

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS
Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias - PPGDIP

JUDSON MATIAS DE ARRUDA DOS SANTOS

**ARARAS-CANINDÉS (*Ara ararauna* - Psittacidae) COMO
HOSPEDEIRAS DE *Leishmania* spp.**

Campo Grande

2024

JUDSON MATIAS DE ARRUDA DOS SANTOS

**ARARAS-CANINDÉS (*Ara ararauna* - Psittacidae) COMO
HOSPEDEIRAS DE *Leishmania* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientação: Dra. Alexandra Rodrigues de Mendonça Favacho.

Coorientação: Dr. Eduardo de Castro Ferreira

Campo Grande

2024

“Hoje eu acordei para um sonho, mas é para eu evoluir, seguir em frente e enfrentar a vida.”

Charlie Brown Jr.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, que me conduz, protege e capacita em cada etapa da minha vida, com Seu eterno amor e misericórdia, que me alcançam todos os dias, dando-me força, saúde e ânimo para lutar pelos meus sonhos e objetivos. Minha eterna gratidão aos meus pais, Darcy Matias e Lidia Coutinho, que me educaram, ensinaram, apoiaram e incentivaram na busca pelo conhecimento, pela verdade e pela felicidade. Aos meus irmãos, Jocsã Matias e Taliston de Arruda, expresso minha admiração e gratidão pelo apoio e exemplo ao longo da vida.

Agradeço ainda ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias – PPGDIP da Faculdade de Medicina – FAMED da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS. Gostaria de expressar minha sincera gratidão às instituições CAPES, UNIDERP, FIOCRUZ e IMASUL por todo o apoio e incentivo ao longo da realização deste projeto. Sem a colaboração e o financiamento dessas instituições, esta dissertação não teria sido possível.

Sou grato a Deus pela vida dos meus orientadores, Prof. Dr. Eduardo Ferreira e Prof^a. Dr^a. Alexsandra Favacho, por seu inestimável apoio e orientação ao longo da minha caminhada como biólogo e cientista. Suas contribuições nestes últimos sete anos foram fundamentais para minha formação profissional, e sou eternamente grato pela generosidade com seu tempo, conhecimento, conselho e incentivo. Também quero expressar minha mais sincera gratidão à Prof^a. Dr^a. Glaucia Marcon, que me acompanhou, juntamente com meus orientadores, durante toda minha formação como cientista, participando da orientação nos primórdios, na época da Iniciação Científica.

Agradeço ao Instituto Arara Azul e ao Projeto Aves Urbanas - Araras na Cidade, por me proporcionarem a experiência de acompanhá-los e conhecer toda a sua magnífica trajetória e importância para a conservação das aves na cidade. Ao Centro de Reabilitação de Animais Silvestres, por confiar em mim e ceder amostras para a realização da minha pesquisa científica.

Um agradecimento especial a Neiva Guedes, Larissa Tinoco, Maria Eduarda Monteiro, Bruno Lucas Tinoco e todo o pessoal do Instituto Arara Azul, que me proporcionaram dias maravilhosos, um ambiente de trabalho amigável, leve e rico em ensinamentos que vão além do âmbito profissional, ensinamentos para a vida toda.

Gratidão eternas aos meus amigos de pós-graduação, que participaram do meu crescimento e amadurecimento. Entre todos, os que mais impactaram foram Guilherme Augusto e Mariana Ramos, irmãos de orientação, que me acompanharam durante os procedimentos no laboratório, nos estudos e congressos, compartilhando conhecimento e amizade. Eles sempre ofereceram um ombro amigo e aguentaram minhas lamúrias (que são muitas) desde a época da Iniciação Científica juntamente com o amigo Antônio Augusto.

Um carinho especial a Alanys Rafaela Bononi, Ana Isabel Nascimento, Jaqueline Zequine, Juliana Azambuja e Thayssa Maluf, mulheres que conheci durante o mestrado e que se destacaram como cientistas inteligentíssimas, pessoas amáveis e ótimas amigas.

