasita sem a presença de lesões macroscópicas ou microscópicas.

Casos de transmissão vertical em cães parecem ser importantes para a manutenção da circulação do parasita na população (Boggiatto et al, 2011; Toepp et al, 2017). No estudo de Ozanne e seus colaboradores (2019), que fez uso de modelos matemáticos para melhor compreender a epidemiologia da transmissão vertical da Leishmaniose Canina (LCan), nos EUA, forneceram evidências de que os filhotes nascidos de mães com diagnóstico positivo durante a gestação têm maior probabilidade de se tornarem diagnósticos positivos tanto mais cedo na vida, quanto em algum momento durante a vida, do que aqueles nascidos de mães com diagnóstico negativo.

Toepp e seus colaboradores (2019), em seus estudos com populações caninas, também afirmam que os descendentes de mães com diagnóstico positivo para *L. infantum* tiveram 13,84 vezes mais chances de se tornarem positivos para *L. infantum* durante a vida. Isso indica

que a mãe infectada tem grande probabilidade de infectar os seus filhos se o tratamento não for iniciado para prevenir a transmissão (Toepp et al., 2019).

O estudo de Vida e seus colaboradores (2016), acompanhou a progressão imunológica da LCan causada por *L. infantum*, em três filhotes após o nascimento de uma cadela infectada. Apesar de viverem no mesmo local durante toda a vida e serem irmãos, esses filhotes demonstram três padrões diferentes de progressão da doença. Um cão evoluiu para doença oligossintomática, mantendo título positivo e apresentando PCR positivo intermitente. Outro cão assintomático apresentou títulos sorológicos positivos e demonstrou uma resposta imune CD4 + robusta à infecção. O terceiro cão teve uma resposta insignificante ao antígeno de *L. infantum* e era saudável. Este trabalho demonstra a variabilidade biológica associada à infecção transmitida verticalmente, semelhante à variedade de apresentações observadas durante a leishmaniose transmitida por vetores (Vida et al., 2016).

Estes estudos evidenciam a importância dos estudos sobre a presença do parasita no sistema reprodutor.

A transmissão venérea e vertical do parasita *Leishmania* spp. em cães é uma realidade confirmada pela literatura, entretanto, estudos desta natureza em gatos são incipientes. Em gatos infectados, a detecção do parasito nos sistemas reprodutor feminino e masculino, ainda não foram reportados na literatura.

### 3. Objetivo

Avaliar a presença de DNA de *Leishmania* spp. em amostras de órgãos do sistema reprodutor de gatos naturalmente infectados.

### 4. Referências Bibliográficas

AGUIAR, D. C. F.;NASCIMENTO, D. N. S.; PENNER, D. F.; CASTRO, B. S. L.; VIRGOLINO, R. R.; NEVES, A. M. P.; SIQUEIRA, A. S.; GONÇALVES, E. C. First molecular detection of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from an urban area in eastern Amazon. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 29, p. e20220048, 2023. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2022-0048>

ALVES-MARTIN, M. F.; BERTOZZO, T. V.; AIRES, I. N.; MANZINI, S.; PAIXÃO-MARQUES, M. S.; GUIRALDI, L. M.; dos SANTOS, W. J.; SÁNCHEZ, G. P.; CURCI, V. C. L. M.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; LUCHEIS, S. B. Detecção de *Leishmania* spp. em Gatos: Análise de Swabs Nasais, Orais e Conjuntivais por PCR e HRM. **Animals**, v. 13, n. 15, p. 2468–2468, 31 jul. 2023. <https://doi.org/10.3390/ani13152468>

ALVES, M. L. **Identificação e caracterização de tripanossomatídeos que infectam gatos domésticos (*Felis catus*) de área endêmica para leishmaniose visceral**. Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2021.

ALVES, M. L.; SILVA, D.T.; SPADA, J. C. P.; LEONEL, J. A. F.; BENASSI, J. C.; PEREIRA, N. W. B.; VIOTI, G.; ALVES-MARTIN, M. F.; PAULA, N. F. A.; STARKE-BUZETTI, W. A.; OLIVEIRA, T. M. F. S. Use of the intradermal leishmanin test (Montenegro skin test) for feline visceral leishmaniosis: Detection of cellular immunity. **Experimental Parasitology**, v. 239, p. 108294, 1 ago. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108294>

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S.; orgs. Animais de Laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora **FIOCRUZ**, 388 p. 2002. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/37618>

ARGY, N. LARIVEN, S.; RIDEAU, A.; LEMOINE, A.; BOURGEOIS, M. A., ALLAL, L.; YAZDANPANAH, Y. Congenital Leishmaniasis in a newborn infant whose mother was coinfecting with Leishmaniasis and HIV. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 9, n. 2, p. 277-280, 2020. <https://doi.org/10.1093/jpids/piz055>

BANETH, G.; NANHUM-BIALA, Y.; ADAMSKY, O.; GUNTHER, I. Leishmania tropica and Leishmania infantum infection in dogs and cats in central Israel. **Parasites & vectors**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2022. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05272-0>

BENCHIMOL, J. L.; GUALANDI, F. C.; BARRETO, D. C. S.; PINHEIRO, L. de A. Leishmanioses: sua configuração histórica no Brasil com ênfase na doença visceral nos anos 1930 a 1960. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 14, n. 2, p. 611–626, ago. 2019. <https://doi.org/10.1590/1981.81222019000200017>

BERGER, B. A.; BARTLETT, A. H.; SARAVIA, N. G.; GALINDO SEVILLA, N. Pathophysiology of Leishmania Infection during Pregnancy. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 12, p. 935–946, dez. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.08.012>

BOECHAT, V. C.; PEREIRA, S. A.; JÚNIOR, A. A. V. M.; DOS SANTOS, S. A.; MIRANDA, L. D. F. C.; FIGUEIREDO, F. B.; FERREIRA, L. C.; DE CARVALHO RODRIGUEZ, F. D. C.; DE OLIVEIRA, R. D. V. C.; DE FREITAS, R. T.; BRUNO, R. V. Frequency, active infection and load of Leishmania infantum and associated histological alterations in the genital tract of male and female dogs. **PLOS ONE**, v. 15, n. 9, p. e0238188–e0238188, 1 set. 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238188>

BOGGIATTO, P. M.; GIBSON-CORLEY, K. N.; METZ, K.; GALLUP, J. M.; HOSTETTER, J. M.; MULLIN, K.; PETERSEN, C. A.. Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in north america. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, 12 abr. 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001019>

BRASIL. Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV. Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinária do Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Guia de Bolso Leishmaniose Visceral**, Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinária – 1. ed., – Brasília - DF: CFMV, 2020 (a)

BRASIL, Secretaria de estado de saúde. **Boletim epidemiológico de leishmaniose visceral**. 2020 (b). Disponível: <https://www.vs.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/2021/05/Boletim-Epidemiologico-Anual-2020.pdf>.

BRASIL, Secretaria de estado de saúde. **Boletim epidemiológico de leishmaniose visceral**. 2022. Disponível: [https://www.vs.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/2023/02/Boletim\\_leish\\_visceral\\_023-Final.pdf](https://www.vs.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/2023/02/Boletim_leish_visceral_023-Final.pdf).

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral: Normas e Manuais Técnicos**. Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília. Ed. Ministério da Saúde, 120p. 2006.

