

## Qualidade espermática de sêmen de cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp.

[Semen quality of dogs naturally infected by *Leishmania* sp.]

É. Labat<sup>1,3</sup>, J.T. Carreira<sup>2</sup>, B.H. Matsukuma<sup>1</sup>, M.T.A. Martins<sup>1</sup>, V.M.F. Lima<sup>1</sup>, S.R.M. Bomfim<sup>1</sup>,  
S.H.V. Perri<sup>1</sup>, M.B. Koivisto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista - FOA-UNESP

Rua Clóvis Pestana, 793

16050-680 – Araçatuba, SP

<sup>2</sup>Aluna de pós-graduação - FCAV-UNESP – Jaboticabal, SP

<sup>3</sup>Bolsista da FAPESP

### RESUMO

Avaliaram-se alterações espermáticas associadas à infecção por leishmaniose no sêmen de cães naturalmente infectados, utilizando-se, durante oito semanas consecutivas, ejaculados de seis cães soronegativos e seis cães soropositivos. As amostras foram colhidas uma vez por semana e avaliadas quanto ao volume, concentração, motilidade, vigor, morfologia espermática, integridade da cromatina, avaliação simultânea da integridade da membrana plasmática, acrossoma e potencial mitocondrial. Concomitantemente foram dosadas a proteína total do plasma seminal e sanguíneo. A leishmaniose visceral causou aumento dos defeitos maiores e menores nos espermatozoides dos animais acometidos pelo estágio moderado a severo da doença. Em estágios mais avançados da enfermidade, a integridade das membranas acrossomal e plasmática foi afetada negativamente. Não foi possível estabelecer um critério quanto à avaliação do potencial mitocondrial. A incidência de alterações morfológicas nos animais acometidos não promoveu aumento de injúrias à cromatina. Todos os animais com leishmaniose apresentaram hiperproteinemia do sêmen.

Palavras-chave: cão, leishmaniose visceral, sêmen, hiperproteinemia

### ABSTRACT

*The spermatic changes associated with the natural infection in dogs by Leishmania sp was evaluated during eight consecutive weeks, using ejaculates of six seronegative and six seropositive dogs. The samples were collected once a week and evaluated for volume, concentration, motility, vigor, sperm morphology, chromatin integrity, simultaneous evaluation of the plasmatic membrane integrity, acrosome, and mitochondrial potential. The total proteins of the seminal plasma and blood were measured. The visceral leishmaniasis caused increase of major and minor defects in spermatozoa of animals attacked by moderate to severe stages of the disease. In more advanced stages of the illness, the acrosomal and plasmatic membranes integrity was adversely affected. It was not possible to establish a pattern referring the evaluation of the mitochondrial potential. The incidence of morphological changes in the seropositive animals did not promote an increase of injuries to the chromatin. All animals with leishmaniasis presented hyperproteinemia of the semen.*

Keywords: dog, visceral leishmaniasis, semen, hyperproteinemia

### INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma antropozoonose causada por um protozoário do complexo *Leishmania*, que compreende *Leishmania*

*donovani*, *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi*, sendo esta última observada no Brasil (Feitosa et al., 2000). A forma amastigota é parasita intracelular em vertebrados, enquanto as formas promastigotas e paramastigotas são

Recebido em 02 de dezembro de 2009

Aceito em 4 de maio de 2010

E-mail: erikalabat@yahoo.com.br

encontradas no trato digestivo de invertebrados. Inúmeras espécies de vertebrados podem ser infectadas por *Leishmania sp.*, mas o cão é reconhecidamente o reservatório mais importante para a leishmaniose visceral causada pela *L. chagasi* e *L. infantum* (Moreno e Alvar, 2002). Nos anos de 2000 a 2005, foram registrados 25.353 casos confirmados de leishmaniose visceral no Brasil (dados do MS/SVS, SES e SINAN).

