

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM  
CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA

Parasitismo por *Leishmania* spp. em Gambás-de-Orelha-Branca (*Didelphis albiventris*) Capturados em Perímetro Urbano de Campo Grande - MS: Patologia e Epidemiologia

Autor: Wellington Garcia Corrêa

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gisele Brazilian de Andrade

Co-orientador (a): Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera

Co-orientador (a): Dr. Gabriel Carvalho de Macedo

"Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA, no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: "Sustentabilidade Ambiental e Produtiva" Aplicada à "Saúde, Ambiente e Sustentabilidade"

Campo Grande  
Mato Grosso do Sul  
Fevereiro de 2025

**"Parasitismo por *Leishmania* sp. em Gambás-de-Orelha-Branca (*Didelphis albiventris*)  
Residentes em Áreas Urbanas de Campo Grande – MS: Patologia e Epidemiologia**

**Autor:** Wellington Garcia Corrêa

**Orientador:** Prof. Dr. Gisele Brazilian de Andrade

**Titulação:** Mestre em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária

**Área de Concentração:** Sustentabilidade Ambiental e Produtiva

**Aprovado em 07 de fevereiro de 2025.**

A presente defesa foi na Sala D-107, BlocoL, 1º piso da Universidade Católica Dom Bosco

Eu, Gisele Brazilian de Andrade, como presidente da banca, assinei a folha de aprovação com o consentimento de todos os membros.



Prof. Dr. Gisele Brazilian de Andrade – UCDB

Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera - UCDB

Prof. Dr. Gabriel Carvalho de Macedo - UCDB

Prof. Dr. Wesley Arruda Gimenes Nantes – UCDB

Prof. Dr. João Bosco Vilela Campos - UFMS

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Bibliotecária Mourâmisse de Moura Viana - CRB-1 3360

C824p Corrêa, Wellington Garcia

Parasitismo por leishmania spp. em gambás-de-orelha branca (*Didelphis albiventris*) capturados em perímetro urbano de Campo Grande - MS: patologia e epidemiologia/ Wellington Garcia Corrêa sob orientação da Profa. Dra. Gisele Brazilian de Andrade; Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera e Prof. Dr. Gabriel Carvalho de Macedo.-- Campo Grande, MS : 2024.

61 p.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária ) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande - MS, 2025

Bibliografia: p. 18-29

1. *Didelphis albiventris*. 2. Leishmania spp.. 3. Parâmetros bioquímicos. 4. Parâmetros hematológicos. 5. Saúde animalI.Andrade, Gisele Brazilian de. II.Herrera, Heitor Miraglia. III.Macedo, Gabriel Carvalho de. IV. Título.

CDD: 636.0893

# SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS GERAIS	2
<b>2.1 Objetivos específicos</b>	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
<b>3.1 Fragmentação florestal e os impactos na fauna urbana</b>	3
3.1.1 Gambá-de-orelha-branca ( <i>Didelphis albiventris</i> )	5
<b>3.2 <i>Leishmania</i> spp.</b>	7
3.3.1. Leishmaniose em gambás	8
<b>3.3 Avaliação clínica dos animais silvestres</b>	10
3.3.1. Análises bioquímicas e hematológicas	12
3.3.2 Técnicas de Diagnósticos <i>Leishmania</i> spp.	16
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
ARTIGO - Parasitismo por <i>Leishmania</i> spp. em Gambás-de-Orelha-Branca ( <i>Didelphis albiventris</i> ) Capturados em Perímetro Urbano de Campo Grande - MS: Patologia e Epidemiologia	30
<b>RESUMO</b>	31
<b>INTRODUÇÃO</b>	32
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	33
<b>Área de estudo</b>	33

<b>Coleta de materiais biológicos dos animais</b>	34
<b>Diagnóstico Molecular</b>	34
<b>Hematologia e bioquímica</b>	35
<b>Análise histopatológica</b>	36
<b>RESULTADOS</b>	37
<b>DISCUSSÃO</b>	43
<b>CONCLUSÃO</b>	45
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	46

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Resultado do teste molecular (kDNA - RV1/RV2) para <i>Leishmania</i> spp. em diferentes tecidos de gambá-de-orelha-branca ( <i>Didelphis albiventris</i> ) (n=23) amostrados em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Os resultados estão expressos pelo número de animais positivos para <i>Leishmania</i> spp., seguido pelo percentual de positividade.	38
<b>Tabela 2.</b> Média e desvio padrão dos parâmetros hematológicos de 23 gambás-de-orelha-branca ( <i>Didelphis albiventris</i> ) capturados em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. (He: Hemácias; VG: Volume Globular; <i>Hemoglobina</i> ; VCM: Volume Corpuscular Médio; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média).	38
<b>Tabela 3.</b> Média e desvio padrão dos parâmetros do leucograma de 23 gambás-de-orelha-branca ( <i>Didelphis albiventris</i> ) capturados em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. (Le: contagem total de leucócitos; Neutrófilos; Linfócitos; Monócitos; Eosinófilos; Basófilos).	39
<b>Tabela 4.</b> Média e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos séricos de 23 gambás-de-orelha-branca ( <i>Didelphis albiventris</i> ) capturados em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. (TGP: Transaminase Pirúvica; TGO: Transaminase Oxalacética; FA: Fosfatase Alcalina; CK: Creatine Kinase (creatina quinase); PT: Proteína Total; ALB: Albumina).	40

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Mapa da cidade de Campo Grande, MS, indicando em vermelho as áreas de coletas dos gambás-de-orelha-branca 1. Carandá Clube; 2. Centro de Educação Ambiental (CEA) Anhanduí; 3. CEA Imbirussu; 4. CEA Polonês; 5. Chácara Coqueiral e 6. Mata do Surucuá.	33
<b>Figura 2.</b> Outliers encontrados para linfócitos, monócitos e basófilos de gambás-de-orelha-branca ( <i>Didelphis albiventris</i> ) capturados em Campo Grande, Mato Grosso do Sul.	39
<b>Figura 3:</b> Outliers encontrados para PT (proteínas totais), TGO (Transaminase Oxalacética), FA (Fosfatase Alcalina) e Ureia de gambás-de-orelha-branca ( <i>Didelphis albiventris</i> ) capturados em Campo Grande, Mato Grosso do Sul.	41
<b>Figura 4:</b> Fotomicrografia de fígado de gambá-de-orelha-branca mostrando hepatócitos com vacuolização gordurosa (seta amarela), e presença de pequenos focos de células inflamatórias do infiltrado misto, em espaço-porta (seta verde). Coloração de Hematoxilina e eosina.	42
<b>Figura 5:</b> Fotomicrografia de rim de gambá-de-orelha-branca mostrando presença de pouca quantidade de material proteico fibrilar no interior de alguns túbulos renais (seta vermelha) e glomérulo (seta amarela) e vacuolização de células epiteliais de alguns túbulos renais (seta verde). Coloração de Hematoxilina e eosina.	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALB – Albumina  
ALP – Fosfatase Alcalina  
CEA – Centro de Educação Ambiental  
CEUA/UCDB – Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Católica Dom Bosco  
CGH – Contagem Global de Hemácias  
CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média  
CK – Creatine Kinase  
cPCR – Reação em Cadeia da Polimerase convencional  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
dNTP – Nucleotídeos desoxirribonucleicos trifosfatados  
EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid  
ELISA – Ensaio Imunoenzimático  
FA – Fosfatase Alcalina  
fL – Fentolitro  
Hb – Concentração de Hemoglobina  
HCM – Hemoglobina Corpuscular Média  
HGB – Hemoglobina  
He – Hemácias  
HE – Hematoxilina e Eosina  
Ht – Hematócrito  
IRBP – Retinoides Inter-fotorreceptores  
KDNA – DNA do cinetoplasto  
Le – Leucócitos  
LV – Leishmaniose Visceral  
CCMH – Concentração Corpuscular Média de Hemoglobina  
VCM – Volume Corpuscular Médio  
 $MgCl_2$  – Cloreto de magnésio  
MS – Mato Grosso do Sul  
nPCR – Nested PCR  
OMS – Organização Mundial da Saúde

PB – Pares de Base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PCV – Volume Globular

PT – Proteína Total

RIFI – Imunofluorescência Indireta

rRNA – RNA ribossômico

SISBIO/IBAMA – Sistema de Autorização de Informação em Biodiversidade

TGO – Transaminase Oxalacética

TGP – Transaminase Pirúvica

Tris-HCl – Tris (hidroximetil aminometano) com ácido clorídrico

UCDB – Universidade Católica Dom Bosco

VCM – Volume Corpuscular Médio

VGM – Volume Globular Médio

## RESUMO

A expansão urbana sobre áreas naturais favorece a presença de espécies generalistas e sinantrópicas, capazes de se estabelecer em fragmentos florestais inseridos no ambiente urbano. No entanto, a proximidade entre animais silvestres, seres humanos e seus animais domésticos pode gerar consequências imprevisíveis para a saúde dessas populações. O presente estudo teve como objetivo avaliar a infecção por *Leishmania* spp. em gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*), provenientes de fragmentos florestais de Campo Grande - MS, em seus aspectos patológicos e epidemiológicos. Para tal, foram capturados 23 gambás, entre abril e dezembro de 2023. Durante a necropsia, fragmentos de baço, pele, fígado e medula óssea foram coletados para as análises molecular e histopatológica. Para as análises bioquímicas e hematológicas foi utilizado o sangue total. O exame molecular (cPCR/kDNA) detectou DNA de *Leishmania* spp. em 95,6% dos animais, e em todos os tecidos avaliados, com maior presença nos órgãos linfoides. A reação de PCR em tempo real (SSU18S rRNA) para *L. infantum* realizada com DNA de medula óssea foi positiva em 19 animais, com uma sequência (cobertura 99% e identidade 100%) depositada no GeneBank. As análises hematológicas e bioquímicas revelaram variações nos níveis de linfócitos, monócitos, ureia e proteínas totais, separadamente, e de acordo com o grau de valores referentes aos da literatura. As alterações histopatológicas observadas no fígado e rins foram leves e inespecíficas. No exame histopatológico da pele e dos tecidos linfoides não foram encontradas lesões, nem mesmo formas amastigotas características de *Leishmania* spp. Estes achados sugerem que o gambá-de-orelha-branca possa possuir mecanismos fisiológicos capazes de controlar a infecção, os quais devem ser investigados, uma vez que não foram visualizadas formas amastigotas nos tecidos, apenas DNA de *L. infantum*. Com o resultado dessa possível resistência, pode-se hipotetizar que o gambá-de-orelha-branca pode ter um importante papel no cenário epidemiológico da leishmaniose visceral em Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

Palavras-chave: 1. *Didelphis albiventris*; 2. *Leishmania* spp.; 3. Parâmetros bioquímicos; 4. Parâmetros hematológicos; 5. Saúde Animal.

## ABSTRACT

The expansion of urban areas into natural environments favors the presence of generalist and synanthropic species, which are able to establish themselves in forest fragments within the urban landscape. However, the proximity between wildlife, humans, and their domestic animals can lead to unpredictable health consequences for these populations. This study aimed to evaluate *Leishmania* spp. infection in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) from forest fragments in Campo Grande, MS, focusing on pathological and epidemiological aspects. A total of 23 opossums were captured between April and December 2023. During necropsy, samples of the spleen, skin, liver, and bone marrow were collected for molecular and histopathological analyses, while whole blood was used for biochemical and hematological evaluations. The molecular test (cPCR/kDNA) detected *Leishmania* spp. DNA in 95.6% of the animals, with all analyzed tissues testing positive, particularly the lymphoid organs. Real-time PCR (SSU18S rRNA) for *L. infantum*, performed using bone marrow DNA, was positive in 19 animals, with one sequence (99% coverage and 100% identity) deposited in GenBank. Hematological and biochemical analyses revealed variations in lymphocyte, monocyte, urea, and total protein levels, both individually and in accordance with reference values in the literature. Histopathological alterations observed in the liver and kidneys were mild and nonspecific. No lesions or amastigote forms characteristic of *Leishmania* spp. were found in the histopathological examination of the skin and lymphoid tissues. These findings suggest that the white-eared opossum may possess physiological mechanisms capable of controlling the infection, which should be further investigated, as no amastigote forms were observed in the tissues only *L. infantum* DNA was detected. Given this potential resistance, it can be hypothesized that the white-eared opossum may play a significant role in the epidemiological scenario of visceral leishmaniasis in Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

Keywords: 1. *Didelphis albiventris*; 2. *Leishmania* spp.; 3. Biochemical parameters; 4. Hematological parameters; 5. Animal Health.

## 1. INTRODUÇÃO

Com a crescente influência humana no ambiente natural, algumas espécies de animais silvestres, especialmente aquelas com maior plasticidade ecológica, passaram a ocupar áreas urbanas ou periurbanas. Essa proximidade os expõe a muitos perigos como atropelamentos, envenenamentos e maior suscetibilidade a agentes infecciosos. Além disso, o estreito contato com seres humanos pode representar sérios problemas para saúde pública, tornando necessário o monitoramento da fauna urbana, pois as alterações ambientais impactam as interações ecológicas entre espécies (DALZOCHIO et al., 2017).

A fragmentação dos ambientes naturais, resultante da expansão das áreas urbanas, tem proporcionado o convívio e a interação entre animais domésticos, silvestres e seres humanos, favorecendo a transmissão de agentes infecciosos parasitários entre espécies (DASZAK et al., 2000). Esse contato pode comprometer a saúde dos animais silvestres, uma vez que a exposição a novos patógenos pode gerar impactos fisiológicos negativos, afetando sua homeostase e resultando em perda de apetite e comprometimento do desenvolvimento (POULIN e COMBES, 1999). O estado de emaciação, caracterizado por um peso abaixo dos padrões ideais, está diretamente relacionado à imunossupressão, tornando os animais mais vulneráveis a coinfecções (MACHADO et al., 2018; BELDOMENICO, 2009). Esses fatores reforçam a necessidade da realização de exames complementares, como os hematológicos e bioquímicos, para monitorar com precisão a saúde desses animais (CREMONESI et al., 2021).

Na América Latina, os protozoários do gênero *Leishmania* representam um desafio significativo para a saúde pública, impactando seres humanos e também os animais domésticos e silvestres (DA SILVA et al., 2024). Avaliações clínicas e patológicas são de grande importância, para avaliar espécies que participam do seu ciclo de transmissão, pois são parasitos, que podem provocar graves alterações fisiológicas em seus hospedeiros (DE MACEDO et al., 2021). Entre os hospedeiros silvestres, destaca-se o gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*), que com frequência é associado ao ciclo de transmissão de *Leishmania infantum*. Portanto, compreender seus padrões fisiológicos e possíveis alterações patológicas é fundamental para elucidar o papel dessa espécie na epidemiologia da leishmaniose.

## 2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da infecção por *Leishmania* spp. na saúde de gambás-de-orelha-branca que vivem em áreas urbanas de Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

### 2.1 Objetivos específicos

- Descrever os valores hematológicos e bioquímicos de gambás que oriundos de fragmentos florestados em Campo Grande / MS;
- Avaliar a influência da infecção por *Leishmania* spp. nos parâmetros hematológicos e bioquímicos de gambás que vivem fragmentos florestados em Campo Grande / MS;
- Investigar a relação entre os níveis das enzimas hepáticas, renais e muscular esquelética com as alterações teciduais em rins, fígado e musculoesqueléticas;
- Investigar as alterações histopatológicas e a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. em baço, linfonodos e pele de gambás provenientes de fragmentos florestados em Campo Grande / MS.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Fragmentação florestal e os impactos na fauna urbana

A urbanização em biomas altamente diversos, como o Cerrado, favorece o surgimento de diversos microecossistemas urbanos, nos quais várias espécies de animais silvestres passam a ocupar novos nichos, persistindo nessas áreas modificadas pelo homem. Porém, a intervenção humana nesses ambientes torna dinâmica e instável a relação entre o meio, os parasitos e seus hospedeiros. Isto porque a manutenção do ciclo de vida dos parasitos depende de sua adaptação aos recursos bióticos e abióticos disponíveis, inclusive quando os animais ficam restritos a fragmentos florestais reduzidos (DASZAK et al., 2000).