Resumo

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas que apresentam diferentes manifestações clínico-epidemiológicas e ampla distribuição mundial. No Novo Mundo são consideradas zoonoses, cujos agentes etiológicos são protozoários do gênero *Leishmania*, parasitos de grande importância para a saúde pública no Brasil, país endêmico para todas as formas da doença. Atualmente os mamíferos são considerados os principais reservatórios da *Leishmania* spp. no meio ambiente, porém há relatos escassos de contato de espécies de aves domésticas e silvestres com o parasito, levantando assim o questionamento sobre o possível papel das aves no ciclo de transmissão das leishmanioses na natureza. O objetivo deste trabalho foi analisar as araras-canindés (*Ara ararauna*) como possíveis hospedeiras de *Leishmania* spp. em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Foram analisadas amostras de sangue de 47 indivíduos da espécie *A. ararauna*, em vida livre e em reabilitação, utilizando técnicas de biologia molecular para a detecção de DNA de *Leishmania*. Os resultados mostram que houve um total de seis (12,7%) espécimes positivos para *Leishmania*, dos quais quatro eram filhotes. Destes, quatro são de vida livre e dois em reabilitação. Pela primeira vez foi relatado aves da espécie *A. ararauna* albergando o parasito da *Leishmania*, porém, este achado não é suficiente para afirmar que essas aves participam do ciclo de transmissão da leishmaniose. Mais estudos são necessários para esclarecer a ecoepidemiologia das leishmanioses.

Palavras-chave: Leishmanioses, Saúde única, Psitacídeos, Cativo, Vida Livre.

Abstract

Leishmaniasis are a group of infectious diseases that present different clinical and epidemiological manifestations and have a wide global distribution. In the New World, they are considered zoonoses, with etiological agents being protozoa of the genus *Leishmania*, parasites of great importance to public health in Brazil, a country endemic for all forms of the disease. Currently, mammals are considered the primary reservoirs of *Leishmania* spp. in the environment; however, there are few reports of contact between domestic and wild bird species with the parasite. This raises the question about the possible role of birds in the transmission cycle of leishmaniasis in nature, including in Mato Grosso do Sul. This study aimed to analyze *Ara ararauna* as potential hosts of *Leishmania* spp. in Campo Grande, Mato Grosso do Sul. A total of 47 individuals of the species *Ara ararauna*, both free-living and captive, were analyzed using molecular biology techniques for the detection of *Leishmania* DNA. In this study, there were a total of six (12.7%) specimens positive for Leishmania, of which four were pups. Of these, four were living in the wild and two were in captivity. For the first time, birds of the species *Ara ararauna* were reported harboring the *Leishmania* parasite; however, this is not enough to state that these birds participate in the leishmaniasis transmission cycle. Further studies are needed to clarify the eco-epidemiology of leishmaniasis.

Keyword: Leishmaniasis, One Health, Psittacines, Captivity, Wild.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia da <i>Leishmania</i> spp.....	19
Figura 2. Ciclo biológico das leishmanioses	20
Figura 3. Inseto flebotomíneo fêmea e macho.....	22
Figura 4. Sintomas de leishmaniose visceral e cutânea.....	25
Figura 5. Sintomas de leishmaniose em cães	26
Figura 6. <i>Ara ararauna</i> (arara-canindé)	29
Figura 7. Distribuição espacial de ninhos das aves amostradas no Município de Campo Grande-MS	36
Figura 8. Procedimento de captura de filhote <i>A. ararauna</i>	37
Figura 9. Resultado Ln-PCR visualizado em gel agarose.....	44
Figura 10. Resultado PCR-RFLP visualizado em gel agarose.....	46
Figura 11. Distribuição espacial de casos positivos.....	47
Figura 12. Filhotes de arara-canindé em ninho artificial.....	48
Figura 13. Localização do ninho artificial	49
Figura 14. Filhote na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul	49
Figura 15. Localização do ninho UFMS.....	50
Figura 16. Filhotes positivos para <i>Leishmania</i>	50
Figura 17. Prevalência de LVC em Campo Grande	51