A transmissão vertical foi descrita por Rosypal (2005), que detectou, por PCR, o DNA do parasita no fígado, medula óssea, coração, linfonodos, rins e tecido placentário de fetos removidos por cesariana de cadelas portadoras de leishmaniose. Porém, a transmissão venérea foi relatada apenas uma vez em humanos (Symmers, 1960).

Riera e Valladares (1996) isolaram *L. infantum* do sêmen e urina de cães experimentalmente infectados. Pesquisas mais recentes (Diniz et al., 2005) mostraram que a leishmaniose visceral está associada à alta frequência de lesões inflamatórias na maioria dos órgãos sexuais nos cães. O alto número de formas amastigotas no testículo seria um fator causador de resposta inflamatória, assim a degeneração testicular seria consequência desta reação. Gonzales et al. (1983), ao trabalharem com *hamsters* infectados experimentalmente, encontraram lesões degenerativas no testículo associadas à presença de infiltrado de linfócitos e macrófagos contendo formas amastigotas, enquanto Diniz et al. (2005) não verificaram nenhuma forma do parasita no tecido testicular, mas as detectaram por PCR no sêmen de cães naturalmente infectados.

Um dos relatos sobre a qualidade do sêmen, ou do efeito das lesões causadas no testículo pela leishmaniose, foi o apresentado por Gonzales et al. (1983), em que a degeneração testicular, o depósito de substância amiloide e a presença de formas amastigotas em linfócitos e macrófagos teriam relação com a degeneração da espermatogônia e a azoospermia em *hamsters* experimentalmente infectados.

Os objetivos do presente estudo foram avaliar alterações espermáticas associadas à infecção por leishmaniose no sêmen de cães naturalmente infectados e observar a ocorrência de

comprometimento reprodutivo ao longo do período estudado e a evolução da doença.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 12 cães, seis cães soronegativos e hígidos da região de Araçatuba com diagnóstico negativo (GI) e seis cães com diagnóstico comprovado para leishmaniose (GII). O sêmen foi colhido semanalmente por um período de oito semanas pela técnica da manipulação digital. No final do experimento, os animais soropositivos foram sacrificados. As amostras de sêmen foram denominadas momento 1 (M1) a momento 8 (M8), conforme a semana de colheita.

O sêmen foi colhido fracionado, separando a fração prostática da fração rica em espermatozoides e avaliado quanto ao volume, concentração (espermatozoides/mL), motilidade progressiva e retilínea (%), vigor (0-5), morfologia espermática (%), integridade da cromatina (%), avaliação da integridade de membranas (%) e potencial mitocondrial (%). A classificação das alterações morfológicas seguiu os padrões pre-estabelecidos por Blom (1973) e os limites foram determinados de acordo com a legislação do Ministério da Agricultura.

Para avaliação da integridade do DNA, empregou-se a técnica descrita por Tejada et al. (1984). A integridade de membranas foi avaliada pela associação dos corantes fluorescentes iodeto de propídio (PI), aglutinina de *Pisum sativum* (PSA) conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1), segundo Celeghini et al. (2005abc). A análise de proteínas totais (g/L) foi realizada pelo método colorimétrico para a determinação das proteínas totais (teste do biureto), visando dosar as proteínas do plasma sanguíneo e do plasma seminal tanto de cães positivos como de cães hígidos, soronegativos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença estatística entre GI e GII quanto ao volume, à concentração e ao vigor, e quanto à análise morfológica e à integridade da cromatina. A exceção ocorreu com a motilidade e quanto à avaliação da membrana espermática e da proteína do plasma seminal.

Os animais soropositivos encontravam-se em diferentes estágios de evolução da doença, causando grande variação nos resultados do GII. Dez cães foram previamente descartados por apresentarem comportamento agressivo ou por se encontrarem muito debilitados. Alguns deles pararam de apresentar ejaculado após a primeira ou segunda semana. Não foi possível obter um padrão homogêneo em relação ao estágio da doença dos animais selecionados. Um animal apresentou sinais clínicos leves, dois apresentaram sinais moderados e três, avançados. Nos animais com quadro clínico severo, observou-se diminuição do volume do ejaculado e consequente redução da concentração espermática ao longo do tempo. O mesmo ocorreu com a motilidade retilínea e progressiva, em que houve declínio contínuo em cinco animais, mais acentuado do M7 ao M8.