BRIANT, E.; CELI, N.; NAPOLI, E.; ABBATE, J. M.; ARFUSO, F.; GAGLIO, G., ... & OTRANTO, D.. Treatment and long-term follow-up of a cat with leishmaniosis. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, 26 mar. 2019.. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3388-9>

BURZA, S.; CROFT, S. L; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 392, n. 10151, p. :951-970, 2018. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)

CARNEIRO, L.; SANTOS, T. V.; LIMA, L. V. R.; RAMOS, P. K. S.; CAMPOS, M. B.; SILVEIRA, F. T. First report on feline leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in Amazonian Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 19, p. 100360, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100360>

CASTRO, A.G. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar) – Normas técnicas. Brasília: **Fundação Nacional de Saúde**, p.88. 1996.

COSTA-VAL, A. P. COURA, F. M. ; BARBIERI, J. M.; DINIZ, L. SAMPAIO, A.; REIS, J. K. P.; BUENO, B. L. GONTIJO, C. M. F.. Serological study of feline leishmaniasis and molecular detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in cats (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, 2020. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020023>

DANTAS-TORRES, F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Revista de Saúde Pública**, (3): 537-541, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102006000300024>

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, n. 8, p. 1266–1269, 2005. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.1266>

FERNANDEZ-GALLEGO, A.; BERNABÉ, L. F.; DALMAU, A.; ESTEBAN-SALTIVERI, D.; FONTE, A.; LEIVA, M.; ORTUÑES-NAVARRO, A.; PEÑA, M. T.; TABAR, M. T.; REAL-SAMPIETRO, L.; SALÓ, F.; LLORET, A. BARDAGI, M. Feline leishmaniasis: diagnosis, treatment and outcome in 16 cats. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 22, n. 10, p. 993-1007, 2020. <https://doi.org/10.1177/1098612X20902865>

GALINDO-SEVILLA, N; MANCILLA-RAMÍREZ, J. T-cell tolerance as a potential effect of congenital leishmaniasis on offspring immunity. **Parasite Immunology**, v. 41, n. 3, p. e12540, 2019. <https://doi.org/10.1111/pim.12540>

GAZERANI, S.; HUNTINGTON, M. K.; SATVATI, J. Case report and literature review: Genital leishmaniasis. **IDCases**, v. 29, p. e01596–e01596, 1 jan. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2022.e01596>

HEADLEY, S. A.; PIMENTEL, L. A.; de AMORIM, I. F. G.; AMUDE, A. M.; VIANA, N. E.; MURARO, L. S., ... & DOS SANTOS, M. D. Immunohistochemical characterization of cutaneous leishmaniasis in cats from Central-west Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 17, p. 100290, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100290>

HOPKE, K.; MEYERS, A.; AUCKLAND, L.; HAMER, S.; FLORIN, D.; DIESEL, A., PATTERSON, A. *Leishmania mexicana* in a central Texas cat: clinical presentation, molecular identification, sandfly vector collection and novel management. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 7, n. 1, 2021. <https://doi.org/10.1177/2055116921999595>

KILLICK-KENDRICK, R. The life cycle of *Leishmania* in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite. **Canine Leishmaniasis: moving towards a solution**, Sevilla, p. 57-68, 2002.

KLEINERMAN, G.; MELLOUL, S.; CHAIM, L.; MERGY, S. E.; KAUFMAN, R. G.; DAGAN, N.; NACHUM-BIALA, Y.; KITAICHIKI, S.; GROSS S.; ASTMAM, N.; BANETH, G. Detection of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* in cats during an outbreak of cutaneous leishmaniasis in Southern Israel. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, p. 102006, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.102006>

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W. KILLICK-KENDRICK, R. The Leishmaniasis in biology and medicine. New York: **Academic Press**, v. 1, p. 291-363, 1987.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.&SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes-- Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology** [S.I.], v. 11, n. 5, p. 210-4, May 2003. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00075-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00075-1)

LEAL, R. O.; PEREIRA, H.; CARTAXEIRO, C.; DELGADO, E.; PELETEIRO, M. D. C., FONCECA, I. P. Granulomatous rhinitis secondary to feline leishmaniasis: report of an unusual presentation and therapeutic complications. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 4, n. 2, p. 2055116918811374, 2018. <https://doi.org/10.1177/2055116918811374>

LEONEL, J.A.F.; VIOTI, G., ALVES, M.L.; BENASSI, J.C.; SILVA, D.T.D.; SPADA, J.C.P.; RUIZ, V.L.A.; STARKE-BUZETTI, W.A.; SOARES, R.M.; OLIVEIRA, T.M.F.S. Leishmaniasis in cat shelters: A serological, molecular and entomological study. **Transboundary and Emerging Diseases**, ahead of print, 2020. <https://doi.org/10.1111/tbed.13544>

LEWIS, D. J. The biology of Phlebotomidae in relation to leishmaniasis. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 19, p. 363-384, 1974. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.19.010174.002051>

MAIA, C.; CAMPINO, L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of Zoonotic leishmaniasis? **Trends in Parasitology**, v. 27. p. 341-344, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.03.008>

MAROLI, M.; PENNISI, M. G.; DI MUCCIO, T.; KHOURY, C.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 145, n. 3-4, p. 357-360, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.11.009>

MENDONÇA, I. L.; BATISTA, J. F.; LOPES, K. S. P. D. P.; MAGALHÃES NETO, F. D. C. R.; ALCÂNTARA, D. S.; MERIGUETI, Y. F. F. B.; COSTA, C. H. N. Infection of *Lutzomyia longipalpis* in cats infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, p. 109058, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109058>

MESCOUTO-BORGES, M. R. M.; MAUÉS, É.; COSTA, D. L.; DA SILVA PRANCHEVICIUS, M. C.; ROMERO, G. A. Congenitally transmitted visceral leishmaniasis: report of two Brazilian human cases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 263-266, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.10.017>

MIGONE MIERES, L. E. Un cas de kala-azar a Assunción (Paraguay). **Bulletin de la Societé de Pathologie Exotique**, v. 6, n. 2, p. 118-120, 1913.

MOSAYABI, M.; MOHEBALI, M.; FARAZI, A. SHIRZADI, M. R.; AKHLAGHI, D.; HAJHOSSEIN, R.; ELIKAE, S. Leishmaniasis Caused by *Leishmania major* on the Glans Penis: A Case Report. **Iranian Journal of Parasitology**, 23 set. 2019.. <https://doi.org/10.18502/ijpa.v14i3.1488>

OLIVEIRA, R. S.; MACIEL, J. N. Aspectos socioeconômicos da leishmaniose visceral em João Pessoa Paraíba – Brasil. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, João Pessoa, v. 7, n. 1, p. 63-70, 2003.

OLIVEIRA, V. V. G. et al. Molecular evidence of early vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a dog. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 1, e20160553, 2017.

Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmanioses: **informe epidemiológico das américas**. OPAS; 2022. Disponível em: [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56832/OPASCDEV220021\\_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56832/OPASCDEV220021_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Organización Panamericana de la Salud. **Manual de procedimientos para la vigilancia y el control de las leishmaniasis en la Región de las Américas**. Washington, D.C: OPS; 2023. Disponible en: <https://doi.org/10.37774/9789275327340>.

OWENS, S. D.; OAKLEY, D. A.; MARRYOTTI, K.; HATCHATT, W.; WALTON, R.; NOLAN, T. J.; NEWTON, A.; STEURER, F.; SCHANTZ, P.; GINGER, U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 8, p. 1076-1083, 2001.