Nesses ambientes urbanos, a biodiversidade se relaciona entre si e com o meio, nele, os mamíferos silvestres desempenham um papel relevante na manutenção das populações de vetores artrópodes como carrapatos e mosquitos. Os gambás, com seus hábitos alimentares onívoros, contribuem para o equilíbrio ecológico e, ao mesmo tempo, atuam como hospedeiros de diversas espécies de parasitos, influenciando diretamente na dinâmica das doenças transmitidas nesse meio (DASZAK et al., 2000). Da mesma forma que os mamíferos, os parasitos também desempenham funções importantes na estruturação das comunidades, pois infectam uma ampla variedade de hospedeiros, podendo influenciar tanto na extinção de determinadas espécies quanto nos processos de especiação. Assim, compreender e identificar seus ciclos de vida é fundamental para a prevenção e controle de zoonoses, visto que muitas dessas enfermidades graves e até letais, afetam tanto a saúde animal quanto humana (OSTFELD & KEESING 2000; MOLYNEUX 2003).

A fauna e a flora sofrem grande impacto nesse contexto de urbanização acelerada, que interfere na natureza reduzindo ou substituindo os habitats naturais por áreas construídas, causando graves problemas de desequilíbrio ambiental. Além do risco de extinção ou proliferação de espécies, essas drásticas mudanças levam a alterações comportamentais, fisiológicas e até genéticas nos animais, forçando-os a se adaptar às novas condições ambientais. De forma semelhante, a seleção natural pressiona a dominância de patógenos que também se ajustam ao ambiente modificado influenciando a dinâmica das doenças emergentes (RANDOLPH et al.,

2009; WALSH et al., 2013; ESTRADA-PEÑA et al., 2014). Além disso, a urbanização desordenada pode facilitar a introdução de espécies exóticas sem nenhum controle, resultando em grave desequilíbrio ecológico, afetando a biodiversidade local e a dinâmica das interações ecológicas (MCKINNEY et al., 2008; FAETH, 2011).

As transformações antropogênicas alteram a estrutura dos sistemas naturais e modificam a dinâmica das doenças, aumentando o risco de emergências sanitárias para humanos e animais (WHITE et al., 1989b). Nesse contexto, os movimentos de dispersão de mamíferos silvestres urbanizados facilitam o contato entre vetores artrópodes, seus patógenos, população humana e seus animais domésticos, promovendo a transmissão bidirecional de patógenos (TOMASSONE et al., 2018). Além disso, a conectividade ecológica entre diferentes habitats pode criar corredores biológicos que contribuem para a disseminação de doenças emergentes e reemergentes (SHULTZ et al., 2023).

Quando existe uma aproximação ou mesmo uma convivência, o estado de saúde de animais silvestres e domésticos interfere diretamente na vida humana, uma vez que doenças zoonóticas podem ser transmitidas por contato direto, vetores artrópodes ou até mesmo pelo ambiente contaminado (WENDTE et al., 2011). São fatores, que exigem e tornam essencial a realização de estudos mais aprofundados sobre o comportamento e a relação entre animais silvestres, parasitos e vetores, que desempenham seu papel no ciclo de transmissão de diversas doenças infecciosas (RENDÓN-FRANCO et al., 2014; SHWAB et al., 2018). Mas, para realmente compreender bem o ciclo de transmissão desses parasitos, é preciso considerar também, aspectos ambientais, climáticos e antrópicos (HANSSON et al., 1988).

A utilização do solo, dos recursos hídricos, aliados, ao avanço da agricultura, pecuária e a fragmentação de habitats influenciam significativamente na prevalência e distribuição dos parasitos, servindo como indicadores alarmantes da saúde ecológica, humana e da vida urbana e silvestre (DASZAK et al., 2000). Nesses ambientes, parasitos transmitidos por vetores como *Leishmania* spp. e *Rickettsia* spp., têm se reproduzido intensamente em animais selvagens (TOMASSONE et al., 2018). São fatos, que tornam imprescindível a implementação de programas de vigilância e controle que integrem a saúde animal, humana e ambiental, promovendo abordagens holísticas como a proposta de “Saúde Única” (One Health) (KALMÁR et al., 2023).

Para garantir a eficácia dessas iniciativas, é preciso investir em estratégias de educação e conscientização da população sobre a importância da conservação dos

habitats naturais e a prevenção de doenças zoonóticas (GONTIJO & MELO 2004). Além disso, a aplicação de políticas públicas que promovam a sustentabilidade ambiental e a proteção da biodiversidade, são essenciais para minimizar os impactos negativos da urbanização e das atividades humanas sobre a fauna e os ecossistemas (FAILLOUX et al., 2015). Tendo em vista, que o cuidado com a preservação do meio ambiente e da saúde animal são pontos chave para o bem-estar de espécies silvestres, que vivem próximas ou dentro das cidades, assim como à humanos em contato com as mesmas (CLEAVELAND et al., 2002).

### 3.1.1 Gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*)

O gambá é um marsupial considerado importante dispersor de sementes, podendo assim, auxiliar na manutenção ecológica e na preservação de árvores nativas ameaçadas pelo desmatamento (TALAMONI e DIAS 1999). Possuindo, hábito generalista que lhe confere certa versatilidade de adaptação, essa espécie amplia sua distribuição geográfica, se fazendo presentes em certas regiões após a chegada do homem, sendo portanto comumente encontrado adaptado às áreas antropizadas, o que o torna um animal sinantrópico (ALÉSSIO et al., 2005). A aproximação destes animais às residências e fazendas, certamente ocorre pela fácil obtenção de recursos que favorecem sua alimentação e reprodução (CÁCERES et al., 2002; PARERA, 2002). A presença de gambás nas áreas residenciais tem seus aspectos positivos, uma vez que desenvolvem uma importante função nos serviços ecológicos participando no controle de algumas variedades de pragas, pois, costumam se alimentar de baratas, aranhas, serpentes, escorpiões e carapatos (CÁCERES et al., 2002), inclusive o carapato da espécie *Amblyomma sculptum*, vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, que com sua picada transmite febre maculosa em humanos, uma grave doença que pode levar à óbito (COTES-PERDOMO et al., 2023, HORTA et al., 2010).

Por sua facilidade de adequação em uma grande variedade de habitats, o gambá-de-orelha-branca tornou-se uma espécie que se dispersou pela América do Sul, estando presentes desde a Colômbia e Guiana Francesa até o norte da Argentina, exceto na bacia amazônica (CERQUEIRA e TRIBE, 2007). No Brasil, é encontrado principalmente nas regiões nordeste, centro-oeste e sul do país. Na natureza são encontrados em florestas, savanas, cerrados, campos e regiões com presença de

bacias hidrográficas (CÁCERES et al., 2002; FLORES, 2007). E são considerados com baixo risco de extinção, porém, é um dos animais nativos com maior índice de atropelamento nas rodovias brasileiras (ICMBio, 2018).

Por ter hábitos solitários e noturnos, os *D. albiventris* costumam sair pela noite em busca de alimentos (CASSELÀ e CASSERES, 2006; MACHADO et al., 2010). Durante o dia, procuram abrigo em troncos ocos de árvores ou tocas. E em áreas urbanas, costumam se refugiar dentro das residências, principalmente nos forros (TALAMONI e DIAS, 1999). Mesmo sendo animais predominantemente terrestres, sobem em árvores em busca de alimento e proteção. Seu hábito alimentar onívoro e generalista, permite uma dieta composta por frutos, flores, invertebrados, pequenos vertebrados, néctar, goma de árvores e ocasionalmente por animais em decomposição (PAGLIA et al., 2012). Alguns indivíduos, que vivem próximos a centros urbanos consomem também restos de alimentos produzidos por humanos (TALAMONI e DIAS, 1999). No entanto, a busca por alimento varia muito, pois depende dos recursos do ambiente, da palatabilidade, do retorno energético e do forrageamento (LESSA; GEISE, 2010).

Os gambás-de-orelha-branca são animais de médio porte, podendo atingir de 30 a 44 centímetros de comprimento, com cauda variando entre 30 e 49 centímetros e massa corporal entre 500 g e 2,8 kg (EMMONS e FEER, 1997). Possuem cauda longa e preênsil, coberta por pelos até a metade, enquanto que sua extremidade é nua (AURICHO, 2006, SIGRIST, 2012). Suas características externas ainda incluem orelhas brancas e pelagem grisalha no dorso, com pelos negros nas extremidades e três faixas pretas na cabeça, sendo uma central (THOMAS et al., 2016).

As espécies do gênero *Didelphis* são muito resistentes e altamente capazes de se adaptar aos ambientes urbanos e periurbanos (ALMEIDA et al., 2008). No entanto, nesses novos ambientes, seu comportamento natural de animal silvestre é afetado pelas mudanças, elevando sua suscetibilidade a infecções por parasitos e colocando em risco sua saúde e a de outros, e uma vez, que entra em contato com animais domésticos favorece a disseminação entre as diferentes espécies (MALTA e LUPPI, 2006). Inicialmente, a infecção por *Leishmania* spp. era registrada com predominância em animais silvestres, entre os quais estão roedores, primatas, procionídeos, ungulados e os marsupiais (SHAW, 2003). Atualmente, com a redução dos habitats naturais e a presença da fauna silvestre nos centros urbanos, a infecção por *Leishmania* spp. tem se expandido com mais rapidez para as áreas periurbanas e

urbanas (WHO, 2002). Visto que, o contato frequente de animais silvestres como o gambá-de-orelha-branca com animais domésticos, e o encontro com flebotomíneos nesses espaços, pode estar contribuindo para esse processo, favorecendo a disseminação da infecção (QUINTAL et al., 2011).

### **3.2 *Leishmania* spp.**

A leishmaniose é uma doença infecciosa parasitária sistêmica grave e vetorial causada por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que afeta tanto animais quanto seres humanos (NESS et al., 2022). A cada ano, aumenta o número de novos casos descritos e notificados, gerando grandes problemas de saúde pública em diversas regiões (DE CAMARGO et al., 2006). Esse número tende a aumentar, se acrescentar os casos não diagnosticados ou não notificados. Na América Latina, o Brasil é o país com o maior número de registros de casos humanos, sendo associados a várias espécies de *Leishmania* (NINA et al., 2023).

As leishmanias compõem dois grandes grupos: o grupo das que causam a leishmaniose tegumentar (leishmaniose cutânea, mucocutânea e cutânea difusa), e o grupo das que causam a leishmaniose visceral (que acomete fígado, baço, e medula óssea) (CLEMENTE et al., 2018). Sendo o grupo da leishmaniose visceral composto pelas leishmanias do complexo *Leishmania donovani*, que compreende *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* (CAMARGO-NEVES, 2007).

Tanto animais silvestres quanto sinantrópicos e domésticos podem ser infectados, tornando-se possíveis hospedeiros e/ou reservatórios de diversas *Leishmania* spp. O *D. albiventris* inspira preocupação, pois pode assumir um papel significativo nesse ciclo, já que se adapta tanto a ambientes selvagens quanto a áreas peridomésticas rurais e urbanas. Sua constante movimentação na interface urbano-florestal, e sua ampla distribuição pode favorecer a manutenção e transmissão da *Leishmania* spp. no ciclo peri-domiciliar em muitas regiões, expondo a população humana e seus animais ao risco de infecção (CARDOSO, 2015).

Nos animais domésticos, especialmente em cães, é possível observar reações clínicas exacerbadas fazendo dos cães um modelo valioso para o estudo das lesões da Leishmaniose Visceral (LV) (REIS et al., 2009; SANTANA et al., 2018; SILVA et al., 2012; ANDRADE et al., 2014; LIMA et al., 2014). Em humanos, os diferentes padrões de resposta inflamatória no fígado estão associados à manutenção ou

resistência ao tratamento da LV (DUARTE et al., 2008). Alguns pacientes apresentam hipertrofia e hiperplasia celular, com macrófagos infiltrados por células mononucleares no parênquima hepático, além de fibrose pericelular (DUARTE et al., 1987; EL HAG et al., 1994).

Alterações hepáticas semelhantes às encontradas em humanos também são observadas em cães com a infecção por *Leishmania* spp. Nesses animais, podem ser identificadas alterações inflamatórias, com hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer (GIUNCHETTI et al., 2008). Além disso, na pele, os achados histopatológicos indicam inflamação moderada ou nodular, acompanhada de infiltrado inflamatório, independentemente da presença de parasitos ou da evidência de infecção (DOS SANTOS et al., 2004). À medida que o parasito se dissemina pelo organismo, os gânglios linfáticos, são os primeiros tecidos linfoides a serem afetados, e estes tornam-se indicadores importantes para entender o processo de infecção (COSTA et al., 2018).

No baço, a alteração mais evidente é a esplenomegalia e a presença de macrófagos infectados por *Leishmania* spp. em seus compartimentos. Algumas alterações incluem granulomas associados, periesplenite e mudanças progressivas nas populações de leucócitos (ANDRADE e ANDRADE, 1966; SANTANA et al., 2008). Com o desenvolvimento da infecção, o organismo enfrenta alterações mais significativas, como a reatividade linfoide no baço, que pode levar ao rompimento do tecido (POULAKI, PIPERAKI e VOULGARELIS, 2021).

### 3.2.1 Leishmaniose em gambás

Estudos de infecção natural e experimental com espécies zoonóticas de *Leishmania* spp. em *Didelphis* spp., confirmam a participação desses marsupiais nos ciclos de transmissão da *Leishmania* spp., em âmbitos silvestres e peridomiciliares urbanos (BEZERRA-SANTOS et al., 2021).

Flebotomíneos fêmeas infectadas podem transmitir o parasito ao se alimentar do sangue de gambás e de outros hospedeiros suscetíveis, incluindo humanos, cães e gatos (BAUM et al., 2013; MACEDO-SILVA et al., 2014). Assim como os outros animais, os gambás utilizados como fonte de alimento, podem tornar-se hospedeiros e intermediários na transmissão da *Leishmania* spp. para humanos, cães e outros

animais em áreas silvestres, rurais e também urbanas (CARRANZA-TAMAYO et al., 2016).

Na dinâmica de transmissão de doenças, o ambiente desempenha um papel determinante, com diversos fatores influenciando a propagação e a ocorrência de patógenos. Entre esses fatores, destacam-se a paisagem, os tipos de habitat, as barreiras geográficas e os fatores antropogênicos. Mudanças no uso da terra, por exemplo, podem ter implicações significativas para a abundância e a distribuição desses parasitos (VANWAMBEKE et al., 2007). Além disso, a urbanização altera as condições ambientais de maneira a modificar padrões de paisagem, o que favorece a disseminação de doenças e afeta a transmissão e a prevalência de patógenos (GILOT-FROMONT et al., 2012; CARVER et al., 2012).

Os patógenos prevalentes em ambientes urbanizados impactam as populações animais significativamente nestes locais intensamente reduzidos, já que ali, as densidades populacionais de algumas espécies podem ser muito mais altas do que em áreas silvestres rurais. O que explica porque as espécies de *Leishmania spp.* têm se espalhado com mais e maior facilidade em áreas urbanas, onde as interações são mais intensas entre animais silvestres e domésticos favorecendo sua disseminação (DASZAK et al., 2000; POWER et al., 2004).