LISTA DE TABELAS

1 Resultado dosagem de DNA.	43
2 Positividade da leishmaniose em aves por teste realizado.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM.....	Amazonas
<i>A. ararauna</i>	<i>Ara ararauna</i>
<i>B. flaviscutellata</i>	<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>
CCZ.....	Centro de Controle de Zoonoses
CRAS	Centro de Reabilitação de Animais Silvestres
CEUA	Comitê de Ética e Uso de Animais
DNA.....	Ácido Desoxirribonucleico
GO.....	Goiás
GPS.....	Global Positioning System
HSP70.....	Heat-Shock Protein 70
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HUCF	Hospital Universitário Clemente de Faria
ITA.....	Instituto Arara Azul
LC.....	Leishmaniose cutânea
<i>L. amazonensis</i>	<i>Leishmania Leishmania amazonenses</i>
<i>L. braziliensis</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>
<i>L. chagasi</i>	<i>Leishmania chagasi</i>
<i>L. guyanensis</i>	<i>Leishmania guyanensis</i>
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>
LMC.....	Leishmaniose mucocutânea
<i>Ln-PCR</i>	<i>Leishmania nested PCR</i>
<i>L. longipalpis</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>
LV.....	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina

LVHLeishmaniose Visceral Humana
M. migonei..... *Migonemyia migonei*
MS Mato Grosso do Sul
MT Mato Grosso
N. intermedia*Nyssomyia intermedia*
N. umbratilis *Nyssomyia umbratilis*
N. whitmani..... *Nyssomyia whitmani*
OMSOrganização Mundial da Saúde
OPASOrganização Pan-Americana da Saúde
PCR..... Polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)
P. wellcomei *Psychodopygus wellcomei*
PCR-RFLP Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
PR Paraná
QGIS Quantum GIS
SIG Sistemas de Informações Geográficas
SINAN Sistema Nacional de Agravos de Notificação
SMF Sistema mononuclear fagocitário
SP São Paulo
UFMS Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UV Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Leishmanioses	18
2.1.1 Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.	19
2.1.2 Flebótomos	21
2.2 Endemicidade leishmaniose Visceral Humana	24
2.2.1 Endemicidade leishmaniose Visceral Canina	25
2.3 Aves e reservatórios	26
2.3.1 Araras-Canindés	28
2.4 Saúde única e aves	30
2.5 A aplicação da PCR na detecção de <i>Leishmania</i> spp.	31
2.6 Aplicação do georreferenciamento no mapeamento de patógenos	32
3 OBJETIVO	34
3.1 Objetivo geral	34
3.1 Objetivos específicos	34
4 MÉTODOLOGIA	35
4.1 Tipo de estudo	35
4.2 Aspecto ético	35
4.3 Local e período da pesquisa	35
4.4 População de estudo, coleta e armazenamento das amostras	37
4.5 Detecção de DNA de <i>Leishmania</i> spp. em amostras de sangue periférico de aves	38
4.5.1 Extração de DNA das amostras sanguíneas	38
4.5.2 Amplificação e leitura dos resultados	39
4.6 Georreferenciamento	42
5 RESULTADO	43
5.1 Análise molecular	43
5.1.1 Dosagem de DNA	43
5.2 Prevalência de casos positivos	44

5.2.1 Identificação de <i>Leishmania spp.</i>	46
5.3 Análise espacial dos casos positivos das aves de vida livre.....	46
6 DISCUSSÃO	53
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
8 CONCLUSÃO	59
9 REFÊRENCIAS.....	60
ANEXO I.....	70

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças típicas de áreas tropicais, cujos agentes etiológicos são transmitidos vetorialmente por fêmeas de insetos flebotomíneos de diferentes gêneros (GALATI, 2023). No novo mundo possuem caráter zoonótico, apresentando mamíferos como seus hospedeiros e o homem como hospedeiro acidental (OLIVEIRA et al., 2000; MORADI-ASL, 2017).

As leishmanioses são causadas por tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, divididos em três subgêneros *Viannia*, *Leishmania* e *Mundinia* cujas espécies apresentam características epidemiológicas e clínicas diferentes assim como suas características genéticas e fenotípicas também são distintas (LAINSON; SHAW, 1987; SERENO, 2019; LEMOS; SOUZA; SILVA, 2019).

A doença apresenta três formas principais: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV), conhecida como calazar. A LC é a mais comum, enquanto a LMC é a mais incapacitante entre as variantes da doença, e a LV é a mais grave, podendo levar ao óbito quando não diagnosticada e tratada a tempo (WHO, 2024).