OZANNE, M. V.; BROWN, G. D.; TOEPP, A. J.; SCORZA, B. M.; OLESON, J. J.; WILSON, M. E.; PETERSEN, C. A. Bayesian compartmental models and associated reproductive numbers for an infection with multiple transmission modes. **Biometrics**. Sep;76(3):711-721, 2019. <https://doi.org/10.1111/biom.13192>

PAŞA, S.; TETIK VARDARLI, A.; EROL, N.; KARAKUS, M.; TÖS S.; ATASOY, A.; BALCROGLU, İ. C.; EMEK TUNA, G.; EERMIS, Ö. V.; ERTABLAKAR, H.; ÖZBEL, Y. Detection of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* in domestic cats in the Ege Region of Turkey. **Veterinary Parasitology**, v. 212, n. 3-4, p. 389-392, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.07.042>

PANGRAZIO, K.K.; COSTA, E. A.; AMARILLA, S. P.; CINO, A. G.; SILVA, T. M.; PAIXÃO, T. A.; COSTA, L. F.; DENGUES, E. G.; DIAZ, A. A.; SANTOS, R. L. A Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. **Veterinary Parasitology**, v.165, n. 3-4, p. 327-331, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.013>

PENNISI, M. G. A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. In: KillickKendrick, R. (Ed.), Canine leishmaniasis: moving towards a solution. **Intervet International**, Boxmeer. p.39-48, 2002.

PENNISI, M.G.; CARDOSO, L.; BANETH, G.; BOURDEAU, P.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; OLIVA, G.; SOLANO-GALLEGO, L. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasites & vectors**, v. 8, p. 1-18, 2015.

PEARSON, R.D.; STEIGBIGEL, R.T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Immunology**, v. 127, n. 4, p. 1438–1443, 1 out. 1981. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.127.4.1438>

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. **O Brazil-Medico**, Rio de janeiro, v. 46, p. 949-952, nov. 1934.

PEREIRA, A.; CRISTÓVÃO, J. M.; VILHENA, H.; CACHOLA, P.; HENRIQUES, J.; COIMBRA, M.; CATARINO, A.; LESTINOVA, T.; SPITZOVA, T.; VOLF, P.; CAMPINO, L.; MAIA, C. Antibody response to *Phlebotomus perniciosus* saliva in cats naturally exposed to phlebotomine sand flies is positively associated with *Leishmania* infection. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3376-0>

PEREIRA, A; MAIA, C. *Leishmania* infection in cats and feline leishmaniosis: An updated review with a proposal of a diagnosis algorithm and prevention guidelines. **Current research in parasitology & vector-borne diseases**, v. 1, p. 100035, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2021.100035>

PERSICHETTI, M.F.; SOLANO-GALLEGO, L.; VULLO, A.; MASUCCI, M.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; VITALE, F.; PENNISI, M.G. Diagnostic performance of ELISA, IFAT and Western blot for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in cats using a Bayesian analysis without a gold standard. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p.e119, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2046-3>

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora **Fiocruz**, 367 p. 2003.

RATZLAFF, F. R.; OSMAR, V.; SILVA, D. VASCONCELLOS, J. S. P.; POTTER, L. FERNANDES, F. D.; FILHO, J. A. M.; BOTTON, A. A.; VOGEL, F. S. F.; SANGIONI, L. A. Identificação da infecção por *Leishmania* spp. em animais silvestres e domésticos no Brasil: uma revisão sistemática com metanálise (2001-2021). **Pesquisa em Parasitologia**, p. 1-75. 2023. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07862-y>

ROSS, R. (1) note on the bodies recently described by *Leishmania donovani* and (2) Further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal**, v.2 p.1261-1401, 1903. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.2237.1261>

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 an experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 970–972, 1 ago. 2005. <https://doi.org/10.1645/GE-483R.1>

SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve uma visão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.2, n.11, p.24-28, 1997.

SANTOS, G. P. L. **Estudo da população canina e da fauna flebotomínica em áreas de leishmaniose tegumentar no município de Paracambi, estado do Rio de Janeiro, uma abordagem epidemiológica**. M.Sc. Dissertation, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, 199 p, 1998.

SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L.; Veneral transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 55-59, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.079>

SILVA, D. T; ALVES, M. L; SPADA, J. C. P; LEONEL, J. A. F; BENASSI, J. C; STARKEBUZETTI, W. A; FERREIRA, H. L; KEID, L. B; SOARES, R. M; OLIVEIRA, T. M. F. S. *Leishmania infantum* in the reproductive organs of dogs. **Ciência Rural**. Universidade Federal de Santa Maria, v. 51, n. 10, p. -, 2021. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200825>

SILVA, R. A.; SANTOS, F. K .M.; SOUSA, L. C.; RANGEL, E. F. BEVILAQUA, C. M. L. Ecologia de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia migonei* em área endêmica para leishmaniose visceral. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 320-327, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014068>

SILVA, S. M.; RABELO, P. F.; GONTIJO, N. F.; RIBEIRO, R. R.; MELO, M. N.; RIBEIRO, V. M.; MICHALIK M. S. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 1–2, p. 150–154, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.005>

SILVA, R. B. S.; PORTELA, R. D. A.; ARRUDA, L. F. B.; FERREIRA, J. D. S.; SOUTO, E. P. F., ARAÚJO, A. L. D.; ... & MELO, M. A. D. Natural Infection by *Leishmania infantum* in domestic cats (*Felis catus*) in a municipality of moderate transmission in the Brazilian semi-arid region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, 2020. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020102>

SYMMERS, W. S. T. C. "St. C. Leishmaniasis acquired by Contagion. A Case of Marital Infection in Britain." **The Lancet**, v. 275, n. 7116, p. 127–132, 1 jan. 1960. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(60\)90052-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(60)90052-0)

TABAR, M. D.; NARANJO, C.; DEHESA, A.; RODRIGUEZ, M. C. Leishmaniosis in a cat with chronic diarrhea as the only clinical manifestation. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 36, n. 2, p. 753-757, 2022. <https://doi.org/10.1111/jvim.16347>

TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. Parasitologia veterinária. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2017.

TOEPP, A.; BENNETT, C.; SCOTT, B.; SENESAC, R.; OLESON, J. J.; PETERSEN, C. A. Maternal *Leishmania infantum* infection status has significant impact on leishmaniasis in offspring. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 2, p. e0007058, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007058>

TOEPP, A. J.; SCHAUT, R. G.; SCOTT, B.D.; MATHUR, D.; BERENS, A. J.; PETERSEN, C. A. *Leishmania* incidence and prevalence in U.S. hunting hounds maintained via vertical transmission. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 10, p. 75–81, 1 dez. 2017.. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.08.011>

VIANNA, E. N.; MORAIS, M. H. F.; ALMEIDA, A. S.; SABROZA, P. C.; REIS, I. A.; DIAS, E. S.; CARNEIRO, M. Abundância de *Lutzomyia longipalpis* em domicílios urbanos como fator de risco para transmissão da leishmaniose visceral. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 111, p. 302-310, 2016.

VIDA, B.; TOEPP, A.; SCHAUT, R. G.; ESCH, K. J. JUELGAARD, R., SHIMAKI, R. M.; PETERSEN, C. A. Immunologic progression of canine leishmaniasis following vertical transmission in United States dogs. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 169, p. 34-38, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.11.008>

VIOTI, G.; da SILVA, M. D.; GALVIN-OVALLOS, F.; ALVES, M. L.; SILVA, D. T.; LEONEL, J. A. F.; PEREIRA, N. W. B.; BENASSI, J. C.; SPADA, J. C. P.; MAIA, C.; GALATI, E. A. B.; STARKE-BUZETTI, W. A, OLIVEIRA, T. M. F. S. Xenodiagnosis in four domestic cats naturally infected by *Leishmania infantum*. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 69, n. 4, p. 2182–2190, 19 jul. 2021. <https://doi.org/10.1111/tbed.14216>

World Health Organization (WHO). **Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a rationale for continued investment in tackling neglected tropical diseases 2021–2030**. World Health Organization’s Department of Control of Neglected Tropical Diseases (WHO/NTD), 2021.