Embora seja relevante compreender as alterações patológicas em gambás naturalmente infectados por *Leishmania*, a literatura sobre o tema ainda é escassa, especialmente no que se refere às descrições das lesões observadas, que são, em sua maioria, baseadas em estudos experimentais e desatualizados. Em estudos experimentais, gambás infectados com *L. donovani* (ou *L. infantum*) apresentaram macrófagos carregados de amastigotas em fígado, baço e linfonodos, e todos os 13 animais morreram em 32 dias (WHITE et al., 1989b). Em outro estudo, a infecção por *Leishmania* também resultou na presença de amastigotas nos órgãos, e embora o tratamento leishmanicida tenha suprimido os parasitos, a doença foi fatal para os animais (WHITE et al., 1989a).

Recentemente, a abordagem saúde única tem ampliado a análise da epidemiologia da leishmaniose, considerando uma perspectiva mais abrangente de estudos e resultados (PALATNIK-DE-SOUZA e DAY 2011). Porém, é necessário expandir a pesquisa não apenas sobre as características de um único patógeno em uma única espécie, mas também sobre a propagação de patógenos entre diferentes espécies. Por isso, mesmo sendo em pequena escala, além dos gambás, outros

animais também têm sido investigados quanto ao seu papel na transmissão da doença (ROQUE et al., 2010). Esta abordagem integrada, é extremamente necessária para uma compreensão mais ampla das dinâmicas epidemiológicas, e para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle e prevenção de doenças em ambientes naturais e antropizados (LEWIS et al., 2017).

### **3.3 Avaliação da saúde dos animais silvestres**

Os conceitos de saúde animal e a definição de parâmetros de referência para o que é considerado "normal" estão intimamente ligados à compreensão e ao monitoramento da saúde dos animais. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a saúde animal vai além da ausência de doenças, abrangendo aspectos como bem-estar físico e mental, incluindo nutrição adequada, ausência de estresse crônico e oportunidades de interação social (OMS, 2020). Embora essa definição seja amplamente aplicável a animais domésticos e de produção, sua extensão aos animais silvestres requer considerações específicas, dado que suas condições de vida e interação com o ambiente natural são significativamente diferentes. Para avaliar a saúde desses animais, é essencial estabelecer valores de referência para parâmetros bioquímicos e fisiológicos, frequentemente chamados de valores "normais", que variam entre espécies e são influenciados por fatores como métodos de coleta e condições ambientais (TRYLAND, 2006).

A definição de "normal" deriva da norma latina, significando guia ou regra, e é extremamente importante na interpretação de dados de saúde animal, pois permite distinguir entre estados saudáveis e patológicos. Esses valores de referência ajudam a identificar condições de saúde, e fornece dados que são essenciais para o monitoramento contínuo da saúde e do ambiente de vida selvagem (DOSOO et al., 2012). A coleta de dados abrange não apenas animais doentes, mas também indivíduos saudáveis, apresentando uma visão abrangente do estado de conservação e saúde das populações selvagens (TRYLAND, 2006).

Portanto, para garantir a sustentabilidade ambiental e a saúde pública, é imprescindível a adoção de uma abordagem integrada, que inclua o monitoramento regular, a gestão eficaz e a prevenção de doenças em animais selvagens. Isso não apenas mantém a biodiversidade e o equilíbrio dos ecossistemas, mas também ajuda na identificação de desequilíbrios, que possam indicar problemas de saúde ou

ambientais, mais amplos (COX, 2001; ARAÚJO et al., 2003; RYSER-DEGIORGIS, 2013).

É fato, que os animais silvestres sofrem com a influência do ambiente externo sobre o local em que vivem, e a saúde desses animais pode ser avaliada com base na capacidade de adaptação às mudanças a que são submetidos (STEPHEN, 2014). Essas mudanças, resultantes tanto de ações antrópicas quanto de fenômenos naturais, refletem de diversas formas nos indivíduos e nas populações. Nos indivíduos, os impactos podem ser observados por meio de sinais clínicos, medidas corporais ou análises laboratoriais. Já em nível populacional, os reflexos podem incluir alterações no comportamento reprodutivo, mudanças no relacionamento com o habitat e variações em parâmetros demográficos, como densidade populacional e distribuição (PACIONI et al., 2013; MACEDA-VEIGA et al., 2015; MAYOR et al., 2017).

Para a medicina veterinária e para a biologia, duas ferramentas de grande importância para a realização do monitoramento da saúde de animais silvestres, são os exames de hematologia e bioquímica sérica. Com o auxílio da hematologia, é possível observar sinais da presença de infecções e inflamações por meio da contagem celular, assim como a presença de anemia, por meio da avaliação dos níveis de hemácia, hematócrito e hemoglobina (MACEDA-VEIGA et al., 2015).

Com a utilização da bioquímica sérica, obtém-se dados que se podem quantificar analitos presentes no plasma sanguíneo, tornando possível realizar com maior precisão o diagnóstico de possíveis doenças metabólicas, presentes em tecidos e órgãos específicos. Assim, ao avaliar os resultados, juntamente com as informações quantitativas (região, espécies, sexo e idade), se contribui para a criação do perfil clínico e nutricional destes animais (DE MACEDO et al., 2021). Para a realização da interpretação dos resultados dos exames hematológicos e bioquímicos, leva-se em conta o intervalo de referência para as diferentes espécies, este padrão é obtido com os valores de 95% dos animais saudáveis da população avaliada (FRIEDRICHES et al., 2012).

No entanto, a quantidade reduzida de estudos, acerca dos perfis hematológicos e bioquímicos das espécies de mamíferos silvestres, dificulta interpretar e padronizar os valores de referência, seja pela dificuldade da logística para obtenção de amostras, transportes e realização das avaliações ou devido ao fato de muitos dos dados obtidos serem de animais em situação de cativeiro (CAMPBELL, 2015).

### 3.3.1 Análises bioquímicas e hematológicas

Para avaliar a saúde de animais, é indispensável o uso do teste de hemograma, uma vez que este fornece várias informações como a presença de infecções, condições nutricionais e outros importantes indicadores de saúde. O hemograma permite obter variáveis hematológicas e químicas presentes no sangue, que são fundamentais para uma análise detalhada (GAJBHIYE e AATE, 2023). Esse teste é usado principalmente para a detecção de anemia, que muitas vezes está associada a distúrbios secundários decorrentes de causas primárias como a leishmaniose (MAZET et al., 2000; TRUMBLE et al., 2006).

Através do eritrograma, é possível observar a série vermelha do sangue e avaliar grau, tipo e causa da anemia. Uma das etapas dessa avaliação é a estimativa do tamanho das hemácias, utilizando o índice hematimétrico: Volume Globular Médio (VGM) ou Volume Corpuscular Médio (VCM). Outros índices essenciais incluem a Concentração de Hemoglobina (Hb), Contagem Global de Hemácias (CGH) e Hematócrito (Ht). Os parâmetros como níveis de bilirrubina total, hemoglobina, contagem de neutrófilos e plaquetas ajudam a identificar possíveis causas da anemia. A contagem de hemácias, determina a quantidade de hemácias no volume sanguíneo, enquanto que o hematócrito, indica o percentual ocupado pelas hemácias no sangue (TIETZ, 2008; NUNES, 2023).

O leucograma, parte do hemograma, é uma ferramenta essencial para avaliar a série branca do sangue, composta pelos leucócitos, células fundamentais na defesa imunológica. Essa análise auxilia na identificação de alterações patológicas que comprometem as defesas do organismo, como a leucopenia, caracterizada pela redução do número de leucócitos no sangue, muitas vezes associada a infecções ou outras condições. Por outro lado, a leucocitose, definida pelo aumento da contagem de leucócitos, pode ter diversas causas, desde processos infecciosos até estresse físico ou emocional intenso, além de doenças malignas e não malignas (LATIMER E RAKICH, 1989).

Além de avaliar a contagem total de leucócitos (Le), o leucograma permite a análise diferencial das diferentes subpopulações de glóbulos brancos como neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, basófilos e monócitos. Cada uma dessas células possui funções específicas na resposta imunológica, e pode apresentar alterações características em diferentes infecções. No contexto da leishmaniose, os monócitos

podem ser de particular interesse, pois essas células fagocitárias desempenham um papel central na resposta inflamatória ao parasito. A presença aumentada ou alterada de monócitos na corrente sanguínea pode ser um indicativo de processos inflamatórios e imunológicos relacionados à infecção (TIETZ, 2008; NDREPEPA, 2021).

Na bioquímica sérica, diversas alterações observadas em rins e fígado (KANEKO, 1989; KIM; WYCKOFF, 1991), são detectadas pelos indicadores enzimáticos de funcionamento destes órgãos. Marcadores como ureia e creatinina elevados indicam comprometimento renal, enquanto que as enzimas hepáticas TGP e a fosfatase alcalina, podem apresentar elevações devido a lesões hepáticas e inflamações associadas às parasitoses (NUNES, 2023; JOHNSON, 2012). A observação dessas alterações é importante para o diagnóstico e monitoramento das doenças (MILLÁN, 2006).

As enzimas transaminases são encontradas em vários tecidos, principalmente no fígado, desempenhando a importante função de transferir grupos amina entre aminoácidos e cetoácidos (ALVIM et al., 2022). A transaminase pirúvica (TGP) é uma enzima predominante no citoplasma das células hepáticas, e está presente em menor quantidade nos rins, coração, musculosqueléticos, pâncreas e eritrócitos (KUMAR, 2018). A enzima transaminase oxalacética (TGO) se encontra presente tanto no citoplasma quanto nas mitocôndrias, e em diversos tecidos, como musculosqueléticos, rins e cérebro, com uma concentração especialmente alta no coração e no fígado (BARBOSA, 1997; TIETZ, 2008).

Enzimas como a TGO e TGP apresentam elevações nos níveis séricos quando a integridade celular hepática é comprometida, sendo a TGP mais específica para o fígado (SRIVASTAVA et al., 2007). Em alta concentração hepática, a TGP é liberada na corrente sanguínea em resposta a lesões celulares, o que geralmente indica dano hepático. O aumento da TGP tende a persistir por mais tempo do que o aumento da TGO. Esse processo possivelmente resulta de dano tecidual direto, como a lesão da membrana plasmática, que leva ao extravasamento de proteínas, ou à necrose celular. Quadros inflamatórios e lesões hepáticas podem desencadear o aumento simultâneo dos níveis séricos de TGP e TGO no organismo (NDREPEPA, 2021; ALVIM et al., 2022).

A fosfatase alcalina (FA) é uma glicoproteína dimérica com função hidrolítica, que atua na remoção de grupamentos fosfato de diversas moléculas, catalisando a

hidrólise de fosfomonoésteres em pH alcalino. Classificada como uma ectoenzima, a FA está amplamente distribuída no organismo com significativa presença no fígado, intestino, placenta, rins e ossos de mamíferos. No fígado, a FA é especialmente concentrada nos canalículos biliares. Essa enzima desempenha valioso papel nas células epiteliais intestinais, por estar envolvida na manutenção da integridade da barreira intestinal e na defesa contra microrganismos patogênicos. A FA se apresenta em várias isoformas, incluindo óssea, intestinal, hepática, placentária e renal (KANEKO, 1989; KIM; WYCKOFF, 1991; MILLÁN, 2006; FISHER et al., 2001; KÜHN et al., 2020; NUNES, 2023).

As análises de ureia e creatinina são amplamente reconhecidas, como os principais biomarcadores para a avaliação da função renal (ANDRADE et al., 2017). A creatinina, formada pela desidratação da creatina e fosfocreatina no tecido muscular, é excretada pelos glomérulos renais, sendo um indicador-chave do funcionamento renal (MORAES, 2013). Sua produção é constante e diretamente proporcional à massa muscular, mas seus níveis podem variar devido à função renal, dieta e condições de saúde. Níveis elevados podem indicar insuficiência renal, desidratação, aumento da ingestão de proteínas ou doenças musculares (MACHADO et al., 2019).

O produto final do metabolismo das proteínas é a ureia, que reflete a função renal por meio de sua excreção pelos rins. Níveis séricos elevados de ureia podem sugerir insuficiência renal, desidratação ou uma dieta rica em proteínas, além de estarem associados a outras condições, como insuficiência cardíaca congestiva (SINGH et al., 2014). A medição combinada de ureia e creatinina é amplamente utilizada como teste de função renal, sendo que a relação entre essas substâncias auxilia na diferenciação entre causas pré-renais e pós-renais, para o aumento dos resíduos nitrogenados não proteicos (SALAZAR, 2014). Na leishmaniose, ambos os marcadores podem apresentar elevações devido ao comprometimento renal, uma vez que a infecção pode desencadear glomerulonefrite, resultando em insuficiência renal (RIGO et al., 2013; DE ALCÂNTARA et al., 2018). Clinicamente, o aumento de ureia e creatinina indica uma redução na capacidade dos rins de filtrar e excretar os resíduos do sangue, sinalizando um agravamento da função renal (FREITAS et al., 2012).

A liberação da creatina quinase (CK) do tecido para o sangue está associada à ruptura da membrana das células musculares. Após uma lesão, a CK não entra

diretamente na corrente sanguínea, em vez disso, ela é liberada para a linfa através do fluido intersticial, e eventualmente, chega à circulação sanguínea. É uma enzima com predominância no cérebro, no musculoesquelético e no coração (AUJLA; PATEL, 2022). Atualmente, a concentração plasmática de CK é amplamente utilizada como um método para avaliar o estresse físico. Embora a CK seja um dos principais indicadores bioquímicos estudados para detectar lesões musculares, também está sendo empregada na prevenção de tais lesões. Assim, os níveis elevados de CK no plasma sanguíneo, podem indicar a presença de danos nas fibras musculares (ABREU et al., 2015).

Em relação às proteínas plasmáticas, seu aumento pode ocorrer em casos de desidratação devido à perda de líquidos, e em resposta à estimulação do sistema imunológico como em situações de vacinação, doenças autoimunes e inflamação crônica (CAMPÉLO, 2008). A hiperproteinemia, associada à resposta imune inflamatória, pode levar à hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, reagindo então, com um aumento de proteínas no sangue (ECKERSALL, 2008).

No organismo humano, a principal proteína circulante é a albumina, que desempenha funções vitais como o transporte de substâncias, medicamentos, e contribui significativamente para a manutenção da pressão coloidosmótica do plasma (MAZZAFERRO e EDWARDS, 2020). O fígado é o único órgão responsável pela produção da proteína de albumina, uma das menores e mais abundantes no plasma. Essa proteína é essencial para a correta distribuição dos líquidos corporais entre os compartimentos intravascular e extravascular. Quando encontrada em níveis baixos, sua causa pode ser por conta de síndrome nefrótica, doenças hepáticas ou perda de proteínas através dos rins. (DIAZ GONZALEZ & SCHEFFER, 2003; SOUZA, 2019).

A concentração de globulinas pode ser calculada, subtraindo a quantidade de albumina da concentração total de proteínas séricas (ECKERSALL, 2008). A redução nos níveis de globulinas pode ser decorrente de imunodeficiências, tanto congênitas quanto adquiridas (RAMASAMY, 2023). Já a hiperglobulinemia, pode surgir em casos de desidratação ou em resposta a processos inflamatórios, devido ao aumento de proteínas de fase aguda. A elevação das imunoglobulinas é provocada por estímulos抗gênicos em inflamações crônicas ou como resultado de distúrbios linfoproliferativos (JOHNSON, 2012).

Na leishmaniose, é comum encontrar o aumento de proteínas totais, atribuído ao incremento das globulinas que estão associadas à resposta imune crônica (ALI,

2013). Paralelamente, a albumina pode apresentar níveis reduzidos devido à perda de proteínas pelos rins, característica da síndrome nefrótica ou o comprometimento hepático na produção de proteínas (WANG, XING e ZHANG, 2019). O desequilíbrio entre albumina e globulinas resulta em uma relação invertida, com globulinas elevadas e albumina baixa (CASTRO et al., 2012).