Pesquisas recentes associam o elevado número de formas amastigotas da leishmaniose visceral a lesões inflamatórias no testículo, podendo levar à degeneração testicular (Diniz et al., 2005) e, em consequência, alterar o quadro espermático.

As alterações morfológicas de um ejaculado normal não devem ultrapassar 30% de defeitos totais. No presente estudo, não houve diferença estatística quanto às anormalidades morfológicas, pois os cães do GI também apresentavam índice elevado de anormalidades espermáticas. Os cães selecionados para o grupo-controle foram escolhidos sem avaliação prévia da qualidade espermática e triados apenas pelo resultado negativo da sorologia para leishmaniose. Nos animais em estágio avançado da doença, observou-se, ao longo das colheitas, acentuada diferença em relação às alterações morfológicas, e a porcentagem de defeitos totais chegou a 96,0%.

As anormalidades mais encontradas no GII foram cauda fortemente enrolada (defeito maior) e cauda dobrada (defeito menor). Para três cães dentro do grupo soronegativo (GI), os defeitos menores mostraram-se um pouco acima do limite normal (20%).

A avaliação da integridade da cromatina (DNA), analisada após a colheita de sêmen, não mostrou diferença significativa entre os grupos. O índice de cromatina lesada foi muito baixo ou ausente. Erenpreiss et al. (2006) observaram apenas uma

leve – ou não verificaram – correlação entre os parâmetros convencionais do sêmen e danos no DNA. Afirmaram que a maioria dos parâmetros não indicaria que espermatozoides de pacientes com contagem, morfologia e motilidade espermática anormais apresentariam os níveis de danos no DNA aumentados.

A avaliação da integridade de membranas das amostras dos cães selecionados do presente trabalho foi realizada pela amostra de sêmen diluído em associação com as sondas fluorescentes FITC-PSA, PI e JC-1. Os resultados obtidos foram agrupados quanto à integridade de acrossoma, da membrana e potencial mitocondrial, respectivamente. Quanto à análise do potencial mitocondrial de sêmen deste estudo, a sonda de iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'

tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) mostrou-se pouco eficiente. Mesmo os espermatozoides que apresentaram alta motilidade espermática, o potencial mitocondrial foi baixo ou até mesmo ausente. Gravance et al. (2001) relataram que a porcentagem de espermatozoides corados em vermelho com alto potencial mitocondrial foi altamente correlacionada com a viabilidade espermática.

Quanto à integridade das membranas, não houve diferença entre os grupos, porém houve aumento progressivo da membrana citoplasmática lesada ao longo do tempo do grupo soropositivo para leishmaniose, indicando que, se houvesse padronização do estado clínico dos animais, haveria uma tendência de os animais positivos serem mais susceptíveis à lesão da membrana citoplasmática e do acrossoma.

Na segunda fase deste trabalho, em que foram avaliadas a proteína total do plasma sanguíneo e seminal, observou-se a existência de uma hiperproteinemia sanguínea, mas estatisticamente não significativa, nos animais soropositivos em estágio moderado e avançado da doença quando comparados ao grupo-controle, corroborando os resultados de Campino et al. (2006). Esses autores verificaram que três meses após a inoculação com formas amastigotas de leishmania, dois cães desenvolveram sinais clínicos. Esses animais mostraram considerável diminuição do número de leucócitos e plaquetas. A quantidade de proteínas séricas totais foi elevada, com inversão em relação à albumina-

globulina, quando comparada aos resultados dos grupo-controle.