## 5. Artigo

### **Análise molecular de órgãos reprodutivos de gatos naturalmente infectados por *Leishmania* spp.**

Nathalia Frigo de Almeida Paula, Diogo Tiago da Silva, João Augusto Franco Leonel, Maria Fernanda Alves Martin, Julia Cristina Benassi, Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira.

#### **Resumo**

*Leishmania* é um protozoário parasito causador de importantes doenças zoonóticas, conhecidas como leishmanioses. A principal forma de transmissão desse parasito é por meio da picada das fêmeas de insetos flebotomíneos infectados. Contudo, outras formas de transmissão têm sido estudadas, como a infecção vertical e venérea, relatadas anteriormente em seres humanos e cães. Sabendo-se que os gatos também são reservatórios do parasito, capazes de transmitir *Leishmania* ao vetor e participando na manutenção de seu ciclo e que a infecção por *Leishmania* spp. já foi relatada em diversos tecidos desses animais, se faz relevante a investigação da possibilidade da transmissão vertical e venérea nessas espécies. O presente estudo verificou a presença de DNA do parasito *Leishmania* no sistema reprodutor de gatos advindos de uma região endêmica para leishmaniose visceral. Um total de 302 gatos tiveram o suabe conjuntival coletado e a presença de DNA de *Leishmania* avaliada nessas amostras. Desses 302, 40 eram de um estudo anterior e passaram por exames sorológicos, PCR de suabe conjuntival e sangue. O sistema reprodutor de 41 gatos machos e fêmeas foi avaliado e o DNA de *Leishmania* spp. foi detectado em três deles, sendo os órgãos positivos o testículo, epidídimo, ovário e útero. O sequenciamento genético de duas amostras confirmou que em dois casos a espécie infectante era *Leishmania infantum*. Essa descoberta reforça a preocupação com infecções verticais e venéreas por esse parasito, nessa espécie de hospedeiro.

**Palavras-chave:** Leishmaniose, felinos, órgãos reprodutivos, diagnóstico molecular

## Abstract

*Leishmania* is a protozoan parasite that causes important zoonotic diseases known as leishmaniasis. The main route of transmission of this parasite is the bite of infected phlebotomine insects. However, other transmission routes have been studied, such as vertical and venereal infection, previously reported in humans and dogs. Knowing that cats are also reservoirs of the parasite, capable of transmitting *Leishmania* to the vector and participating in the maintenance of its cycle, and that *Leishmania* spp. infection has already been reported in various cat tissues, it is important to investigate the possibility of vertical and venereal transmission in this species. This study verified the presence of *Leishmania* DNA in the reproductive system of cats from a visceral leishmaniasis endemic area. To this end, a total of 302 cats had their conjunctival swabs collected and the presence of *Leishmania* DNA assessed in these samples. Of these 302, 40 were from a previous study and were subjected to serological tests, PCR of conjunctival swabs and blood. The reproductive system of 41 male and female cats was evaluated and *Leishmania* spp. DNA was detected in three of them. The testicle, epididymis, ovary and uterus were positive. Genetic sequencing of two samples confirmed that, in two cases, the infecting species was *Leishmania infantum*. This finding reinforces the concern about vertical and venereal infections in cats.

Keywords: Leishmaniasis, feline, reproductive organs

## 1. Introdução

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania* (Ross, 1903). O primeiro caso de leishmaniose relatado no Brasil, mais especificamente um caso de Leishmaniose Tegumentar, foi em 1913, no estado do Mato Grosso. Alguns anos depois, em 1934, a Leishmaniose Visceral (LV) apareceu como um problema de saúde pública no país. Dessa forma, o estudo da epidemiologia da doença passou a ser de grande importância (Migone, 1913; Penna, 1934; Benchimol, et al. 2019).

A principal forma de transmissão das leishmanioses é por meio da picada da fêmea de flebotomíneo infectada, que são insetos hematófagos. Dentre os flebotomíneos, o principal vetor da Leishmaniose Visceral (LV) no Brasil é *Lutzomyia longipalpis* (Lewis, 1974; Rangel & Lainson, 2003). Os flebotomíneos se infectam ao se alimentar do sangue de um vertebrado infectado. As formas promastigotas da *Leishmania* se desenvolvem dentro do flebotomíneo e por meio do repasto sanguíneo são transmitidas ao hospedeiro vertebrado. No vertebrado, a *Leishmania* é fagocitada por macrófagos, assim sendo transportada pelo corpo do animal, se

alojando nos tecidos em sua forma amastigota (Pearson; Steigbigel, 1981; Laskay et al., 2003; Oliveira, 2003).

A transmissão venérea em humanos inicialmente foi relatada em 1960 no Reino Unido, uma região não endêmica para leishmaniose (Symmers, 1960). Ao passar dos anos, mais relatos de casos surgiram sobre a infecção por *Leishmania* no sistema reprodutor de humanos, crescendo a preocupação com a possibilidade da transmissão venérea (Mosayabi et al., 2019; Gazerani et al., 2022).

Também em humanos já foram relatadas transmissões verticais, por meio da detecção do DNA de *Leishmania* spp. no cordão umbilical e medula óssea de recém-nascidos de mães infectadas (Mescouto-Borges et al., 2013; Argy et al., 2020; Elarabi et al., 2020) e o estudo de Galindo-Sevilla e colaboradores (2019) mostrou que fetos infectados antes do final do período de seleção negativa de células T podem reconhecer os antígenos de *Leishmania* como antígenos próprios, fazendo com que as crianças infectadas se tornem células T tolerantes aos antígenos de *Leishmania*. Por outro lado, o sistema imunológico de uma criança que foi infectada após o período de seleção negativa de células T será competente para responder aos antígenos de *Leishmania* e talvez eliminar a infecção.

Na literatura há diversos relatos sobre a visceralização da *Leishmania* no sistema reprodutor, placenta e filhotes de cães, assim como lesões genitais e excreção de *Leishmania* no sêmen de cães. (Dubey et al, 2005; Masucci et al., 2003; Rosypal, et al., 2005; Diniz et al., 2005; Silva et al., 2009).

Nos Estados Unidos da América, como há incidência de casos da LV, mesmo na ausência dos vetores outras formas de transmissão do parasito são bastante estudadas, como a transmissão vertical e venérea (Boggiatto et al., 2011; Toepp et al., 2017).

Ozanne e seus colaboradores (2019) forneceram evidências de que os filhotes nascidos de mães com diagnóstico positivo para Leishmaniose Canina (LCan), durante a gestação, têm maior probabilidade de se tornarem positivos mais jovens ou em algum momento durante a vida, do que aqueles nascidos de mães negativas (Ozanne et al., 2019).