As alterações bioquímicas refletem em processos como inflamação crônica, comprometimento hepático e lesão renal, destacando a complexidade da resposta inflamatória sistêmica à infecção (CIARAMELLA et al., 2005; FREITAS et al., 2012; SILVA et al., 2018). A correlação entre os sinais clínicos da leishmaniose como alopecia, anemia, desidratação e as alterações laboratoriais contribui para uma compreensão mais detalhada dos efeitos sistêmicos da infecção (LIMA et al., 2014; DA SILVA et al., 2018).

### 3.3.2 Técnicas de diagnóstico de *Leishmania* spp.

A leishmaniose é uma doença sistêmica grave, com alta letalidade, e sua manifestação clínica depende muito da resposta imunológica de cada indivíduo à infecção e da forma como ela evolui em seu organismo. Por ser difícil diagnosticá-la, além da avaliação clínica, o diagnóstico pode ser complementado por exames laboratoriais, como os testes de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA), que detectam os níveis de anticorpos circulantes a partir do soro sanguíneo (PEREZ, 2015).

O diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp. é desafiador, devido às suas manifestações clínicas que se assemelham com as de outras enfermidades infecto-contagiosas. Além disso, alguns animais podem ser assintomáticos ou apresentar sintomas inespecíficos, aumentando o risco de resultados falso negativos (SRIVASTAVA et al., 2011). Para um resultado mais preciso, é necessário recorrer ao diagnóstico molecular, que permite a detecção do material genético do parasito. Essa abordagem oferece uma identificação mais rápida e dependendo do teste utilizado, pode ser mais sensível e específica em comparação a outros métodos, além da capacidade de caracterizar os microrganismos envolvidos na infecção. Assim, por meio de diferentes amostras clínicas, é possível distinguir qual espécie infectou o animal (LACHAUD et al. 2002, SCHÖÖNIAN et al. 2003, SARAIVA et al. 2010).

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) desempenha um papel determinante no diagnóstico molecular da *Leishmania* spp., oferecendo alta sensibilidade e especificidade na detecção do DNA do parasito. Um dos alvos mais utilizados é o DNA do cinetoplasto (kDNA), uma região repetitiva e abundante no genoma da *Leishmania* spp., que facilita a amplificação mesmo em amostras com baixa carga parasitária (FERREIRA et al., 2010). A identificação do kDNA permite distinguir diferentes espécies de *Leishmania* spp., o que é essencial para o manejo clínico e terapêutico da doença. O uso de amostras clínicas como sangue, aspirado de linfonodos e medula óssea torna o método versátil e aplicável em diversos estágios da infecção (BIGELI et al., 2012).

Após a amplificação pela PCR, a identificação da espécie de *Leishmania* spp. pode ser complementada pelo sequenciamento do DNA amplificado, aumentando a precisão do diagnóstico em estudos laboratoriais e pesquisas epidemiológicas. Contudo, é importante considerar que, dependendo dos primers utilizados, o sequenciamento pode ser desnecessário em algumas situações, especialmente em contextos clínicos, onde a rapidez do diagnóstico é essencial para a tomada de decisão (DE ALMEIDA et al., 2011). Embora a PCR e o sequenciamento ofereçam alta sensibilidade e especificidade, sua aplicação ainda enfrenta desafios relacionados à infraestrutura laboratorial e custos. Mas ainda que seja desafiador, é imprescindível o uso desses métodos que são tão valiosos para a detecção precoce e a caracterização do parasito em casos assintomáticos ou com manifestações clínicas inespecíficas, contribuindo dessa forma, para a redução de diagnósticos falsos-negativos (ALBUQUERQUE et al., 2017; CASTRO et al., 2020).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, D. G.; FERNANDES, B. F. Níveis de CK e sua relação com o desgaste físico em uma temporada de futebol. *FIEP Bulletin*, v. 85, n. 2, 2015.

ALBUQUERQUE, Andreia et al. Evaluation of four molecular methods to detect *Leishmania* infection in dogs. *Parasites & Vectors*, v. 10, p. 1–5, 2017.

ALMEIDA, Alex J. de; TORQUETTI, Camila G.; TALAMONI, Sônia A. Use of space by neotropical marsupial *Didelphis albiventris* (*Didelphimorphia: Didelphidae*) in an urban forest fragment. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 25, p. 214–219, 2008.

ALVIM, Marta et al. Estudo para a determinação dos valores de referência das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama-glutamil transferase (GGT) no soro. *Boletim Epidemiológico Observações*, v. 11, n. 31, p. 44–48, 2022.

ANDRADE, Daniela Marini de et al. Análise das concentrações de ureia e creatinina em soro e plasma com ácido etilenodiamino tetra-acético e citrato de sódio. *RBAC*, v. 49, n. 3, p. 268–274, 2017.

ANDRADE, Juvana M.; MURTA, Silvane M. F. Functional analysis of cytosolic tryparedoxin peroxidase in antimony-resistant and susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* lines. *Parasites & Vectors*, v. 7, p. 1–9, 2014.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. Some new aspects of the kala-azar pathology. Morphologic study of 13 autopsy cases. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 8, p. 259–266, 1966.

ARAÚJO, A. et al. Parasitism, the diversity of life, and paleoparasitology. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 5–11, 2003.

AUJLA, Ravinder; PATEL, Roshan. Creatine phosphokinase. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

AURICHO, A. L.; AURICHO, P. A. Guia para mamíferos da Grande São Paulo. São Paulo: Instituto Pau Brasil de História Natural/Terra Brasilis, 2006. 162 p.

BARBOSA, Patricia Medeiros de Souza Pena. Efeitos do metronidazol sobre a atividade enzimática da ALT (Alanina aminotransferase) e AST (Aspartato aminotransferase) em ratos. 1997.

BARRETO, W. T. G. et al. Density and survivorship of the South American coati (Procyonidae: *Nasua nasua*) in the urban area of Campo Grande, Central-Western Brazil. *Hystrix Italian Journal of Mammalogy*, v. 32, n. 1, p. 82–88, 2021.

BAUM, M.; DA COSTA RIBEIRO, M.; LOROSA, E.; DAMÁSIO, G.; CASTRO, E. Comportamento alimentar eclético de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na área de transmissão da leishmaniose tegumentar americana, estado do Paraná, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 46, n. 5, p. 560–565, 2013. DOI: 10.1590/0037-8682-0157-2013.

BELDOMENICO, Pablo Martín et al. Condição do hospedeiro e risco individual de infecção pelo vírus da varíola bovina em populações naturais de animais: causa ou efeito? *Epidemiologia & Infecção*, v. 137, n. 9, p. 1295–1301, 2009.

BEZERRA-SANTOS, M. A. et al. *Didelphis* spp. opossums and their parasites in the Americas: A One Health perspective. *Parasitology Research*, v. 120, n. 12, p. 4091–4111, dez. 2021. DOI: 10.1007/s00436-021-07072-4.

BIGELI, J. G.; OLIVEIRA JÚNIOR, W. P. D.; TELES, N. M. M. Diagnosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 1, p. 18–23, 2012.

CÁCERES, N. C. Food habits and seed dispersal by the white-eared opossum, *Didelphis albiventris*, in Southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, v. 37, p. 97–104, 2002.

CAMARGO-NEVES, Vera. A leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo: situação atual. *BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista*, v. 4, n. 48, p. 12–14, 2007.

CAMPBELL, T. W. Bioquímica clínica dos mamíferos animais de laboratório e espécies variadas. In: THRALL, M. A. et al. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. São Paulo: Editora Roca, 2015.

CAMPÊLO, S. C. A. J. Perfil bioquímico sérico de éguas gestantes e não gestantes das raças Brasileiro de Hipismo e Bretão. 2008. 75 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2008.

CARDOSO, Rebecca Martins et al. Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. *Parasites & Vectors*, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2015.

CARRANZA-TAMAYO, C. O.; WERNECK, G. L.; ROMERO, G. A. S. Are opossums a relevant factor associated with asymptomatic *Leishmania* infection in the outskirts of

the largest Brazilian cities? *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 20, p. 119–126, 2016. DOI: 10.1016/j.bjid.2015.11.013.

CARVER, S. et al. Zoonotic parasites of bobcats around human landscapes. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 9, p. 3080–3083, set. 2012. DOI: 10.1128/JCM.01558-12.

CASELLA, J.; CÁCERES, N. C. Diet of four small mammal species from Atlantic forest patches in South Brazil. *Neotropical Biology and Conservation*, v. 1, n. 1, p. 5-11, 2006.

CASTRO, I. P.; SOUSA, M. V. C.; MAGALHÃES, G. M.; MUNDIM, A. V.; NOLETO, P. G.; PAULA, M. B. C., et al. Perfil hepático e protéico em cães com leishmaniose visceral. *Bioscience Journal*, v. 28, n. 5, p. 799–804, 2012.

CASTRO, L. S.; DORVAL, M. E. C.; MATHEUS, L. M. D.; BEDNASKI, A. V.; FACCO, G. G.; SILVEIRA, M.; SANTOS, C. F.; GONTIJO, C. M. F.; OLIVEIRA, A. P. G.; FERREIRA, E. C. *Leishmania* presence in bats in areas endemic for leishmaniasis in central-West Brazil. *International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife*, v. 11, p. 261–267, 2020. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2020.02.008.

CERQUEIRA, R.; TRIBE, C. J. Genus *Didelphis Linnaeus*. In: GARDNER, A. L. (Ed.). *Mammals of South America. Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats*. Chicago: The University of Chicago Press, 2007. p. 17–25.

CIARAMELLA, P.; PELAGALLI, A.; CORTESE, L.; PERO, M. E.; CORONA, M.; LOMBARDI, P.; et al. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Journal*, v. 169, n. 3, p. 465–467, 2005. DOI: 10.1016/j.tvjl.2004.03.009.

CLEAVELAND, Sarah et al. Estimating human rabies mortality in the United Republic of Tanzania from dog bite injuries. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 80, n. 4, p. 304–310, 2002.

CORTES, S. et al. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* sl-specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 98, n. 1, p. 12–17, 2004.

CLEMENTE, W.; MOURÃO, P.; LÓPEZ-MEDRANO, F.; SCHWARTZ, B.; GARCÍA-DONOSO, C.; TORRE-CISNEROS, J. Visceral and cutaneous leishmaniasis recommendations for solid organ transplant recipients and donors. *Transplantation*, v. 102, n. 2S Suppl 2, p. S8–S15, 2018. DOI: 10.1097/TP.0000000000002018.

COSTA, S. F. et al. Eosinophilic inflammation in lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v. 40, n. 8, e12567, ago. 2018. DOI: 10.1111/pim.12567.

- COTES-PERDOMO, Andrea P. et al. Phylogenetic relationships of the *Amblyomma cajennense* complex (Acari: Ixodidae) at mitogenomic resolution. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 14, n. 3, p. 102125, 2023.
- COX, F. E. Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology*, v. 122, p. 23–38, 2001.
- CREMONESI, G. et al. Camera trapping to assess status and composition of mammal communities in a biodiversity hotspot in Myanmar. *Animals*, v. 11, n. 3, p. 880, 2021.
- DA SILVA, A. V. A.; FIGUEIREDO, F. B.; MENEZES, R. C.; MENDES-JUNIOR, A. A.; DE MIRANDA, L. H. M.; CUPOLILLO, E.; et al. Morphophysiological changes in the splenic extracellular matrix of *Leishmania infantum*-naturally infected dogs is associated with alterations in lymphoid niches and the CD4+ T cell frequency in spleens. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, 2018. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006445.
- DA SILVA, Alanderson Rodrigues et al. The relationships among *Leishmania infantum* and phyllostomid bats assessed by histopathological and molecular assays. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, v. 23, p. 100904, 2024.
- DALZOCHIO, T. et al. Water quality parameters, biomarkers and metal bioaccumulation in native fish captured in the Ilha River, southern Brazil. *Chemosphere*, v. 189, p. 609–618, 2017. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.09.089.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. *Science*, v. 287, n. 5452, p. 443–449, 2000. DOI: 10.1126/science.287.5452.443.
- DE ALCÂNTARA, C. et al. Disfunção renal na coinfecção por leishmaniose e doença de Chagas: relato de caso. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 60, 2018. DOI: 10.1590/S1678-9946201860073.
- DE ALMEIDA, M. et al. Identification of spp. by molecular amplification and DNA sequencing analysis of a fragment of rRNA internal transcribed spacer 2. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, p. 3143–3149, 2011. DOI: 10.1128/JCM.01177-11.
- DE CAMARGO, L.; LANGONI, H. Impact of leishmaniasis on public health. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 12, p. 527–548, 2006. DOI: 10.1590/S1678-91992006000400002.
- DE MACEDO, Gabriel Carvalho. Determinação dos intervalos de referência de parâmetros hematológicos e bioquímicos, e suas relações no parasitismo por *Leishmania* spp. e anciostomídeos na saúde de quatis (*Nasua nasua*) de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 2021. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2021.

DIAZ GONZALEZ, F. H.; SCHEFFER, J. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA, 1., 2003, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre, 2003.

DOS SANTOS, W. L. C.; DAVID, J.; BADARÓ, R.; DE-FREITAS, L. A. R. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. *Parasitology Research*, v. 92, p. 89–94, 2004.

DOSOO, D. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos para adultos saudáveis no cinturão médio de Gana. *PLoS ONE*, v. 7, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0036308.

DUARTE, M.; TUON, F.; PAGLIARI, C.; KAUFFMAN, M.; BRASIL, R. Leishmaniose visceral humana expressa padrão Th1 em lesões hepáticas *in situ*. *The Journal of Infection*, v. 57, n. 4, p. 332–337, 2008. DOI: 10.1016/j.jinf.2008.07.005.

ECKERSALL, D. P. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6. ed. Academic Press, 2008. cap. 5, p. 117–155.

EL HAG, I. A. et al. Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). *Journal of Clinical Pathology*, v. 47, p. 547–551, 1994.

EMMONS, L.; FEER, F. *Neotropical rainforest mammals: a field guide*. 2. ed. Chicago: University of Chicago Press, 1997.

ESTRADA-PEÑA, A.; DE LA FUENTE, J. The ecology of ticks and epidemiology tick-borne viral diseases. *Antiviral Research*, v. 108, p. 104–128, 2014. DOI: 10.1016/j.antiviral.2014.05.016.

FAETH, S. H.; BANG, C.; SAARI, S. Urban biodiversity: patterns and mechanisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1223, p. 69–81, 2011. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05925.x.

FAILLOUX, A. B.; MOUTAILLER, S. Zoonotic aspects of vector-borne infections. *Revista de Ciência e Tecnologia*, v. 34, n. 1, p. 175–183, 2015.

FERREIRA, E. C. et al. Alternative PCR protocol using a single primer set for assessing DNA quality in several tissues from a large variety of mammalian species living in areas endemic for leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 7, p. 895–898, 2010. DOI: 10.1590/S0074-02762010000700009.

FISHER, D. O.; OWENS, I. P. F.; JOHNSON, C. N. The ecological basis of life history variation in marsupials. *Ecology*, v. 82, n. 12, p. 3531–3540, 2001.

FLORES, D. A. et al. Systematics and distribution of marsupials in Argentina: a review. In: KELT, D. A. et al. (Eds.). *The Quintessential Naturalist*. California: University of California, 2007. p. 579–669.

FREITAS, J. C. C. et al. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 1, p. 24–29, 2012.

FRIEDRICH, K. R. et al. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 41, n. 4, p. 441–453, 2012.

GAJBHIYE, S.; AATE, J. Análise de relatório de sangue - uma revisão. *Jornal Tropical de Ciências Farmacêuticas e da Vida*, v. 5, p. 63–79, 2023. DOI: 10.61280/tjpls.v10i5.148.