Nos humanos, a leishmaniose pode apresentar manifestações clínicas graves como deformidades, incapacidade e morte, figurando o Brasil, Índia, Sudão e a Etiópia entre os países que apresentam as maiores taxas de mortalidade por LV no mundo, (MAIA-ELKHOURY, 2016; MORADI-ASL, 2017).

No Brasil apenas no ano de 2019 foram registrados mais de 2.500 casos de LV no país, com uma taxa de incidência de 1,2 casos para cada 100 mil habitantes, a taxa de letalidade da LV foi 9%, a mais alta nos últimos 10 anos (BRASIL, 2021).

No estado de Mato Grosso do Sul (MS), no ano de 2021, foram relatados cerca de 151 casos de Leishmaniose Visceral Humana (LVH), dos quais 10 evoluíram para óbito. Essa taxa de infecção foi superior aos últimos três anos e quando comparados os anos de 2021 e 2020 Percebe-se que a quantidade de notificações e de óbitos aumentaram. Já no ano de 2022, até a data de junho, o estado de MS já havia registrado 142 casos, 50 confirmados e 7 óbitos por LVH (BRASIL, 2021).

Em Campo Grande, o desenvolvimento urbano com as construções de casas e avenidas acompanhando o curso dos rios e a destruição da vegetação nestes locais são importantes fatores ambientais no processo de urbanização do ciclo de

transmissão da leishmaniose e do seu vetor (SILVA; ANDREOTTI; HONNER, 2007; BOTELHO; NATAL, 2009).

A presença dos agentes etiológicos das leishmanioses e a resposta imune ao hospedeiro podem induzir ao aparecimento de sintomas clinicamente distintos que são característicos da LC, LCM ou da LV. A LC apresenta-se por meio de úlceras cutâneas com autocura e podem ainda apresentar severas mutilações na mucosa, já a LCM provoca lesões que podem danificar parcial ou totalmente as membranas mucosas do nariz, cavidade oral e garganta, bem como os tecidos ao redor; a LV gera infecções viscerais que podem evoluir para uma hepatoesplenomegalia devido à multiplicação dos parasitos nos tecidos e órgãos ricos em células do sistema monocítico fagocitário (LE MOS; SOUZALAINSON; SHAW, 1987; ASHFORD, 2000; SILVA, 2019; OMS, 2024).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a leishmaniose visceral como uma das sete endemias de prioridade absoluta, devido a sua distribuição em vários continentes pelo seu alto grau de morbidade e mortalidade (MACHRI; MASCARENHAS; LAGO, 2013; MORADI-ASL, 2017).

No perímetro urbano, os cães são considerados os principais reservatórios de *Leishmania infantum* (*L. infantum*). Dessa forma, a eutanásia de cães soropositivos é indicada como uma das medidas de controle da leishmaniose visceral, embora não seja a principal recomendação do Ministério da Saúde do Brasil (OLIVEIRA et al., 2000; FERREIRA, 2021). As principais recomendações incluem o combate ao vetor por meio do uso de inseticidas de ação residual, o diagnóstico e tratamento dos casos humanos, e o manejo ambiental. Para serem efetivas, essas medidas devem ser realizadas de forma integrada (ALMEIDA et al., 2012; BRASIL, 2014).

No entanto, a partir de 2017, surgiu a possibilidade do tratamento da leishmaniose visceral em cães por meio do fármaco Milteforan® (Virbac), com seu princípio ativo sendo Miltefosina (BRASIL, 2014). Apesar do tratamento com esse fármaco demonstrar boa eficácia com melhora clínica desses animais, não é possível constatar a cura parasitológica dos cães, podendo induzir a uma cura temporária, não prevenindo a ocorrência de recidivas, e ainda eleva os riscos de surgimento de parasitos resistentes aos fármacos humanos, além disso, o cão pode continuar servindo como fonte de infecção para o vetor (BRASIL, 2014; CASTRO, 2020).

No ambiente silvestre, os reservatórios primários são principalmente os mamíferos (DANTAS-TORRES, 2007), entre as ordens dos roedores, marsupiais, edentados, carnívoros, felinos, primatas, quirópteros e canídeos silvestres (BRASIL, 2017). Porém, a literatura chama a atenção para outros animais que podem participar do ciclo de transmissão da *Leishmania* e outros parasitos como os que causam malária, sugerindo que as aves poderiam desempenhar algum papel como sentinelas no ciclo desses parasitos na natureza. (SOARES et al., 2012; RICKLEFS et al., 2016; MATHEUS et al., 2021).