Segundo Toepp e seus colaboradores (2019), cadelas infectadas possuem grande probabilidade de infectar os seus filhotes se o tratamento não for iniciado para prevenir a transmissão. Um estudo sobre a progressão imunológica da LCan após uma transmissão vertical aponta que a variabilidade biológica associada à infecção transmitida verticalmente é semelhante à variedade de apresentações observadas durante a doença quando transmitida por vetores, dessa forma, a prole da cadela infectada, pode ter diferentes respostas ao parasito (Vida et al., 2016)

Sabendo-se que os gatos também são reservatórios do parasita, capazes de transmitir a *Leishmania* ao vetor e participando na manutenção de seu ciclo (MAROLI et al., 2007, SILVA et al., 2010, MENDONÇA et al., 2020; VIOTI et al., 2021), que a infecção por *Leishmania* spp., já foi relatada em diversos tecidos de gatos, como no sangue, baço, pele, linfonodos, medula óssea e suabe da conjuntiva ocular (ALVES-MARTIN, 2017; GURGEL et al., 2023; ALVES-MARTIN et al., 2023), e considerando a proximidade deste com os humanos, se faz relevante a investigação de outras formas de transmissão entre populações destes felinos. Assim, o presente trabalho estudou a possibilidade do protozoário parasita *Leishmania* infectar o sistema reprodutor de gatos naturalmente infectados em uma região endêmica para LV.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Área de estudo**

Para este estudo foram selecionados gatos do município de Ilha Solteira, São Paulo, Brasil (51° 06' 35" O; e 20° 38' 44" S), área endêmica para LCan.

### **2.2. Seleção dos animais**

Os gatos que participaram do presente estudo são advindos de castrações que ocorreram no município de Ilha Solteira. Ao todo foram recebidas amostras de 302 gatos, dentre estas, 262 são advindas de castrações vinculadas ao mutirão de castração organizado pela prefeitura do município em 2022. Os outros 40 gatos são advindos de castrações vinculadas a pesquisas anteriormente realizadas no local (Silva et al., 2023). Sendo assim, os gatos do presente estudo são de proprietários das áreas rurais e urbanas, de abrigos de animais ou animais errantes.

### **2.3. Amostras**

Das castrações vinculadas à prefeitura de Ilha Solteira, foram doadas amostras de 262 gatos, fêmeas e machos, compostas por tecidos inteiriços de: testículo, epidídimo, ovário, útero e suabe da conjuntiva ocular.

Das castrações vinculadas a pesquisas anteriores, que ocorreram no município de Ilha Solteira, foram doadas amostras de 40 gatos, fêmeas e machos, compostas por tecidos

inteiriços de: testículo, epidídimo, ovário e útero, com diagnóstico prévio da presença de anticorpos anti-*Leishmania* por Ensaio Imuno Enzimático (ELISA) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) segundo metodologias descritas por Oliveira et al., (2008) e Vidas et al., (2011) respectivamente e/ou DNA em amostras de sangue e suabe conjuntival pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) segundo Rodgers et al. (1990).

Todas as amostras foram refrigeradas e encaminhadas ao Laboratório de Medicina Preventiva Aplicada - LMVPA, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA/USP, onde foram realizados os exames moleculares. O presente estudo foi protocolado sob o CEUA nº 5132160522.

Amostras positivas na PCR de suabe conjuntival, dos 262 gatos das castrações da prefeitura, assim como todas as 40 amostras vinculadas a pesquisas anteriores, tiveram os sistemas reprodutores testados, conforme descrito abaixo.

## 2.4. Ensaios moleculares

O DNA das amostras do tecido reprodutor e suabe conjuntival foi extraído utilizando o kit comercial MagMAX™ CORE Nucleic Acid Extraction no aparelho KingFisher™ Flex Purification System.

Para verificar a integridade das amostras de DNA extraídas, foi realizada uma PCR utilizando primers específicos para amplificação do gene constitutivo, GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) segundo Birkenheuer et al., (2003), GAPDHF (5' AGGCTGAGAACGGGAAACTT 3') e GAPDHR (5' ATTAAGTTGGGGCAGGGACT3').

Para a verificação da presença do DNA do parasito nas amostras dos gatos analisados, foi realizada a PCR para a detecção de um segmento conservado do minicírculo do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* spp., com os oligonucleotídeos 13A (5' GTGGGGGAGGGCGTTCT 3') e 13B (5' ATTTTACACCAACCCAGTT 3') , segundo Rodgers et al., (1990).

Os tecidos dos órgãos reprodutores positivos para a PCR 13A/13B, foram submetidos a PCR da região ITS1 do rDNA de acordo El Tai et al. (2000), onde os primers utilizados foram: LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5'TGATACTTATCGCACTT-3') que se anelam nas sequências conservadas SSU e 5.8S. O produto gerado foi de 300 a 350 pb, dependendo da espécie envolvida, os quais foram visualizados em gel de agarose a 2%.

As amostras positivas para o PCR ITS-1 foram submetidas ao sequenciamento de Sanger, realizado pela empresa BPI Biotecnologia, Botucatu/SP. Os cromatogramas gerados foram avaliados através dos programas Chromas 2.6.6 (TECHNELYSIUM PTY LTD.) e PHPH – Electropherogram quality analysis (TOGAWA; BRIGIDO, 2003) para acessar a qualidade das sequências obtidas. O programa BioEdit Sequence Alignment Editor® (HALL, 1999) foi utilizado para alinhamento das sequências obtidas por cada primer e gerar as sequências contíguas (contig) que foram comparadas com sequências depositadas no GenBank® (CLARK et al., 2016) através da ferramenta Basic Local Alignment Search Tool – BLAST® (ALTSCHUL et al., 1990).

As amostras que foram positivas para o PCR 13A/13B, mas negativas para o PCR ITS-1, foram submetidas ao Nested-PCR da pequena subunidade do RNA ribossomal de tripanossomatídeos (TRY/SSU), utilizando os primers TRY927F (5'-CAGAAACGAAACACGGGAG-3') e TRY927R (5'-CCTACTGGGCAGCTTGGGA-3'), na primeira reação, e na segunda reação SSU561F (5'-TGGGATAACAAAGGAGCA-3') e SSU561R (5'-CTGAGACTGTAACTCAAAGC-3'). Esse protocolo foi baseado em Noyes et al. (1999), com modificações.

### **3. Resultados**

#### **3.1. PCR das amostras dos suabes conjuntivais e amostras doadas de pesquisas anteriores**

Dos 262 suabes da conjuntiva ocular de gatos coletados em 2022 e testados para o primer 13A/13B na PCR, 0,38% (1/262) foi positivo. Dos 40 gatos de estudos anteriores, 2,5% (1/40) eram positivos no suabe, 2,5% (1/40) no sangue, 37,5% (15/40) na sorologia RIFI e 15% (6/40) no ELISA.

Pela PCR de suabe, a frequência de positivos no estudo foi de 0,66% (2/302) gatos positivos para o kDNA de *Leishmania* spp.

#### **3.2. PCR das amostras dos tecidos do sistema reprodutor**

Dos 302 gatos, 41 gatos tiveram seu sistema reprodutor testado para a presença de DNA de *Leishmania*, sendo 82,92% (34/41) machos e 17,07% (7/41) fêmeas. Destes, 7,31% (3/41) foram positivos, sendo 2,43% (1/41) fêmeas e 4,87% (2/41) machos.

Dos gatos positivos no sistema reprodutor, um dos machos (A) foi positivo para os testes diagnósticos ELISA, RIFI, PCR de sangue e suabe, PCR 13A/13B do sistema reprodutor, PCR ITS-1 do sistema reprodutor, não foi realizado o PCR com o primer TRY/SSU para o sistema reprodutor e foi realizado o sequenciamento. A fêmea (B) foi positiva para o ELISA e para as PCR 13A/13B e ITS-1 do sistema reprodutor. Não foi realizada a PCR com o primer TRY/SSU nessa amostra e foi realizado o sequenciamento. O segundo gato macho (C) não foi testado para testes sorológicos, foi positivo para a PCR 13A/13B de suabe conjuntival, PCR 13A/13B do sistema reprodutor e negativo para a PCR ITS-1 e TRY/SSU, não sendo feito o sequenciamento (Tabela 1). Ressalta-se que os gatos positivos no sistema reprodutor foram positivos para todos os órgãos analisados: testículo e epidídimo, ou ovário e útero.