GILOT-FROMONT, E. et al. The life cycle of *Toxoplasma gondii* in the natural environment. In: DJAKOVIC, O. D. (Ed.). *Toxoplasmosis - Recent Advances*. InTech, 2012. p. 2845. DOI: 10.5772/2845.

GIUNCHETTI, R. C. et al. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*, v. 84, p. 269–277, 2008.

HANSSON, L.; HENTTONEN, H. Rodent dynamics as community processes. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 3, p. 195–200, 1988.

HORTA, Mauricio C.; TALAMONI. Infection of the opossum *Didelphis aurita* by *Rickettsia felis*, *Rickettsia bellii*, and *Rickettsia parkeri* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 10, n. 10, p. 959-967, 2010.

HUMBERG, R. M. P.; BONAMIGO, R. A.; CRUZ, M. D. S. P. E.; DE OLIVEIRA, A. G.; HUMBERG, R. M. P.; OSHIRO, E. T.; ALONSO, D. P.; et al. *Leishmania chagasi* in opossums (*Didelphis albiventris*) in an urban area endemic for visceral leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 87, n. 3, p. 470–472, 2012.

ICMBio. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume I. 1. ed. Brasília, DF: ICMBio/MMA, 2018. 492 p. ISBN: 978-85-61842-79-6.

JOHNSON, M. C. Immunologic and Plasma Protein Disorders. In: WILLARD, M. D.; TVEDTEN, H. Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods. 5. ed. Elsevier Saunders, 2012. cap. 12, p. 278-293.

KALMÁR, Z.; SÁNDOR, A. D.; BALEA, A.; BORŞAN, S. D.; MATEI, I. A.; IONICĂ, A. M.; GHERMAN, C. M.; MIHALCA, A. D.; COZMA-PETRUȚ, A.; MIRCEAN, V.; GYÖRKE, A. *Toxoplasma gondii* in small mammals in Romania: the influence of host, season and sampling location. *BMC Veterinary Research*, v. 19, n. 1, 2023. DOI: 10.1186/s12917-023-03729-7. PMID: 37773155; PMCID: PMC10540334.

KANEKO, J. J. Clinical biochemistry of domestic animals. 5. ed. *San Diego: Academic*, 1989. 932 p.

KIM, E. E.; WYCKOFF, H. W. Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures: Two-metal ion catalysis. *Journal of Molecular Biology*, v. 218, n. 2, p. 449-464, 1991.

KÜHN, F. et al. Intestinal alkaline phosphatase targets the gut barrier to prevent aging. *JCI Insight*, v. 5, n. 6, e134049, 2020.

KUMAR, V.; GILL, K. To Determine Alanine and Aspartate Transaminase Activity in Serum. *Springer*, p. 103-106, 2018. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-981-10-8186-6\\_25](https://doi.org/10.1007/978-981-10-8186-6_25).

LACHAUD, Laurence et al. Comparação de seis métodos de PCR usando sangue periférico para detecção de leishmaniose visceral canina. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002.

LATIMER, K.; RAKICH, P. Interpretação clínica de respostas leucocitárias. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, v. 19, n. 4, p. 637-68, 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(89\)50077-9](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(89)50077-9).

LESSA, Leonardo Guimarães; GEISE, Lena. Hábitos alimentares de marsupiais didelfídeos brasileiros. *Oecologia Australis*, v. 14, n. 4, p. 901-910, 2010.

LEWIS, J. S. et al. The effects of demographic, social, and environmental characteristics on pathogen prevalence in wild felids across a gradient of urbanization. *PLoS One*, v. 12, n. 11, e0187035, nov. 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0187035. PMID: 29121060; PMCID: PMC5679604.

LIMA, I. S.; SILVA, J. S.; ALMEIDA, V. A.; LEAL, F. G.; SOUZA, P. A. N.; LARANGEIRA, D. L. Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. *PLoS One*, v. 9, n. 2, p. e87742, 2014.

MACEDA-VEIGA, A. et al. Inside the Redbox: applications of hematology in wildlife monitoring and ecosystem health assessment. *The Science of the Total Environment*, v. 514, p. 322-332, 2015.

MACEDO-SILVA, V. et al. Preferências alimentares de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), o vetor flebotomíneo, para *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 51, p. 237-244, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/ME12131>.

MACHADO, M. R. F. et al. Arco aórtico do saruê (*Didelphis marsupialis* - Linnaeus, 1758). *PUBVET*, Londrina, v. 4, n. 23, 2010.

MACHADO, J. C. DA C.; NAVARRO, F.; NAVARRO, A. C. Revisão sistemática sobre o efeito de whey proteins na função renal de ratos e camundongos em relação a creatinina, ureia, proteinúria e nos glomérulos e túbulos renais. *RBNE - Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, v. 13, n. 81, p. 749-807, 19 set. 2019.

MALTA, M. C. C.; LUPPI, M. M. Marsupialia–Didelphimorphia (gambá, cuíca). In: CUBAS, Z. S. et al. *Tratado de animais selvagens: medicina veterinária*. São Paulo: Roca, 2006. p. 340-357.

MAYOR, P. et al. Assessment of mammal reproduction for hunting sustainability through community-based sampling of species in the wild. *Conservation Biology*, v. 31, n. 4, p. 912-923, 2017.

MAZET, J. K. et al. Avaliação de alterações em valores hematológicos e bioquímicos clínicos após exposição a produtos petrolíferos em visons (*Mustela vison*) como modelo para avaliação de lontras marinhas (*Enhydra lutris*). *Am J Vet Res*, v. 61, p. 1197–1203, 2000.

MAZZAFFERO, E.; EDWARDS, T. Update on Albumin Therapy in Critical Illness. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.07.005>.

MCKINNEY, M. L. Effects of urbanization on species richness: a review plants and animals. *Urban Ecosystems*, v. 11, p. 161-176, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11252-007-0045-4>.

MILLÁN, J. L. Alkaline Phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signalling*, v. 2, n. 2, p. 335-341, 2006.

MOLYNEUX, D. H. Temas comuns em cenários de doenças transmitidas por vetores em mudança. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 97, n. 2, p. 129-132, 2003.

MORAES, L. H. S. Associação entre concentrações séricas de ureia e creatinina em exames bioquímicos de caninos atendidos no HV-UPF. In: MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 23., 2013, Passo Fundo. Anais... Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2013. p. 1-2.

NDREPEPA, G. Aspartate aminotransferase and cardiovascular disease—a narrative review. *Journal of Laboratory and Precision Medicine*, v. 6, 2021.

NESS, T.; MARTIN-BLAIS, R.; WEATHERHEAD, J. How I Approach Leishmaniasis: Diagnosis and Treatment in the United States. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jpids/piac087>.

NINA, L. N. D. S. et al. Distribuição espaço-temporal da leishmaniose visceral no Brasil no período de 2007 a 2020. *Revista Panamericana de Salud Pública*, v. 47, p. e160, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.160>.

NUNES, M. F. O. F. Análise do efeito do tratamento de hemorragia pulmonar induzida pelo exercício com plasma rico em plaquetas sobre a atividade da fosfatase alcalina em lavado traqueal de equinos da raça puro sangue inglês. 2023.

OMS. 49th report of the Programme, Budget and Administration Committee. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2020.

OSTFELD, R. S.; KEEsing, F. Série biodiversidade: a função da biodiversidade na ecologia de doenças zoonóticas transmitidas por vetores. *Canadian Journal of Zoology*, v. 78, n. 12, p. 2061-2078, 2000.

PACIONI, C. et al. Hematologic characteristics of the woylie (*Bettongia penicillata ogilbyi*). *Journal of Wildlife Diseases*, v. 49, n. 4, p. 816-830, 2013.

PAGLIA, A. P. et al. Lista anotada dos mamíferos do Brasil. 2. ed. *Occasional Papers in Conservation Biology*, n. 6, p. 1-82, 2012.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DAY, M. J. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, v. 4, p. 1-10, 2011.

PARERA, A. *Los mamíferos de la Argentina y la región austral da Sudamérica*. Buenos Aires: El Ateneo, 2002. 453 p.

PEREZ, Taliha Dias. A importância dos cães domésticos como reservatório do *Trypanosoma cruzi* e de *Leishmania spp.* na área rural do município de São João do Piauí (PI). Rio de Janeiro, 2015. 155 f.; il. Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2015.

POULAKI, A.; PIPERAKI, E. T.; VOULGARELIS, M. Effects of visceralising *Leishmania* on the spleen, liver, and bone marrow: a pathophysiological perspective. *Microorganisms*, v. 9, n. 4, p. 759, 2021. DOI: 10.3390/microorganisms9040759.

POULIN, R.; COMBES, C. The concept of virulence: interpretations and implications. *Parasitology Today*, v. 15, n. 12, p. 474-475, 1999.

POWER, A. G.; MITCHELL, C. E. Pathogen spillover in disease epidemics. *The American Naturalist*, v. 164, Suppl. 5, p. S79-S89, 2004.

QUINTAL, Amanda Pifano Neto et al. *Leishmania spp.* em *Didelphis albiventris* e *Micoureus paraguayanus* (*Didelphimorphia: Didelphidae*) do Brasil. *Parasitologia Veterinária*, v. 176, n. 2-3, p. 112-119, 2011.

RAMASAMY, I. A single center study investigating clinical outcomes of testing for multiple myeloma and immune deficiency at low globulin levels. *Journal of Blood Medicine*, v. 14, p. 345-358, 2023. DOI: <https://doi.org/10.2147/JBM.S409234>.

RANDOLPH, S. E. Tick-borne disease systems emerge as foreshadows: the beauty lies in molecular detail, the message in epidemiology. *Parasitology*, v. 136, p. 1403–1413, 2009. DOI: 10.1017/S0031182009005782.

REIS, Alexandre Barbosa et al. Resposta imune sistêmica e compartmentalizada na leishmaniose visceral canina. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 128, n. 1-3, p. 87-95, 2009.

RENDÓN-FRANCO, E. et al. Toxoplasmosis seroprevalence in wild small rodents, potentially preys of ocelots in north-eastern Mexico. *Parasite*, v. 21, 2014.

ROQUE, A. L.; CUPOLILLO, E.; MARCHEVSKY, R. S.; JANSEN, A. M. *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a putative reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: patterns of experimental infection. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 4, n. 2, p. e589, 2010. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000589.

RYSER-DEGIORGIS, M. P. Wildlife health investigations: needs, challenges and recommendations. *BMC Veterinary Research*, v. 9, p. 223, 2013.

SALAZAR, José H. Visão geral da ureia e creatinina. *Medicina Laboratorial*, v. 45, n. 1, p. e19-e20, 2014.

SANTANA, C. C.; VASSALLO, J.; DE FREITAS, L. A.; OLIVEIRA, G. G.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; DOS-SANTOS, W. L. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. *Parasite Immunology*, v. 30, n. 10, p. 515-524, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2008.01051.x.

SANTANA, A. P. et al. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: an overview. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 30, n. 1, p. 5-12, 2018.

SARAIVA, Lara et al. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, p. 1033-1039, 2010.

SCHOÖNIAN, G. et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 47, p. 349–358, 2003.

SHAW, J. J. New world leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In: FARREL, J. (Ed.). *World Class Parasites: Leishmania*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. v. 4, p. 11-31.

SHULTZ, L. et al. Vector-Borne Disease in Wild Mammals Impacted by Urban Expansion and Climate Change. *EcoHealth*, v. 20, n. 3, p. 286-299, 2023. DOI: 10.1007/s10393-023-01650-x.

SHWAB, E. K. et al. Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 115, p. E6956–E6963, 2018.

SIGRIST, T. Mamíferos do Brasil: uma visão artística. 1. ed. São Paulo: Avis Brasilis, 2012. 448 p.

SILVA, I. M. et al. Molecular and serological detection of *Leishmania infantum* in dogs in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 188, n. 1-2, p. 137-142, 2012.

SILVA, J. N. DA et al. Immunohaematological and rheological parameters in canine visceral leishmaniasis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 27, n. 2, p. 211–217, 2018.

SINGH, Priti et al. Renal function test on the basis of serum creatinine and urea in type-2 diabetics and non diabetics. *Bali Medical Journal*, v. 3, n. 1, p. 11-14, 2014.

SOUZA, Thais Morais de. Detecção dos níveis séricos de albumina e suas possibilidades de correlação com aspectos clínicos veterinários: uma vivência no laboratório de análises clínicas. 2019.

SRIVASTAVA, A. et al. Blunt abdominal injury: serum ALT-A marker of liver injury and a guide to assessment of its severity. *Injury*, v. 38, n. 9, p. 1069-1074, 2007. DOI: 10.1016/J.INJURY.2007.04.019.

SRIVASTAVA, P.; DAYAMA, A.; MEHROTRA, S.; SUNDAR, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 105, n. 1, p. 1-6, 2011. DOI: 10.1016/j.trstmh.2010.09.006.

- STEPHEN, C. Toward a modernized definition of wildlife health. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 50, n. 3, p. 427-430, 2014.
- TALAMONI, S. A.; DIAS, M. M. Population and community ecology of small mammals in southeastern Brazil. 1999.
- TIETZ, Norbert W. *Fundamentos de Química Clínica*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- TRUMBLE, S. J. et al. Influências dietéticas e sazonais na química e hematologia do sangue em focas-comuns em cativeiro. *Mar Mamm Sci*, v. 22, p. 104–123, 2006.
- TRYLAND, M. 'Normal' serum chemistry values in wild animals. *Veterinary Records*, v. 158, n. 6, p. 211-212, 2006.
- VANWAMBEKE, S. O. et al. Impact of landuse change on dengue and malaria in northern Thailand. *EcoHealth*, v. 4, n. 1, p. 37-51, 2007.
- WALSH, M. G. The relevance of forest fragmentation on the incidence of human babesiosis: investigating the landscape epidemiology of an emerging tick-borne disease. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, v. 13, n. 4, p. 250–255, 2013. DOI: 10.1089/vbz.2012.1198.
- WENDTE, J. M.; GIBSON, A. K.; GRIGG, M. E. Population genetics of *Toxoplasma gondii*: new perspectives from parasite genotypes in wildlife. *Vet Parasitol*, v. 182, p. 96–111, 2011.
- WHITE (A), M. R.; CHAPMAN, W. L. JR.; HANSON, W. L. Chemotherapy of experimental visceral leishmaniasis in the opossum. *Journal of Parasitology*, v. 75, n. 1, p. 176–178, 1989.
- WHITE (B) , M. R.; CHAPMAN, W. L. JR.; HANSON, W. L.; LATIMER, K. S.; GREENE, C. E. Experimental visceral leishmaniasis in the opossum. *Veterinary Pathology*, v. 26, n. 4, p. 314–321, 1989. DOI: 10.1177/030098588902600405.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. *Weekly Epidemiological Record*, v. 77, n. 44, p. 365–372, 2002.

## ARTIGO

Parasitismo por *Leishmania* spp. em Gambás-de-Orelha-Branca (*Didelphis albiventris*) Capturados em Perímetro Urbano de Campo Grande - MS:  
Patologia e Epidemiologia

Wellington Garcia Corrêa <sup>a b</sup>;

Amanda Costa Rodrigues <sup>a b</sup>;

Carina Elisei de Oliveira <sup>b c</sup>;

Geovanna Silva dos Santos <sup>c</sup>;

Filipe Martins Santos <sup>b</sup>;

Heitor Miraglia Herrera <sup>b c</sup>;

Gabriel Carvalho de Macedo <sup>b</sup>;

Gisele Braziliano de Andrade <sup>a b</sup>.

<sup>a</sup> Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade Católica Dom Bosco; Av. Tamandaré, 6000. Mato Grosso do Sul, Brasil.