A capacidade de dispersão de parasitos por espécies de aves já foi comprovada por alguns estudos. Ricklefs *et al.* (2016) apontaram a capacidade de dispersão dos protozoários causadores da malária aviária por aves migratórias das Américas, onde a taxa de infecção foi maior que a relatada em estudo semelhante realizado com espécies de aves da África e Europa, de autoria de Hellgren *et al.* (2007). Em 2021 foi relatado por Matheus *et al.* (2021), um espécime de *Alipiopsitta xanthops* (família Psittacidae) popularmente conhecido como papagaio galego, ave endêmica da América do Sul, a presença do DNA de *Leishmania* do Subgênero *Viannia*.

A família Psittacidae tem 87 espécies encontradas no Brasil, o que confere ao país a posição de maior diversidade de psitacídeos (GUEDES, 2012; CBRO, 2014; G1, 2019). Os indivíduos da espécie *Ara ararauna* tem sua distribuição geográfica desde o sul da América Central até a área central do Brasil (GUEDES, 2012; BARBOSA et al., 2023). Sua presença é registrada em diferentes estados, incluindo o Amazonas (AM), Paraná (PR), São Paulo (SP), Goiás (GO), Mato Grosso (MT) e Mato Grosso do Sul (MS) (GUEDES, 2012).

Em Mato Grosso do Sul, a *A. ararauna* tem sido objeto de estudo na área urbana desde 2009 (BARBOSA et al., 2012). No âmbito do Projeto Aves Urbanas – Araras na Cidade desde 2011 a espécie tem sido acompanhada (BARBOSA et al., 2012). Em Campo Grande, a *A. ararauna* foi reconhecida como ave símbolo por meio da Lei n.º 5.274, de 2015, e, em 2021, a Lei n.º 6.568 concedeu à cidade o título de "Capital das Araras". A cidade de Campo Grande destaca-se por suas diversas áreas verdes, como parques, reservas, manchas de buritizais e avenidas com matas ciliares, conferindo-lhe o status de uma das capitais mais arborizadas do país (SEMADUR, 2010; BARBOSA, 2015). Essas áreas desempenham um papel crucial na

conservação de uma ampla variedade de espécies que nelas habitam, incluindo as araras (BARBOSA, 2015). Apesar de estar situada em uma região dominada pelo Cerrado, Campo Grande abriga diversas espécies vegetais exóticas (PESTANA et al., 2011). Em 2010, foi registrado um total de 153.122 árvores nas vias urbanas do município, e apenas no centro da cidade existem 61 espécies arbóreas, sendo 30 nativas do Brasil, sendo as demais exóticas (SEMADUR, 2010; PESTANA et al., 2011).

Tendo em vista esses últimos casos em humanos e animais, e, levando em consideração que em Mato Grosso do Sul, segundo dados do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN), no período compreendido entre 1990 e 2016 foram confirmados 3.328 casos de LV e 5.548 casos de LC humanos (SINAN, 2019), além da ocorrência de *Leishmania* em um espécime de *Alipiopsitta xanthops* (MATHEUS et al., 2021), levantou-se a hipótese da espécie de Psittacidae *A. ararauna* ser um possível hospedeiro de *Leishmania* spp. em Mato Grosso do Sul.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmanioses

As leishmanioses são causadas por parasitos tripanossomatídeos da ordem *Kinetoplastida*, gênero *Leishmania* (ELMAHALLAWY, 2014) que compreendem doenças de transmissão vetorial e integram o grupo das doenças tropicais negligenciadas (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). São conhecidas 53 espécies desse gênero no mundo, 31 dessas espécies são transmitidas entre mamíferos e pelo menos 20 espécies são patogênicas aos humanos, no Velho e Novo Mundo, como a *Leishmania amazonensis* (*L. amazonensis*), *L. infantum* (*syn. Leishmania chagasi* '*L. chagasi*'), *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*), *Leishmania guyanensis* (*L. guyanensis*), dentre outras espécies (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017).