**Tabela 1.** Resultados dos testes sorológicos, moleculares e sequenciamento genético das amostras de gatos com DNA de *Leishmania* spp. nos órgãos do sistema reprodutor.

			Testes diagnósticos							
			Exames Sorológicos		Exames moleculares					
Gatos	Sexo	Sistema Reprodutor	ELISA	RIFI	PCR 13A/13B sangue	PCR 13A/13B suabe	PCR 13A/13B sistema reprodutor	PCR ITS-1 sistema reprodutor	PCR TRY/SSU sistema reprodutor	Sequenciamento de Sanger
A	M	Testículo e Epidídimo	P	P	P	P	P	P	*	<i>L.infantum</i>
B	F	Ovário e Útero	P	N	N	N	P	P	*	<i>L.infantum</i>
C	M	Testículo e Epidídimo	*	*	*	P	P	N	N	*

Legenda: Os gatos que foram positivos para PCR 13A/13B do sistema reprodutor (testículo, epidídimo, ovário e útero) foram representados pelas letras A, B e C. Positivo para o teste diagnóstico (P), negativo para o teste diagnóstico (N), não foi realizado este teste diagnóstico (\*). O sexo do animal está representado pelas letras M, macho, e pela letra F, fêmea.

A análise do sequenciamento dos gatos positivos pelo ITS1 revelou a espécie do parasito e seu código de identificação no GenBank. No epidídimo ocorreu uma identidade de 88,97% com *L. infantum* (MN422060.1), e no testículo 93,03% (MN422063.1). No Gato B a identidade com *L. infantum* no ovário foi de 91,43% (MN422063.1) e no útero foi de 92,21% (OR073760.1). O Gato C, apesar de ter sido positivo para a PCR 13A/13B, não foi positivo

para a PCR ITS-1 e nem para o TRY/SSU, assim, impossibilitando esta amostra de ser sequenciada.

#### 4. Discussão

Dos 41 gatos analisados, 3 foram positivos para o DNA de *Leishmania* no seu sistema reprodutor (testículo, epidídimo, ovário e útero). A problemática desse fato se dá pela possibilidade de o parasito ultrapassar a barreira placentária e infectar os filhotes, se tornando assim uma infecção vertical, ou até mesmo a possibilidade do parasita ser transmitido durante o acasalamento desses animais, numa infecção venérea. Esses fenômenos já foram relatados em cães (Boggiatto et al., 2011; Vida et al., 2016; Ozanne et al., 2019; Toepp et al., 2019) e humanos (Mescouto-Borges et al., 2013; Galindo-Sevilla et al., 2019; Argy et al., 2020; Elarabi et al., 2020).

A interação entre gatos e seres humanos estabelece uma relação entre a saúde humana, a saúde dos animais e o meio ambiente. Quando esse equilíbrio é mantido, surgem vantagens psicológicas, fisiológicas e sociais. No entanto, a ausência de controle reprodutivo e cuidados veterinários pode resultar em uma superpopulação em locais específicos, levando a conflitos potenciais entre humanos e animais, como agressões, poluição ambiental e disseminação de doenças, especialmente as zoonoses (Macente et al., 2016).

Com isso, seria de grande importância o fomento às pesquisas veterinárias e epidemiológicas, salientando a necessidade da coleta de dados e amostras biológicas para o desenvolvimento destas, a fim de adquirir maior conhecimento sobre as formas de transmissão, manutenção de doenças e controle de sua disseminação.

Chama atenção o fato de que pelo suabe conjuntival, apenas 2 gatos foram positivos para PCR com o primer 13A/13B de suabe conjuntival.

O suabe conjuntival demonstra ser uma boa técnica diagnóstica em cães, além de menos invasiva é mais sensível que o sangue (Solano-Gallego et al., 2011), principalmente para complementar outras técnicas, pois a conjuntiva ocular apresenta, em sua camada superficial, folículos linfóides que drenam para os linfonodos submaxilares e paratireoideos. Dessa forma, diversos estudos foram realizados utilizando essa técnica em cães, como os trabalhos de Strauss-Ayali et al. (2004), Ferreira et al. (2008), Pilatti et al. (2009), Barbosa et al. (2012), Almeida Ferreira et al. (2012), Lombardo et al. (2012), Pereira et al. (2016), Oliveira (2020),

que demonstraram o suabe conjuntival como uma excelente alternativa no diagnóstico da LCan.

Há também estudos que confirmam o potencial da utilização do suabe conjuntival em estudos com gatos, como o de Oliveira et al. (2015), que encontrou uma frequência de 13,5% (7/52), Benassi et al. (2017) com uma frequência de 1,85% (2/108), Rocha et al. (2019) com uma frequência de 5,71% (6/105) e Alves-Martin et al., (2023) com uma frequência de 11,1% (4/36). Dessa forma, pode-se observar que o presente trabalho encontrou uma frequência de 0,66 (2/302) gatos positivos.

O suabe conjuntival é uma técnica de execução fácil e rápida, não-invasivo, de custo-benefício acessível quando comparado às técnicas diagnósticas disponíveis (Leite et al 2010; Barbosa et al, 2012), aspectos importantes para a utilização na rotina clínica veterinária, pois diminui a aversão dos proprietários pelos testes regulares dos seus animais (Barbosa et al., 2012).

Na região do presente estudo, Ilha Solteira-SP, já foram realizados alguns trabalhos que detectaram a presença da *Leishmania* em gatos. Alves-Martin et al. (2017), que foi o primeiro relato de infecção por *Leishmania* em gatos domésticos dessa área endêmica para LV, com vários casos relatados da doença em cães e animais silvestres (Tenório et al, 2011; Silva et al, 2014). Alves et al., (2022) relataram 74% (74/100) gatos positivos para *Leishmania* spp. pela RIFI, 34% (34/100) pelo ELISA, 5% (5/100) para o DNA de *L. infantum* e 60% (60/100) foram positivos para o Teste Cutâneo de Montenegro. No trabalho de Silva et al., (2023) 15,06% (25/166) gatos foram positivos no teste ELISA, 53,61% (89/166) pela RIFI e 3,61% (6/166) pela PCR, sendo que a espécie detectada foi a *L. infantum*.

O trabalho de Vioti et al., (2022), que foi realizado na mesma área de estudo, foi capaz de detectar 61,91% (151/240) gatos positivos em testes sorológicos para *Leishmania* spp. e 2,5% (6/240) gatos positivos para testes moleculares, detectando *L. infantum*. O trabalho de Vioti et al (2022) também demonstrou por meio de xenodiagnóstico que nem todos os gatos infectados eram capazes de infectar as fêmeas de flebotomíneos. Esses trabalhos reforçam que os gatos participam do ciclo da leishmaniose na área estudada, Ilha Solteira, entretanto possuem um papel secundário aos cães.

No presente estudo, o Gato B foi positivo para o teste sorológico ELISA, positivo também para a PCR 13A/13B do sistema reprodutor, porém, negativo para a PCR 13A/13B do suabe conjuntival. Esse resultado reforça a necessidade por mais estudos sobre a eficácia da utilização do suabe conjuntival como teste diagnóstico de leishmaniose em gatos, e a necessidade da utilização da união de várias técnicas para fechar o diagnóstico dos felinos

com mais clareza, como testes sorológicos, moleculares e parasitológicos (Pereira; Maia, 2021).