De acordo com o próprio *kit* do teste de biureto (método colorimétrico para determinação das proteínas totais), os valores de referência são de 60 a 80g/L. Observou-se que três cães dos seis positivos apresentaram valores acima de 80g/L em todas as oito colheitas. Um cão apresentou este valor elevado no último momento (M8), e apenas dois apresentaram resultados dentro da normalidade, mostrando que, apesar de não haver diferença estatística entre os valores de proteína sanguínea total, quatro animais do GII apresentaram hiperproteinemia sanguínea. Mattos Júnior et al. (2004) registraram oscilação acima e abaixo dos valores médios dos

constituintes séricos em um estudo de 30 dias com nove cães soropositivos, quando comparados aos soronegativos.

Os resultados das proteínas totais do sangue e do sêmen dos cães do GI e GII são apresentados na Tab. 1. Houve diferença significativa quanto às proteínas do sangue e de sêmen entre os grupos. Os valores de proteína total do plasma seminal não apresentaram correlação com os do sangue. Em todos os animais do GII, observou-se aumento das proteínas do sêmen ( $P<0,05$ ) em relação aos do GI, e em um animal com sintomas avançados da doença ocorreu aumento generalizado das proteínas do sêmen, chegando próximo aos valores sanguíneos.

Tabela 1. Médias e desvios-padrão da proteína total do plasma sanguíneo e do plasma seminal de cães soronegativos (GI) e soropositivos para leishmaniose (GII), segundo os momentos (M) de colheita do sêmen

Proteína	Momento (semanas)	GI (n=6)	GII (n=6)
Sangue (g/L)	M1	64,34±9,14*	73,17±23,11*
	M2	61,28±6,80*	72,88±20,75*
	M3	60,06±5,10*	72,20±18,94*
	M4	59,29±10,59*	69,56±15,81*
	M5	62,68±7,03*	70,20±15,70*
	M6	63,08±8,03*	61,52±21,02*
	M7	63,17±9,97*	71,27±12,02*
	M8	65,72±8,62*	73,97±16,40*
Sêmen (g/L)	M1	11,39±5,45B	26,90±17,67A
	M2	14,21±9,81B	22,98±7,39A
	M3	10,55±3,69B	19,65±5,82A
	M4	12,83±4,70B	21,37±10,96A
	M5	12,44±6,64B	26,02±18,38A
	M6	16,42±13,84B	19,51±4,91A
	M7	17,32±6,59B	21,59±7,89A
	M8	14,70±8,82B	22,66±11,18A

\*Diferença significativa em relação ao sêmen, pelo teste de Tukey ( $P<0,05$ ).

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste Tukey ( $P<0,05$ ). M1 a M8 = primeira a oitava semanas de colheita.

Denerolle (1996) descreveu que animais positivos para leishmaniose apresentavam hiperviscosidade sanguínea associada à marcada hiperproteinemia e hipergamaglobulinemia.

Até o momento, são raros os estudos que indicam alterações na proteína total do plasma seminal de cães portadores de leishmaniose. No cão, o conteúdo médio de proteínas totais do plasma seminal é de 10,9g/L (Isaacs e Sharper,

1985) a 21,9g/L (Souza et al., 2007). England et al. (1990) verificaram que a concentração total de proteína foi, significativamente, maior na fração II, rica de espermatozoides, do ejaculado canino, quando comparada à fração I, prostática. Os valores médios encontrados foram de 14,4g/L e 42,5g/L, respectivamente, para a primeira e a segunda frações. No presente estudo, observou-se que, em todos os animais soropositivos,

independente das características seminais, ocorreu significativa hiperproteinemia.

Recentes investigações comparando  $\beta$ 2-globulinas na urina com proteínas do soro de cães infectados pela leishmaniose verificaram aumento na proporção de proteínas na urina. Na maioria dos casos, a proteinúria seria o resultado de avançado dano glomerular/tubular (Bizzeti et al., 2002). Fenômeno semelhante ao que ocorre nos testículos, em que, segundo Garcia-Alonso et al. (1996), cães naturalmente infectados possuíam lesões inflamatórias subependimais, intersticiais associadas à presença de anticorpos de leishmania e imunoglobulinas, depósitos amiloides nos capilares sinusoides.