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária, Universidade Católica Dom Bosco, Av. Tamandaré, 6000. Mato Grosso do Sul, Brasil.

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Av. Tamandaré, 6000. Mato Grosso do Sul, Brasil.

Este artigo é derivado da dissertação intitulada "Parasitismo por *Leishmania* spp. em Gambás-de-Orelha-Branca (*Didelphis albiventris*) Capturados em Perímetro Urbano de Campo Grande - MS: Patologia e Epidemiologia", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária da Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre. O manuscrito foi formatado conforme as normas da revista *Acta Scientiae Veterinariae*.

## 1 RESUMO

2 O avanço da urbanização e a consequente modificação dos habitats naturais têm favorecido a  
3 domiciliação e proliferação de dípteros, vetores de *Leishmania* spp. que causa a leishmaniose,  
4 uma doença sistêmica e letal, além de intensificar a interação entre seus possíveis reservatórios  
5 domésticos e silvestres. No Mato Grosso do Sul, a presença de *Leishmania* spp. foi detectada  
6 em diversas espécies de mamíferos silvestres, como quatis, morcegos e gambás-de-orelha-  
7 branca (*Didelphis albiventris*) oriundos de áreas urbanas. Este estudo teve como objetivo  
8 avaliar a influência da infecção por *Leishmania* spp. nos parâmetros bioquímicos e  
9 hematológicos de *D. albiventris* que viviam em áreas florestais urbanas de Campo Grande, MS.  
10 Foram capturados 23 gambás entre abril e dezembro de 2023, em seis áreas na cidade. Após os  
11 animais serem anestesiados, foi coletado sangue para as análises bioquímicas e hematológicas.  
12 Durante a necropsia, foi feita a coleta de fragmentos de baço, pele, fígado e medula óssea para  
13 as análises molecular e histopatológica. O diagnóstico molecular identificou DNA de  
14 *Leishmania* spp. em 95,6% dos animais, com maior positividade nos órgãos linfoides como  
15 medula óssea e baço. A análise bioquímica revelou diferenças significativas nos níveis de  
16 proteínas totais, albumina, fosfatase alcalina e ureia. As alterações histopatológicas foram  
17 discretas, sem evidências de *Leishmania* spp. nos órgãos linfoides ou na pele. No fígado, foi  
18 observada leve vacuolização de hepatócitos e infiltrado inflamatório. Os resultados sugerem  
19 que os gambás-de-orelha-branca podem atuar como reservatórios de *Leishmania* spp., com  
20 possíveis implicações para a epidemiologia da Leishmaniose em áreas urbanas de Campo  
21 Grande, MS.

22 **Palavras-chave:** 1. Leishmaniose; 2. Marsupial; 3. *Leishmania* spp.; 4. Parâmetros  
23 bioquímicos; 5. Diagnóstico molecular.

## 24 INTRODUÇÃO

25 Nas áreas endêmicas, o avanço da urbanização e a modificação do habitat natural criam  
26 condições favoráveis para a proliferação de dípteros vetores (WILKE et al., 2019), e facilitam  
27 a interação entre os reservatórios domésticos e silvestres, como os cães, e os mamíferos que  
28 vivem em pequenas áreas silvestres próximas ou dentro das cidades. Essa é uma dinâmica, que  
29 contribui para a manutenção das *Leishmania* spp. em áreas periurbanas e urbanas  
30 (MENEGATTI et al., 2020; DE MACEDO et al., 2023a). No Mato Grosso do Sul, estudos  
31 moleculares detectaram *Leishmania* em mamíferos silvestres como quatis (DE MACEDO et  
32 al., 2023b), morcegos filostomídeos (DA SILVA e TORRES, 2024) e gambás-de-orelha-branca  
33 (HUMBERG et al., 2012; NANTES et al., 2021).

34 Evidenciar as interações entre a fauna silvestre, os humanos e seus animais domésticos  
35 é essencial para o controle de doenças infecciosas e parasitárias (GONZÁLEZ-CRESPO et al.,  
36 2023). Os exames laboratoriais são fundamentais para o diagnóstico, por fornecer dados  
37 fisiológicos valiosos para a saúde dessas espécies (JAIN NC., 1993). E a histopatologia permite  
38 identificar lesões causadas por parasitos como as amastigotas de *Leishmania* spp. em órgãos  
39 vitais (LIMA et al., 2004; DA SILVA et al., 2024).

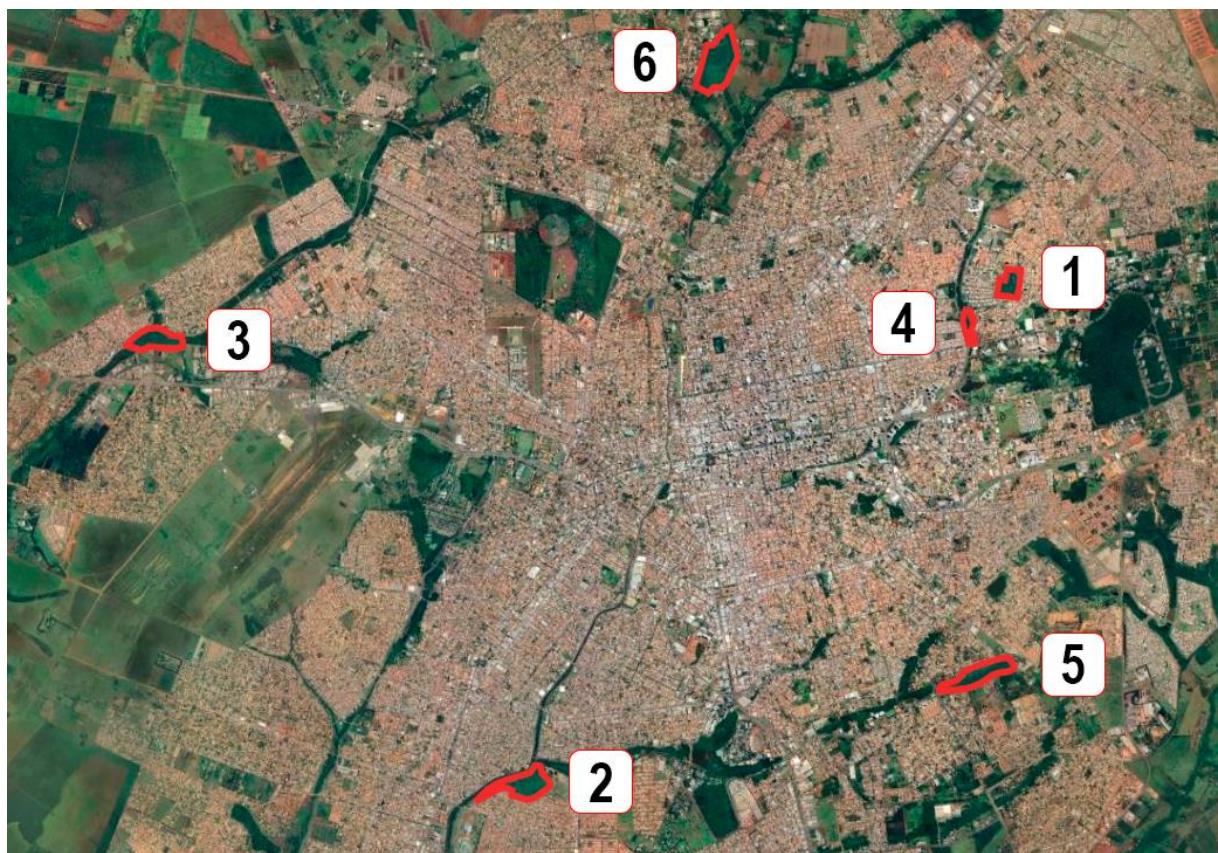
40 O gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) tornou-se uma espécie abundante,  
41 devido aos seus hábitos generalistas e a sua habilidade em se adaptar a diferentes habitats e  
42 ambientes urbanos (BARRERA-NIÑO e SÁNCHEZ, 2014; BEZERRA-SANTOS et al., 2021).  
43 E por viverem transitando entre as áreas florestais e residenciais, os *D. albiventris* são relatados  
44 como potenciais participantes nos ciclos de transmissão da *Leishmania* spp., em ambientes  
45 silvestres e urbanos (BEZERRA-SANTOS et al., 2021). Este estudo objetivou avaliar a  
46 influência da infecção por *Leishmania* spp. nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de *D.*  
47 *albiventris* provenientes de fragmentos florestais de Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

## 48 MATERIAL E MÉTODOS

### 49 Área de estudo

50 As coletas foram realizadas no período de abril a dezembro de 2023, em seis locais da  
 51 cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. As áreas de coletas foram: Carandá Clube;  
 52 Centro de Educação Ambiental (CEA) Anhanduí; CEA Imbirussu; CEA Polonês; Chácara  
 53 Coqueiral e Mata do Surucuá (**Figura 1**).

54



55  
 56 **Figura 1.** Mapa da cidade de Campo Grande, MS, indicando em vermelho as áreas de coletas  
 57 dos gambás-de-orelha-branca 1. Carandá Clube; 2. Centro de Educação Ambiental (CEA)  
 58 Anhanduí; 3. CEA Imbirussu; 4. CEA Polonês; 5. Chácara Coqueiral e 6. Mata do Surucuá.

### 59 Coleta de materiais biológicos dos gambás-de-orelha-branca

60 Os procedimentos foram realizados de acordo com a licença aprovada pela Comissão  
 61 de Ética, no Uso de Animais da Universidade Católica Dom Bosco (CEUA/UCDB),

62 n° 031/2020, e autorizado pelo Sistema de Autorização de Informação em Biodiversidade  
63 (SISBIO/IBAMA), N° 89586-1.

64 Foram feitas anotações das informações como sexo, peso, idade estimada e resultado  
65 do exame físico de cada animal. Os gambás foram anestesiados com Cetamina (20mg/kg) e  
66 Xilazina (2mg/kg). A coleta de sangue foi realizada pela via caudal, utilizando seringas de 3  
67 ml e agulhas hipodérmicas (20x8). As amostras de sangue coletadas, foram armazenadas em  
68 tubos com ativador de coágulo, com gel separador (tampa amarela) e tubos de EDTA (tampa  
69 roxa). Após homogeneizados, os tubos contendo o sangue e/ou soro sanguíneo foram  
70 refrigerados até que chegassem ao laboratório de análises clínicas incubado na Universidade  
71 Católica Dom Bosco, LabDOC.

72 No Laboratório de Anatomia Patológica da UCDB, os animais foram eutanasiados de  
73 acordo com o protocolo disponibilizado pela UNIFESP (CEUA, 2019). Durante a necropsia,  
74 foram coletados fragmentos de baço, fígado, medula óssea, pele abdominal e armazenados em  
75 álcool absoluto para o diagnóstico molecular. Para o exame histopatológico foram coletados  
76 fragmentos de baço, linfonodos, pele, rim, fígado, musculoesquelético e fixados em formol  
77 10%.

78

## 79 **Diagnóstico Molecular**

80 O DNA genômico de cada tecido coletado foi extraído, utilizando o kit *DNeasy Tissue &*  
81 *Blood* (QIAGEN®). A concentração e qualidade das amostras de DNA foram obtidas por  
82 espectrofotometria (Biodrop® Denville Scientific Inc. Holliston, MA 01746). A viabilidade do  
83 DNA extraído foi atestada por meio da Reação da Cadeia em Polimerase convencional (cPCR),  
84 usando os oligonucleotídeos IRBP F (5' TCC AAC ACC ACC ACT GAG ATC TGG AC 3')  
85 e IRBP R (5' GTG AGG AAG AAA TCG GAC TGG CC 3') que amplificam uma sequência  
86 de 227 pares de bases (pb) do gene que codifica a proteína de ligação, a retinóides inter-

87 fotorreceptores, de acordo com Ferreira et al. (2010). Em seguida as amostras de DNA foram  
88 submetidas à uma cPCR de triagem para a detecção de *Leishmania* spp., utilizando os  
89 oligonucleotídeos RV1 (5' CTT TTC TGG TCC CGC GGG TAG G 3') e RV2 (5' CCA CCT  
90 GGG CTA TTT TAC ACC A 3'), que amplificam um fragmento de 145 pb presente no  
91 cinetoplasto (kDNA), de acordo com Bigeli et al. (2012).

92 As amostras de medula óssea positivas na cPCR do kDNA foram então, submetidas a  
93 uma PCR em tempo real - nested PCR para *L. infantum* (Ln-PCR) do gene SSU18S rRNA, com  
94 os oligonucleotídeos R221 (5' GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG 3'), R332 (5' GGC CGG  
95 TAA AGG CCG AAT AG 3') e R332 (5' GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG 3') para a  
96 primeira reação (603 pb) e R223 (5' TCC CAT CGC AAC CTC GGT T 3') e R333 (5' AAA  
97 GCG GGC GCG GTG CTG 3') e R333 (5' AAA GCG GGC GCG GTG CTG 3') para a  
98 segunda reação (350 pb), conforme Castro et al. (2020).

99 Todas as reações foram realizadas em termociclador (Gene Amp PCR System 9600,  
100 Applied Biosystems®, Foster City, CA), e os produtos de PCR foram visualizados através de  
101 eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Kasvi®, Brasil) corado com GelRed Nucleic Acid Stain  
102 (Biotium®, EUA). Para sequenciamento, os produtos amplificados pela Ln-PCR foram  
103 purificados usando o kit ExoSAP-IT (Qiagen®, EUA) e processados em plataforma Big Dye  
104 (versão 3.1, Applied Biosystems®, EUA). As sequências obtidas foram analisadas pela  
105 ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e comparadas com sequências  
106 homólogas depositadas no GenBank, permitindo a identificação precisa das espécies de  
107 *Leishmania*.

108

## 109 **Hematologia e bioquímica**

110 Os tubos contendo as amostras sanguíneas foram armazenados sob refrigeração,  
111 permanecendo até o início das análises laboratoriais. Para as análises bioquímicas, foram

112 determinadas as concentrações séricas de fosfatase alcalina (FA), transaminase pirúvica (TGP),  
113 transaminase oxalacética (TGO), ureia, creatinina, albumina e proteínas totais, utilizando  
114 análise espectrofotométrica (Brasmed®, Brasil) e kits comerciais Biotech® e Gold®. Os  
115 valores de globulina foram calculados como a diferença entre as proteínas totais e os níveis de  
116 albumina (CASTRO et al., 2012).

117 As análises hematológicas incluíram o hemograma completo para avaliação de  
118 leucócitos (Le), hemácias (He), hemoglobina (Hb), volume globular (VG), volume corpuscular  
119 médio (VCM), concentração corpuscular média de hemoglobina (CCMH) e plaquetas. E a  
120 contagem celular foi realizada manualmente, utilizando a técnica de macrodiluição em solução  
121 diluente específica e a câmara de Neubauer. Para a contagem de leucócitos, utilizou-se a  
122 solução de Turk, enquanto a solução de NaCl a 0,9% foi empregada para as hemácias. A técnica  
123 de esfregaço sanguíneo foi aplicada para a diferenciação e contagem específica de leucócitos.  
124 Os resultados hematológicos e bioquímicos foram apresentados por meio de estatística  
125 descritiva, incluindo média  $\pm$  desvio padrão, além dos valores mínimo e máximo observados.

126

## 127 **Análise histopatológica**

128 Os tecidos fixados em formol a 10% foram clivados em fragmentos de 3 mm a 5 mm,  
129 acondicionados em cassetes e encaminhados ao Centro Técnico Histopatológico de Curitiba  
130 para o preparo e coloração das lâminas com Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas  
131 histológicas foram analisadas na Universidade Católica Dom Bosco em Campo Grande-MS,  
132 utilizando-se o microscópio óptico composto de luz Carl Zeiss Microscopy GmbH (MOC)  
133 modelo Axio Scope A1 e capturadas com o auxílio do software Zen. As imagens dos tecidos  
134 foram fotografadas por uma câmera colorida Axiocam 503 acoplada ao MOC.