O Gato C, apesar de ter sido positivo para a PCR 13A/13B, não foi positivo para a PCR ITS-1 e nem para o TRY/SSU. Isso pode ter se dado por conta da sensibilidade do primer 13A/13B. Assim como mostrou o trabalho de Fernandes e seus colaboradores (2019), onde obteve número de cães positivos para PCR 13A/13B maior do que para PCR ITS-1. O *locus* gênico dos primers 13A/13B está presente em milhares de cópias no cinetoplasto do parasita. Isso torna o kDNA o alvo mais sensível para fazer o diagnóstico molecular do parasita. Esta técnica é útil para detectar os estágios iniciais da LCan.

## 5. Conclusão

O DNA de *Leishmania infantum* foi detectado no sistema reprodutor de gatos machos e fêmeas (testículo, epidídimo, ovário e útero). A presença do DNA de *Leishmania* spp. indica que provavelmente o parasite está presente nesses órgãos. São necessários mais estudos que comprovem se há transmissão vertical e/ou venérea em populações de gatos.

## Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Processo: 161578/2021-7.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo: 2019/24368-3.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), financiamento código 001.

## Referências

ALMEIDA FERREIRA, S. LEITA, R. S.; ITUASSU, L. T.; ALMEIDA, G. G.; SOUZA, D. M.; FUJIWARA, R. T. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, p. e1596, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001596>

ALVES-MARTIN, M. F.; BERTOZZO, T. V.; AIRES, I. N.; MANZINI, S.; PAIXÃO-MARQUES, M. S.; GUIRALDI, L. M.; dos SANTOS, W. J.; SÁNCHEZ, G. P.; CURCI, V. C. L. M.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; LUCHEIS, S. B. Detecção de *Leishmania* spp. em Gatos: Análise de Swabs Nasais, Oraís e Conjuntivais por PCR e HRM. **Animals**, v. 13, n. 15, p. 2468–2468, 31 jul. 2023. <https://doi.org/10.3390/ani13152468>

ALVES, M. L.; SILVA, D.T.; SPADA, J. C. P.; LEONEL, J. A. F.; BENASSI, J. C.; PEREIRA, N. W. B.; VIOTI, G.; ALVES-MARTIN, M. F.; PAULA, N. F. A.; STARKE-BUZETTI, W. A.; OLIVEIRA, T. M. F. S. Use of the intradermal leishmanin test (Montenegro skin test) for feline visceral leishmaniosis: Detection of cellular immunity. **Experimental Parasitology**, v. 239, p. 108294, 1 ago. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108294>

ALVES-MARTIN, M. F.; PAIXÃO, M. D.; SILVA, D. T.; TENÓRIO, M. D.; ALVES, M. L.; STARKE BUZETTI, W. A.; PEREIRA, V. B.; & LUCHEIS, S. B. Detection of *Leishmania* spp. using parasitological, serological and molecular assays in asymptomatic and sick cats from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 7, n. 11, p. 659-664, 2017. <http://hdl.handle.net/11449/175369>

ARGY, N. LARIVEN, S.; RIDEAU, A.; LEMOINE, A.; BOURGEOIS, M. A., ALLAL, L.; YAZDANPANA, Y. Congenital Leishmaniasis in a newborn infant whose mother was coinfecting with Leishmaniasis and HIV. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 9, n. 2, p. 277-280, 2020. <https://doi.org/10.1093/jpids/piz055>

AVILA-GARCÍA, M.; MANCILLA, J.; SEGURA-CERVANTES, E.; GALINDO-SEVILLA, N. Transmission to Humans. Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment. **InTech**. p. 534. 2014. <http://dx.doi.org/10.5772/57271>

BARBOSA, V. T.; SILVA, M. A. G.; SOUSA, M. G.; GERING, A. P.; SANTOS, H. D.; LAUS, J. L. Detecção de formas amastigotas em exame parasitológico de esfregaço obtido a partir de suabe conjuntival de cães com leishmaniose visceral. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 6, p. 1465–1470, dez. 2012. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000600009>

BENASSI, J. C.; BENVENGA, G. U.; FERREIRA, H. L.; PEREIRA, V. F.; KEID, L. B., SOARES, R.; OLIVEIRA, T. M. F. S.. Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. **Experimental Parasitology**, v. 177, p. 93–97, 1 jun. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.04.004>

BENCHIMOL, J. L.; GUALANDI, F. C.; BARRETO, D. C. S.; PINHEIRO, L. de A. Leishmanioses: sua configuração histórica no Brasil com ênfase na doença visceral nos anos 1930 a 1960. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 14, n. 2, p. 611–626, ago. 2019. <https://doi.org/10.1590/1981.81222019000200017>

BOGGIATTO, P. M.; GIBSON-CORLEY, K. N.; METZ, K.; GALLUP, J. M.; HOSTETTER, J. M.; MULLIN, K.; PETERSEN, C. A.. Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in north america. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, 12 abr. 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001019>

DINIZ, S. A.; MELO, M. S.; BORGES, A. M.; BUENO, R.; REIS, B. P.; TAFURI, W. L.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. In the semen of naturally infected dogs. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 5, p. 650-658, 2005. <https://doi.org/10.1354/vp.42-5-650>

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, n. 8, p. 1266-1269, 2005. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.1266>

ELARABI, A.; SAAD, Z.; SAADAWI, W.; ALDOBEA, N.; SAGHER, F. A rare encounter in nonsuspecting circumstances: First congenital visceral leishmaniasis (kala-azar) in Libya. **Ibnosina Journal of Medicine and Biomedical Sciences**, v. 12, n. 01, p. 44-48, 2020.

EL TAI, N. O.; OSMAN, O. F.; EL FARI, M.; PRESBER, W.; SCHÖNIAN, G.. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 575-579, 2000.

FERNANDES, M. A.; LEONEL, J. A. F.; ISAAC, J. A.; BENASSI, J. C.; SILVA, D. T.; SPADA, J. C. P.; PEREIRA, N. W. B.; FERREIRA, H. L.; KEID, L. B.; OLIVEIRA, T. M. F. D. S. Detecção molecular de DNA de *Leishmania infantum* em diferentes estágios clínicos da leishmaniose em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, p. 194-202, 2019. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019015>

FERREIRA, S. A.; ITUASSU, L. T.; MELO, M. N.; ANDRADE, A. S. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 257-263, abr. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.022>

GALINDO-SEVILLA, N.; MANCILLA-RAMÍREZ, J. T-cell tolerance as a potential effect of congenital leishmaniasis on offspring immunity. **Parasite Immunology**, v. 41, n. 3, p. e12540, 2019. <https://doi.org/10.1111/pim.12540>

GAZERANI, S.; HUNTINGTON, M. K.; SATVATI, J. Case report and literature review: Genital leishmaniasis. **IDCases**, v. 29, p. e01596-e01596, 1 jan. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2022.e01596>

GURGEL, A. de C.; CAVALCANTE, L. A.; ALVES, F. W. da S.; SILVA, M. C. e; FERREIRA, J. da S.; NETO, B. . E. L.; JUNIOR, F. A. F. X.; EVANGELISTA, J. S. . A. M. E.; BERSANO , P. R. de O. Achados hematológicos, bioquímicos, citológicos e

necroscópicos em gatos domésticos com leishmaniose. **Ciência Animal**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 146 a 159, 2023. Disponível em: <https://revistas.uece.br/index.php/cienciaanimal/article/view/11046>. Acesso em: 20 out. 2023.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G. & SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes-- Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology** [S.I.], v. 11, n. 5, p. 210-4, May 2003. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00075-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00075-1)

LEITE, R. S. et al. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab sample. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3-4, p. 201-206, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.020>

LEWIS, D. J. The biology of Phlebotomidae in relation to leishmaniasis. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 19, p. 363-384, 1974. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.19.010174.002051>

LOMBARDO, G.; PENNISI, M. G.; LUPO, T.; MIGLIAZO, 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*, 184(1):10-17, 2012. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 1, p. 10-17, fev. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.08.010>.