A utilização simultânea de métodos variados de avaliação espermática por demonstrar diversos aspectos relacionados à qualidade do sêmen pode ser uma ferramenta importante na determinação do comprometimento reprodutivo causado por determinadas enfermidades. Este estudo também comprovou que tanto os animais positivos sintomáticos como os assintomáticos apresentam hiperproteinemia do sêmen, mostrando ser um dado confiável e interessante para novas pesquisas.

#### AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pela concessão de bolsa de iniciação científica.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIZZETI, M.; BIANCHINI, S.; PAPINI, R. et al. Urinary and serum protein electrophoresis in dogs with Leishmaniasis. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.*, v.56, p.285-286, 2002.
- BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. *Nord. Vet. Med.*, v.25, p.383-391, 1973.
- CAMPINO, L.; GOMES, G.S.; CAPELA, M.J.R. et al. Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniosis. *Vet. Res. Commun.*, v.30, supl.1, p.39-43, 2006.
- CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J. et al. Efeitos da criopreservação e do diluidor sobre o sêmen bovino quanto às membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial. *Acta Sci. Vet.*, v.33, supl.1, p.327-327, 2005a.
- CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. et al. Uso de CMXROS e JC-1 na avaliação da função mitocondrial, associadas a sondas fluorescentes para avaliação da membrana plasmática e acrossomal em espermatozoides bovinos. *Acta Sci. Vet.*, v.33, supl.1, p.321-321, 2005b.
- CELEGHINI, E.C.C.; SILVA, F.H.A.; FARIA, D.E. et al. Avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial em espermatozoides de galos. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, supl.7, p.156-156, 2005c.
- DENEROLLE, P. Leishmaniose canine: difficultés du diagnostic et du traitement (125 cas). *Prat. Med. Chir. Anim. Compag.*, v.31, p.137-145, 1996.
- DINIZ, S.A.; MELO, M.S.; BORGES, A.M. et al. Genital lesions associated with visceral Leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Vet. Pathol.*, v.42, p.650-658, 2005.
- ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W.E.; MIDDLETON, D.J. An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. *Res. Vet. Sci.*, v.49, p.66-70, 1990.
- ERENPREISS, J.; SPANO, M.; ERENPREISSA J. et al. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J. Androl.*, v.8, p.11-29, 2006.
- FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). *Clin. Vet.*, v.5, p.36-44, 2000.
- GARCIA-ALONSO, M.; NIETO, C.G.; BLANCO, A. et al. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasite Immunol.*, v.18, p.539-546, 1996.

- GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; MILLER, M.G. et al. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reprod. Toxicol.*, v.15, p.5-10, 2001.
- GONZALES, J.L.; GALLEGO, E.; CASTAÑO, M. et al. Testicular amyloidosis in hamsters experimentally infected with *Leishmania donovani*. *Br. J. Exp. Pathol.*, v.64, p.518-523, 1983.
- ISAACS, W.B.; SHAPER, J.H. Immunological localization and quantitation of the androgen-dependent secretory protease of the canine prostate. *Endocrinology*, v.117, p.1512-1520, 1985.
- MATTOS JUNIOR, D.G.; PINHEIRO, J.M.; MENEZES, R.C. et al. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, p.119-122, 2004.
- MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.*, v.18, p.399-405, 2002.
- RIERA, C.; VALLADARES, J.E. Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. *Parasitol. Today*, v.12, p.412, 1996.
- ROSYPAL, A.C. Characterization of canine leishmaniasis in the United States: pathogenesis, immunological responses, and transmission of an American isolate of *Leishmania infantum*. 2005. Thesis (PhD) - Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, EUA.
- SOUZA F.F.; BARRETO C.S.; LOPES, M.D. Characteristics of seminal plasma proteins and their correlation with canine semen analysis. *Theriogenology*, v.68, p.100-106, 2007.
- SYMMERS, W.S.C. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. *Lancet*, v.1, p.127-132, 1960.
- TEJADA, R.I.; MITCHELL, J.C.; NORMAN, A. et al. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil. Steril.*, v.42, p.87-91, 1984.