135 Rins, fígado, musculoesquelético, baço, linfonodos e pele foram analisados  
136 individualmente e as alterações classificadas em regressivas, circulatórias, inflamatórias e de

137 reparo (BINKOWSKI 2013). Foi investigada a presença de formas amastigotas de *Leishmania*  
138 spp. em baço, linfonodos e pele. A intensidade das alterações, foram classificadas em ausente  
139 (0) leve (focal-1), moderada (multifocal a coalescente-2) ou intensa (extensiva-3).

140

## 141 **RESULTADOS**

142

143 Foram capturados em seis diferentes áreas localizadas no município de Campo Grande  
144 - MS, um total de 23 gambás-de-orelha-branca. No exame físico desses 23 animais, não foram  
145 constatados sinais clínicos característicos da infecção por *Leishmania* spp.

146 Foi detectado pelo kDNA, o DNA de *Leishmania* spp. em 22 dos 23 (95,6%) animais  
147 amostrados. E o teste molecular dos diferentes tecidos, demonstrou que as maiores taxas de  
148 positividade ocorreram nos órgãos linfoides: medula óssea e baço (**Tabela 1**). Dos animais  
149 amostrados, 11 espécimes apresentaram positividade na pele, e os mesmos 11 indivíduos  
150 apresentaram também DNA de *Leishmania* spp. em órgãos linfoides.

151 O resultado do teste molecular dos diferentes tecidos, está demonstrado na **tabela 1**.

152

153 **Tabela 1.** Resultado do teste molecular (kDNA - RV1/RV2) para *Leishmania* spp. em  
154 diferentes tecidos de gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) (n=23) amostrados em  
155 Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Os resultados estão expressos pelo número de animais  
156 positivos para *Leishmania* spp., seguido pelo percentual de positividade.

157

TECIDO	INDIVÍDUOS POSITIVOS
Medula óssea	19 (83%)
Baço	16 (70%)
Fígado	13 (57%)
Pele	11 (48%)

158

159 A sequência obtida na Ln-PCR do animal UCDB 580 (acesso GenBank PQ095891),  
160 quando comparada à sequência de *L. infantum* depositada no GenBank XR\_001203206,  
161 mostrou uma cobertura de 99% e uma identidade de 100%.

162 As análises hematimétricas ou valores hematológicos gerais encontrados nos animais  
163 amostrados estão expressos ou apresentados na **Tabela 2**.

164 **Tabela 2.** Média e desvio padrão dos parâmetros hematológicos de 23 gambás-de-orelha-  
165 branca (*Didelphis albiventris*) capturados em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. (He:  
166 Hemácias; VG: Volume Globular; Hemoglobina; VCM: Volume Corpuscular Médio; CHCM:  
167 Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média).

168

PARÂMETRO	MÉDIA (mm <sup>3</sup> )	DESVIO PADRÃO	MÍN.	MÁX.
He (g/dL)	3	1,57	1.200.000	7.080.000
VG (%)	35	5,86	23	46
Hemoglobina (g/dL)	9,35	3,26	5,50	19,90
VCM (fL)	140,97	73,64	11,70	333,3
CHCM (g/dL)	335,87	404,31	17,70	2.029

169

170 Os valores médios e desvio padrão do leucograma dos 23 animais amostrados estão  
 171 apresentados na **Tabela 3**.

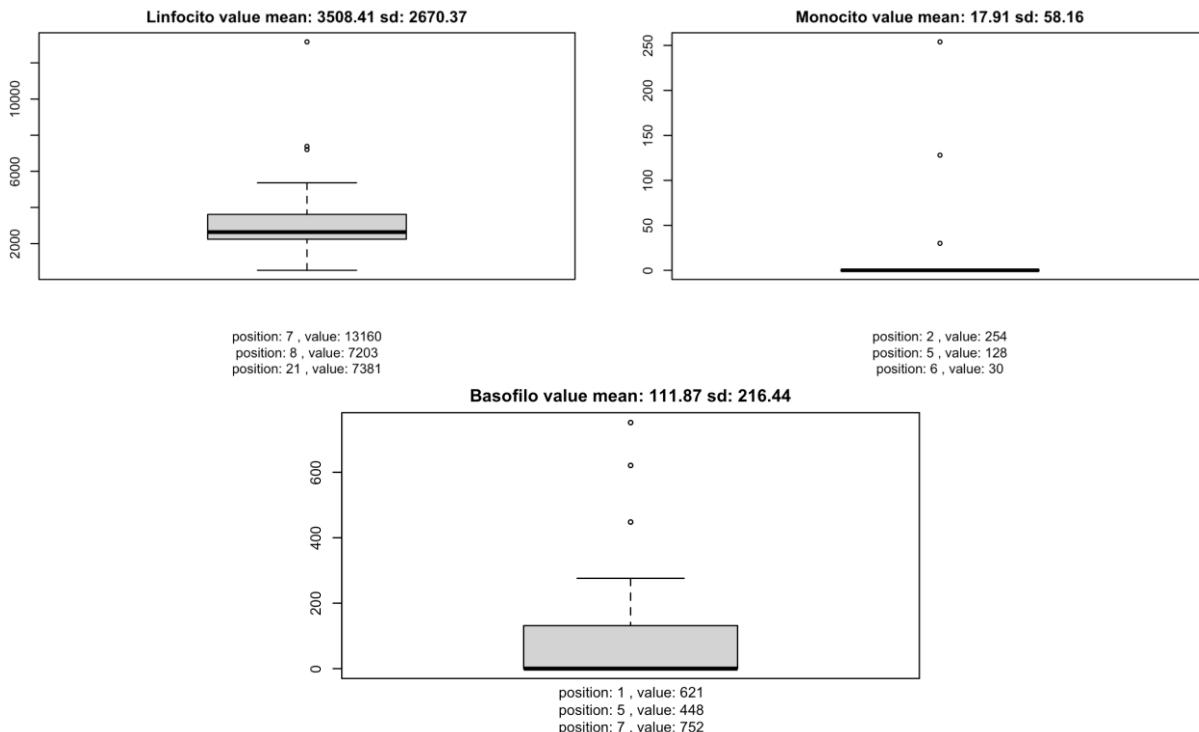
172 **Tabela 3.** Média e desvio padrão dos parâmetros do leucograma de 23 gambás-de-  
 173 orelha-branca (*Didelphis albiventris*) capturados em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. (Le:  
 174 contagem total de leucócitos; Neutrófilos; Linfócitos; Monócitos; Eosinófilos; Basófilos).

175

LEUCOGRAMA	MÉDIA (mm <sup>3</sup> )	DESVIO PADRÃO	MÍN.	MÁX.
Le (10x <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	8,95	4,84	1.500	18.900
Neutrófilo (10x <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	4,48	3,23	90	13.608
Linfócito (10x <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	3,50	2,67	525	13.160
Monócito (10x <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	0,01	0,05	0	254
Eosinófilo (10x <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	0,75	0,80	0	3.360
Basófilo (10x <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	0,11	0,21	0	752

176

177 A análise descritiva exploratória dos resultados da série branca mostrou valores que  
 178 diferiram significativamente (*outliers*) para linfócitos, monócitos e basófilos (**Figura 2**).



179

180

181 **Figura 2:** Outliers encontrados para linfócitos, monócitos e basófilos de gambás-de-orelha-  
 182 branca (*Didelphis albiventris*) capturados em Campo Grande, MS.

183

184 O resultado dos testes de bioquímica sérica dos animais está demonstrado na **Tabela 4**.

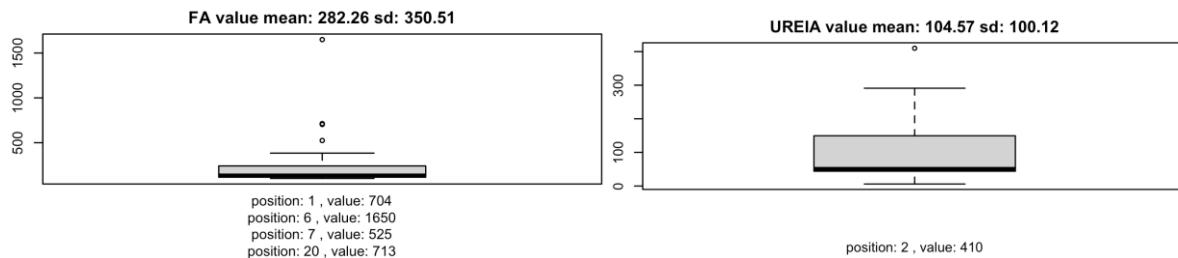
185 **Tabela 4.** Média e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos séricos de 23 gambás-de-orelha-  
 186 branca (*Didelphis albiventris*) capturados em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. (TGP:  
 187 Transaminase Pirúvica; TGO: Transaminase Oxalacética; FA: Fosfatase Alcalina; CK:  
 188 Creatine Kinase (creatina quinase); PT: Proteína Total; ALB: Albumina).

189

ENZIMAS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍN.	MÁX.
TGP (UI/L)	34,56	19,68	6	73
TGO (UI/L)	234,82	114,9	50	445
FA (UI/L)	282,26	350,5	102	1.650
CREATININA (μmol/L)	2,58	1,34	0,40	5,10
UREIA (mmol/L)	104,56	100,11	6	410
CK (U/L)	4.883,34	2.444,74	218	9.559
PT (g/dL)	4,68	2,43	0,10	9
ALB (g/dL)	1,94	0,99	0,90	5,50

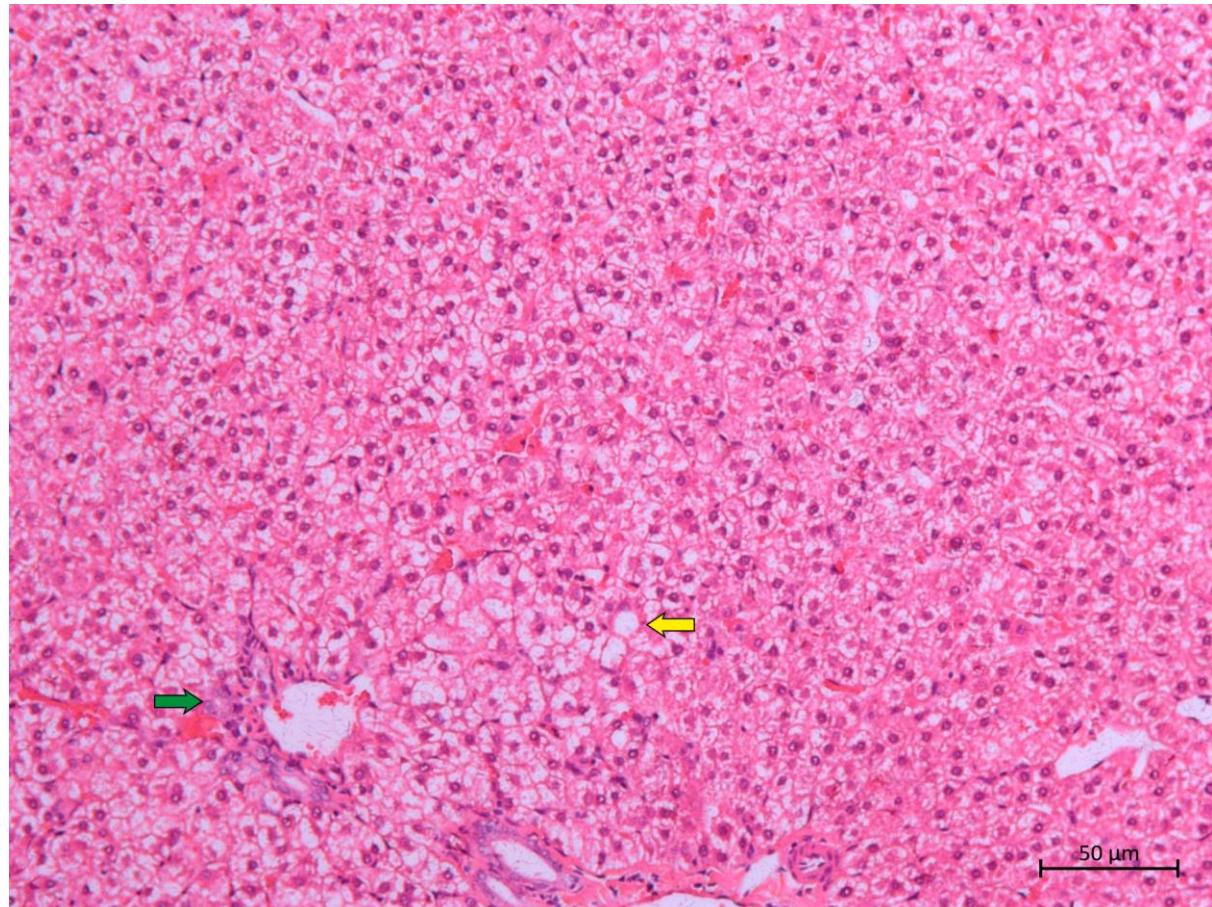
190 A análise descritiva exploratória dos resultados dos parâmetros bioquímicos mostrou  
 191 valores que diferiram significativamente (*outliers*) para proteínas totais, albumina, fosfatase  
 192 alcalina e ureia (**Figura 3**).

193



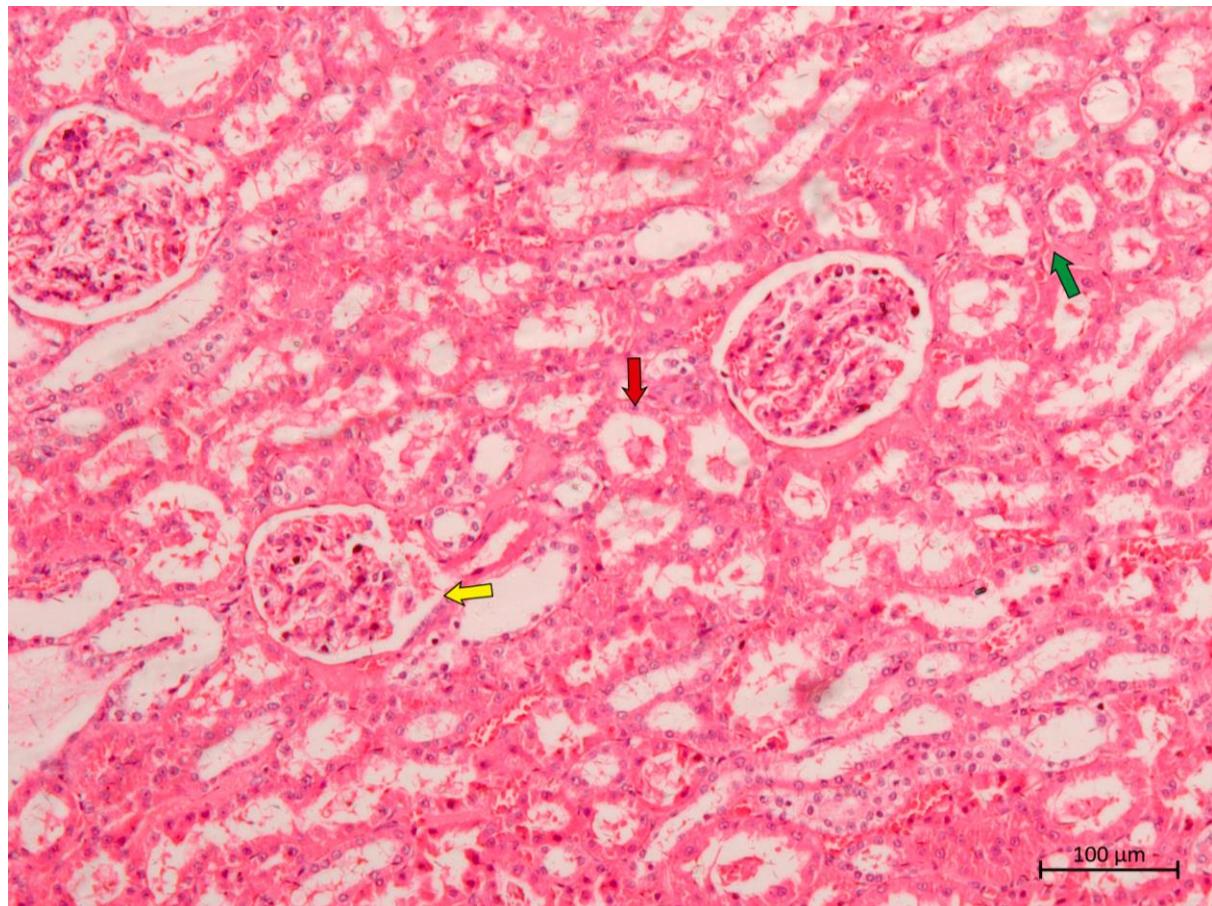
194  
 195  
 196 **Figura 3:** Outliers encontrados para PT (proteínas totais), TGO (Transaminase Oxalacética),  
 197 FA (Fosfatase Alcalina) e Ureia de gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) capturados  
 198 em Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

199  
 200 De um modo geral, as alterações histopatológicas nos tecidos analisados foram leves e  
 201 discretas. No baço, linfonodos e pele não foram encontradas alterações sugestivas de  
 202 leishmaniose, também não foram encontradas formas amastigotas nos tecidos. No fígado, foi  
 203 detectado a presença de alguns hepatócitos com vacuolização (hidrópica e gordurosa), e  
 204 presença de pequenos focos de células inflamatórias do infiltrado misto, em espaço-porta  
 205 (**Figura 4**). E no rim, o resultado revelou presença de pouca quantidade de material proteico  
 206 fibrilar no interior de alguns túbulos e glomérulo, e vacuolização de células epiteliais de alguns  
 207 túbulos renais (**Figura 5**). No tecido muscular esquelético não foram observadas alterações  
 208 histopatológicas.