MACENTE, B. I.; TARTARELLI, A.; LINS, L. A.; LEAL, L. M.; PRADA, T. C.; MIRANDA, C. M. J.; LUI, J. F. Evolução do programa de controle reprodutivo de cães e gatos realizado na Unesp, Campus de Jaboticabal-SP, no período de 2007 a 2014. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 14, n. 2, p. 6-11, 2016.

MAROLI, M.; PENNISI, M. G.; DI MUCCIO, T.; KHOURY, C.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 145, n. 3-4, p. 357-360, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.11.009>

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. <https://doi.org/10.1023/B:VERC.0000014268.61966.69>

MENDONÇA, I. L.; BATISTA, J. F.; LOPES, K. S. P. D. P.; MAGALHÃES NETO, F. D. C. R.; ALCÂNTARA, D. S.; MERIGUETI, Y. F. F. B.; COSTA, C. H. N. Infection of *Lutzomyia longipalpis* in cats infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, p. 109058, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109058>

MESCOUTO-BORGES, M. R. M.; MAUÉS, É.; COSTA, D. L.; DA SILVA PRANCHEVICIUS, M. C.; ROMERO, G. A. Congenitally transmitted visceral

leishmaniasis: report of two Brazilian human cases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 263-266, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.10.017>

MIGONE MIERES, L. E. Un cas de kala-azar a Assunción (Paraguay). **Bulletin de la Societé de Pathologie Exotique**, v. 6, n. 2, p. 118-120, 1913.

MOSAYABI, M.; MOHEBALI, M.; FARAZI, A. SHIRZADI, M. R.; AKHLAGHI, D.; HAJHOSSEIN, R.; ELIKAEE, S. Leishmaniasis Caused by *Leishmania major* on the Glans Penis: A Case Report. **Iranian Journal of Parasitology**, 23 set. 2019.. <https://doi.org/10.18502/ijpa.v14i3.1488>

OLIVEIRA, R. S.; MACIEL, J. N. Aspectos socioeconômicos da leishmaniose visceral em João Pessoa Paraíba – Brasil. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, João Pessoa, v. 7, n. 1, p. 63-70, 2003.

OLIVEIRA, T. M. F. DE S.; PEREIRA, V. F.; BENVENGA, G. U.; MARTIN, M. F. A.; BENASSI, J. C.; SILVA, D. T. DA; STARKE-BUZETTI, W. A. Conjunctival swab PCR to detect *Leishmania* spp. in cats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 2, p. 220–222, Jun. 2015. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612015016>.

Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: informe epidemiológico das américas**. OPAS; 2022. Disponível em: [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56832/OPASCDEV220021\\_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56832/OPASCDEV220021_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

OZANNE, M. V.; BROWN, G. D.; TOEPP, A. J.; SCORZA, B. M.; OLESON, J. J.; WILSON, M. E.; PETERSEN, C. A. Bayesian compartmental models and associated reproductive numbers for an infection with multiple transmission modes. **Biometrics**. Sep;76(3):711-721, 2019. <https://doi.org/10.1111/biom.13192>

PEARSON, R.D.; STEIGBIGEL, R.T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Immunology**, v. 127, n. 4, p. 1438–1443, 1 out. 1981. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.127.4.1438>

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. **O Brazil-Medico**, Rio de janeiro, v. 46, p. 949-952, nov. 1934.

PEREIRA, V. F.; BENASSI, J. C.; STARKE-BUZETTI, W. A.; SILVA, D. T.; FERREIRA, H. L.; KEID, L. B. Detection of canine visceral leishmaniasis by conjunctival swab PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 104–106, fev. 2016. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0191-2015>

PILATTI, M. M.; FERREIRA, S. A.; MELO, M. N.; ANDRADE, A. S. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 2, p. 255–257, out. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.02.005>

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora **Fiocruz**, 367 p. 2003.

ROCHA, A. V. V. O. et al. Diagnosis and epidemiology of *Leishmania infantum* in domestic cats in an endemic area of the Amazon region, Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 273, p. 80–85, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.08.007>

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental parasitology**, v. 71, n. 3, p. 267–275, 1990. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(90\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0014-4894(90)90031-7)

ROSS, R. (1) note on the bodies recently described by *Leishmania donovani* and (2) Further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal**, v.2 p.1261-1401, 1903. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.2237.1261>

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 an experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 970–972, 1 ago. 2005. <https://doi.org/10.1645/GE-483R.1>

SILVA, D. T.; STARKE-BUZETTI, W. A.; ALVES-MARTIN, M. F. PAIXÃO, M. Dos s. TENÓRIO, M. dos S, LOPES, M. L. Avaliação comparativa de diversos métodos para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina. **Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 179–186, 2014.. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014033>

SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L.; Veneral transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 55–59, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.079>

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; ... BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, 20 maio 2011. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>

STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C.L.; BURSHTAIN, O.; GONEN, L.; BANETH, G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 9, p. 1729–1733, 2004. <https://doi.org/10.1086/383281>

SYMMERS, W. S. T. C. "St. C. Leishmaniasis acquired by Contagion. A Case of Marital Infection in Britain." **The Lancet**, v. 275, n. 7116, p. 127–132, 1 jan. 1960. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(60\)90052-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(60)90052-0)

TENÓRIO, M. Da S.; OLIVEIRA e SOUZA, L.; PAIXÃO, M. Dos S.; ALVES, M. F.; PAULAN, S. De C.; LIMA, F. L. Leishmaniose visceral em raposa comedora de caranguejo *Cerdocyon thous* em cativeiro. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 42, n. 4, p. 608–616, dez. 2011. <https://doi.org/10.1638/2010-0245.1>

TOEPP, A.; BENNETT, C.; SCOTT, B.; SENESAC, R.; OLESON, J. J.; PETERSEN, C. A. Maternal *Leishmania infantum* infection status has significant impact on leishmaniasis in offspring. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 2, p. e0007058, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007058>

TOEPP, A. J.; SCHAUT, R. G.; SCOTT, B.D.; MATHUR, D.; BERENS, A. J.; PETERSEN, C. A. Leishmania incidence and prevalence in U.S. hunting hounds maintained via vertical transmission. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 10, p. 75–81, 1 dez. 2017.. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.08.011>

VIDA, B.; TOEPP, A.; SCHAUT, R. G.; ESCH, K. J. JUELGAARD, R., SHIMAKI, R. M.; PETERSEN, C. A. Immunologic progression of canine leishmaniosis following vertical transmission in United States dogs. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 169, p. 34-38, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.11.008>

VIOTI, G.; da SILVA, M. D.; GALVIN-OVALLOS, F.; ALVES, M. L.; SILVA, D. T.; LEONEL, J. A. F.; PEREIRA, N. W. B.; BENASSI, J. C.; SPADA, J. C. P.; MAIA, C.; GALATI, E. A. B.; STARKE-BUZETTI, W. A, OLIVEIRA, T. M. F. S. Xenodiagnosis in four domestic cats naturally infected by *Leishmania infantum*. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 69, n. 4, p. 2182–2190, 19 jul. 2021. <https://doi.org/10.1111/tbed.14216>

World Health Organization (WHO). **Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a rationale for continued investment in tackling neglected tropical diseases 2021–2030**. World Health Organization's Department of Control of Neglected Tropical Diseases (WHO/NTD), 2021.