209

210 **Figura 4:** Fotomicrografia de fígado de gambá-de-orelha-branca mostrando hepatócitos com  
211 vacuolização gordurosa (seta amarela), e presenças de pequenos focos de células inflamatórias  
212 do infiltrado misto, em espaço-porta (seta verde). Coloração de Hematoxilina e eosina.



213

214 **Figura 5:** Fotomicrografia de rim de gambá-de-orelha-branca mostrando presença de pouca  
 215 quantidade de material proteico fibrilar no interior de alguns túbulos renais (seta vermelha) e  
 216 glomérulo (seta amarela) e vacuolização de células epiteliais de alguns túbulos renais (seta  
 217 verde). Coloração de Hematoxilina e eosina.

218

## 219 **DISCUSSÃO**

220

221 Os resultados moleculares mostraram positividade em 95,6% dos animais amostrados,  
 222 indicando que os gambás-de-orelha-branca que vivem em fragmentos florestais urbanos de  
 223 Campo Grande estão sendo afetados pelo cenário epidemiológico da leishmaniose visceral. A  
 224 positividade de DNA de *Leishmania* spp. na pele de 11 gambás-de-orelha-branca demonstra  
 225 que esses animais possivelmente atuam como hospedeiros finais e colaborando com o ciclo.

226

227 Observou-se neste estudo, que a presença do DNA de *L. infantum* foi predominante no  
 228 baço e na medula óssea, o que era esperado, devido à preferência do parasito por tecidos  
 linfoides para colonização e multiplicação (MAIA et al., 2009). A presença do DNA de

229 *Leishmania* detectada em medula óssea reforça a eficácia deste tecido para diagnóstico  
230 molecular. Esse achado, contrasta com o relato de alguns estudos como o de Solano-Gallego et  
231 al. (2004), que consideram a medula óssea menos adequada para PCR, possivelmente devido à  
232 menor carga parasitária presente na medula óssea ou à distribuição do parasito em outros  
233 tecidos.

234 A ausência de amastigotas e de alterações histopatológicas características como  
235 granulomas, observadas com frequência no cão, humanos e modelo murino (SANTANA et al.,  
236 2008; ROQUE et al., 2010), sugere que o *D. albiventris* não seja um hospedeiro adequado para  
237 o desenvolvimento de *L. infantum*. Estudos murinos indicam que a formação de granulomas é  
238 fundamental no controle da infecção, fenômeno aparentemente ausente nos gambás analisados,  
239 ponderando dessa forma ser uma resposta imunológica ainda desconhecida (ENGWERDA e  
240 KAYE, 2000; STANLEY e ENGWERDA, 2007; HERMIDA et al., 2018).

241 Os outliers encontrados para algumas células da série branca, como linfócitos,  
242 monócitos e basófilos, bem como para algumas enzimas séricas como PT, ALB, FA e ureia,  
243 estão dentro da normalidade, uma vez que dentro de um grupo ou população, existem enormes  
244 variações individuais. Considerou-se então, que para obter uma análise robusta dos resultados  
245 hematológicos e bioquímicos, o número amostral deveria ser maior, ou seja, ter uma quantidade  
246 suficiente de amostras para retirar os outliers das análises estatísticas.

247 Os resultados do presente estudo mostraram leucopenia em vários animais, diferindo do  
248 reportado por Nantes et al. (2019), que observaram leucocitose em infecções naturais em *D.*  
249 *albiventris* com *Leishmania spp.* Essa discrepância pode estar relacionada ao fato de os animais  
250 estarem igualmente infectados naturalmente com as espécies de tripanosomatídeos, interferindo  
251 no estado de saúde dos gambás, ou mesmo outros fatores ambientais, o que pode refletir em um  
252 quadro de imunossupressão associada à infecção por *Leishmania spp.*, tornando-os mais  
253 suscetíveis a infecções secundárias.

254 A comparação com parâmetros de outros estudos, sugere uma variabilidade que pode  
255 estar relacionada à diferenças na dieta, habitats e às condições de saúde geral dos animais,  
256 reforçando a importância de estudos locais mais aprofundados, para a compreensão de tais  
257 variações e sua influência sobre a saúde dos mesmos (CASAGRANDE et al. 2009; NANTES  
258 et al., 2021; OROZCO, 2022).

259 Como não foram observadas alterações hepáticas e renais significativas na  
260 histopatologia de amostras de *D. albiventris*, capturados em fragmentos florestais de Campo  
261 Grande, pode-se então, considerar que os valores aparentemente elevados de FA, TGO, ureia e  
262 creatinina sejam apenas por fatores fisiológicos, ou que possivelmente esse aumento na resposta  
263 enzimática possa ser um indicador precoce de estresse hepático e renal antes de manifestações  
264 clínicas mais evidentes (LIMA et al., 2014; NDREPEPA, 2021; ALVIM et al., 2022).

265

## 266 CONCLUSÃO

267

268 Evidenciou-se com este estudo, que a infecção por *Leishmania* spp. em gambás-de-  
269 orelha-branca (*Didelphis albiventris*) não resultou em alterações significativas nos parâmetros  
270 hematológicos, bioquímicos e patológicos, demonstrando que esta espécie de marsupial possa  
271 ter alguns mecanismos fisiológicos que estariam controlando o parasitismo. Como não foram  
272 visualizadas formas amastigotas nos tecidos, apenas DNA de *L. infantum*, pode-se hipotetizar  
273 que esta espécie de marsupial possa ter participação na epidemiologia das leishmanioses como  
274 hospedeiro final.

275 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 276
- 277 1. Alvim M., et al. 2022. Estudo para a determinação dos valores de referência das enzimas  
278 aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama-glutamil  
279 transferase (GGT) no soro. *Boletim Epidemiológico Observações*. 11(31):44-48.
- 280 2. Barrera-Niño V. & Sánchez F. 2014. Forrajeo de *Didelphis pernigra* (Mammalia:  
281 Didelphidae) en un área suburbana de la Sabana de Bogotá, Colombia. *Therya*. 5:289-  
282 302. DOI: <https://doi.org/10.12933/THERYA-14-172>.
- 283 3. Bezerra-Santos M.A., Ramos R.A.N., Campos A.K., Dantas-Torres F. & Otranto D.  
284 2021. *Didelphis* spp. opossums and their parasites in the Americas: A One Health  
285 perspective. *Parasitology Research*. 120(12):4091-4111.
- 286 4. Bigeli J.G., Oliveira Júnior W.P.D. & Teles N.M.M. 2012. Diagnosis of *Leishmania*  
287 (*Leishmania*) *chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and  
288 sanitary aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, Brazil. *Revista da  
289 Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 45(1):18-23.
- 290 5. Binkowski L.J., et al. 2013. Histopathology of liver and kidneys of wild living Mallards  
291 *Anas platyrhynchos* and Coots *Fulica atra* with considerable concentrations of lead and  
292 cadmium. *Science of the Total Environment*. 450-451:326-333. DOI:  
293 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.002>.
- 294 6. Casagrande R.A., et al. 2009. Perfil hematológico de gambás (*Didelphis albiventris*) em  
295 vida livre e em cativeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 29(8):654-660.
- 296 7. Castro I.P., Sousa M.V.C., Magalhães G.M., Mundim A.V., Noleto P.G. & Paula  
297 M.B.C., et al. 2012. Perfil hepático e protéico em cães com leishmaniose visceral.  
298 *Bioscience Journal*. 28(5):799-804.

- 299 8. Castro L.S., Dorval M.E.C., Matheus L.M.D., Bednaski A.V., Facco G.G., Silveira M.,  
300 et al. 2020. *Leishmania* presence in bats in areas endemic for leishmaniasis in central-  
301 west Brazil. *International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife*. 11:261-267.  
302 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.02.008>.
- 303 9. CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais. 2019. Guia de eutanásia para animais  
304 em pesquisa e ensino. São Paulo: UNIFESP.
- 305 10. Da Silva A.R., Herrera H.M., Elisei C.O., Torres J.M., Ferreira A.N.R. & Leite J.S.  
306 2024. The relationships among *Leishmania infantum* and phyllostomid bats assessed by  
307 histopathological and molecular assays. *International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife*.  
308 23:100904.
- 309 11. De Macedo G.C., Barreto W.T.G., De Assis W.O., Rucco A.C., Porfírio G.E.A., Sano  
310 N.Y., et al. 2023. Hematology and biochemistry of South American coatis *Nasua nasua*  
311 (*Carnivora: Procyonidae*) inhabiting urban fragments in Midwest Brazil: differences  
312 according to intrinsic features and sampling site. *European Journal of Wildlife Research*. 69(119):1-13.
- 313 12. De Macedo G.C., Barreto W.T.G., De Oliveira C.E., Santos F.M., Porfírio G.E.O.,  
314 Xavier S.C.D.C., et al. 2023. *Leishmania infantum* infecting the carnivore *Nasua nasua*  
315 from urban forest fragments in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazilian  
316 Midwest. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 13(12):1050339.
- 317 13. Engwerda C.R. & Kaye P.M. 2000. Organ-specific immune responses associated with  
318 infectious disease. *Immunology Today*. 21(2):73-78.
- 319 14. Ferreira E.C., et al. 2010. Alternative PCR protocol using a single primer set for  
320 assessing DNA quality in several tissues from a large variety of mammalian species  
321 living in areas endemic for leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.  
322 105(7):895-898. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000700009>.

- 324 15. González-Crespo C., Martínez-López B., Conejero C., Castillo-Contreras R., Serrano  
325 E., López-Martín J.M., et al. 2023. Predicting human-wildlife interaction in urban  
326 environments through agent-based models. *Landscape and Urban Planning*.  
327 240:104878.
- 328 16. Hermida M.D., Melo C.V.B., Lima I.D.S., Oliveira G.G.S. & Dos-Santos W.L.C. 2018.  
329 Histological disorganization of spleen compartments and severe visceral leishmaniasis.  
330 *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 8:394.
- 331 17. Humberg R.M.P., Bonamigo R.A., Cruz M.D.S.P.E., De Oliveira A.G., Humberg  
332 R.M.P., Oshiro E.T., et al. 2012. *Leishmania chagasi* in opossums (*Didelphis*  
333 *albiventris*) in an urban area endemic for visceral leishmaniasis, Campo Grande, Mato  
334 Grosso do Sul, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 87(3):470-  
335 472.
- 336 18. Jain N.C. 1993. *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger,  
337 417p.
- 338 19. Lima I.S., Silva J.S., Almeida V.A., Leal F.G., Souza P.A.N. & Larangeira D.L. 2014.  
339 Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with  
340 disruption of the splenic white pulp. *PLoS One*. 9(2):e87742.
- 341 20. Maia C., Ramada J., Cristóvão J.M., Gonçalves L. & Campino L. 2009. Diagnosis of  
342 canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues.  
343 *The Veterinary Journal*. 179(1):142-144.
- 344 21. Menegatti J.A., Oliveira Júnior G.J., Silva L.C.F., Oliveira A., Bica D.L.C. & Santos  
345 P.V.B.A. 2020. Phlebotomine fauna and seroprevalence for canine visceral  
346 leishmaniasis in urban area from Central-West region of Brazil. *BJVRAS*. 72(4):1197-  
347 1205.

- 348 22. Nantes W.A.G. Espécies de Trypanosoma no gambá-de-orelha-branca (*Didelphis*  
349 *albiventris*) em fragmentos florestais de Campo Grande/MS com diferentes graus de  
350 conservação. 2019. Tese (Doutorado) – Universidade Católica Dom Bosco.
- 351 23. Nantes W.A.G., Santos F.M., De Macedo G.C., Barreto W.T.G., Gonçalves L.R.,  
352 Rodrigues M.S., et al. 2021. Trypanosomatid species in *Didelphis albiventris* from  
353 urban forest fragments. *Parasitology Research*. 120(1):223-231.
- 354 24. Ndreppea G. 2021. Aspartate aminotransferase and cardiovascular disease—a narrative  
355 review. *Journal of Laboratory and Precision Medicine*. 6.
- 356 25. R Development Core Team. 2015. *R: A Language and Environment for Statistical*  
357 *Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- 358 26. Roque A.L., Cupolillo E., Marchevsky R.S. & Jansen A.M. 2010. Thrichomys  
359 laurentius (Rodentia; Echimyidae) as a putative reservoir of *Leishmania infantum* and  
360 *L. braziliensis*: patterns of experimental infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.  
361 4(2):e589. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000589. PMID: 20126407; PMCID:  
362 PMC2814861.
- 363 27. Santana C.C., Vassallo J., De Freitas L.A., Oliveira G.G., Pontes-de-Carvalho L.C. &  
364 Dos-Santos W.L. 2008. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue  
365 in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. *Parasite Immunology*.  
366 30(10):515-524. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2008.01051.x. PMID: 18665902; PMCID:  
367 PMC2592477.
- 368 28. Solano-Gallego L., et al. 2004. Histological and immunohistochemical study of  
369 clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *Journal of Comparative*  
370 *Pathology*. 130(1):7-12.
- 371 29. Stanley A.C. & Engwerda C.R. 2007. Balancing immunity and pathology in visceral  
372 leishmaniasis. *Immunology and Cell Biology*. 85(2):138-147.

373 30. Wilke A., Beier J. & Benelli G. 2019. Complexity of the relationship between global  
374 warming and urbanization - an obscure future for predicting increases in vector-borne  
375 infectious diseases. *Current Opinion in Insect Science.* 35:1-9. DOI:  
376 <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.06.002>.