Tais agravos ocorrem principalmente nos países mais pobres, onde as populações apresentam moradias precárias, sem saneamento básico, que propicia o desenvolvimento do inseto vetor (WHO, 2024). Esta enfermidade atinge sobretudo as populações mais vulneráveis e com difícil acesso aos serviços de saúde (OPAS, 2019). Atualmente, mais de um bilhão de pessoas residem em regiões endêmicas de leishmaniose, enfrentando um risco constante de infecção. As estatísticas indicam que a cada ano surgem cerca de 30.000 novos casos de LV e mais de um milhão de novos casos de LC (OMS, 2024). Possuem distribuição global, porém, o maior número de casos ocorre na África, Ásia e Américas. De acordo com o levantamento realizado pela OMS, há mais de 12 milhões de pessoas infectadas com leishmaniose no mundo, destes, 68% dos casos de leishmaniose ocorrem na Índia, Sudão, Brasil e Quênia. (OPAS, 2024).

Nas Américas, a leishmaniose é encontrada em 18 países (OMS, 2017). Em levantamento realizado sobre os casos reportados à Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) compreendido entre anos de 2001 e 2017, foram notificados 940.396 casos de LC e LCM em 17 dos 18 países endêmicos. A OPAS, ao realizar um levantamento dos casos de LV reportados no mesmo período constatou a notificação de 59.769 casos novos nos 12 países onde a doença é endêmica, cerca de 57.582 (96%) dos casos novos foram notificados pelo Brasil (OPAS, 2019).

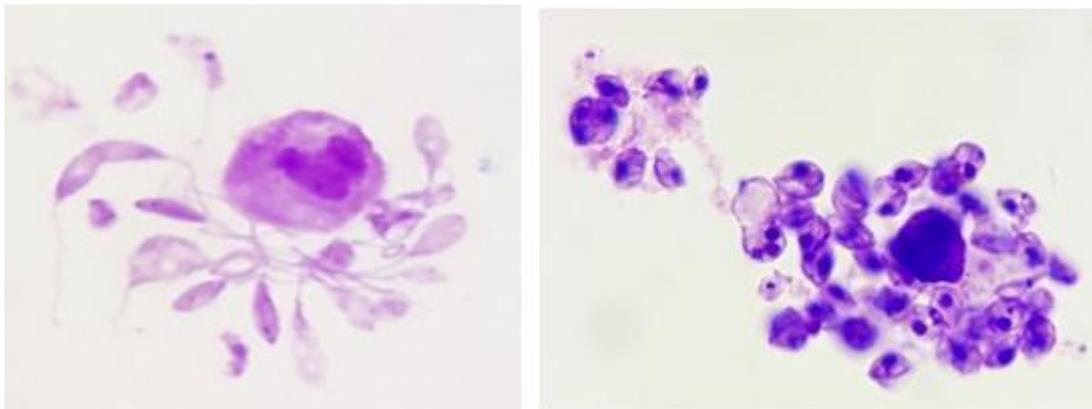
Durante o período de 2000 a 2017, foi possível observar uma significativa propagação de ocorrências abrangendo extensivamente as regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, estendendo-se adicionalmente para a Região Oriental do Paraguai, Nordeste da Argentina e Uruguai (SATRAGNO et al., 2017).

Em Mato Grosso do Sul, de acordo com o SINAN, no período compreendido entre 1990 e 2016, ocorreram 3.328 casos de LV confirmados em humanos, com notificação de 267 óbitos entre 2000 e 2016 (SINAN, 2019). Apesar de afetar os seres humanos, a transmissão desta infecção ocorre de forma acidental, sendo eles considerados hospedeiros acidentais no ciclo de infecção (FERREIRA et al., 2017).

2.1.1 Ciclo Biológico da *Leishmania* spp.

Os parasitos do gênero *Leishmania* spp. são heteróxeos (organismos parasitas que requerem mais de um hospedeiro para completar seu ciclo de vida) e apresentam duas formas morfológicas em seu ciclo biológico: promastigotas (forma com flagelo bem evidente, encontradas no trato digestivo dos flebotomíneos) e amastigotas (forma arredondada que não apresenta flagelo evidente, que vive no interior de células do Sistema Mononuclear Fagocitário “SMF” de mamíferos), representadas na Figura 1 (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017).

Figura 1 - Morfologia da *Leishmania* spp.



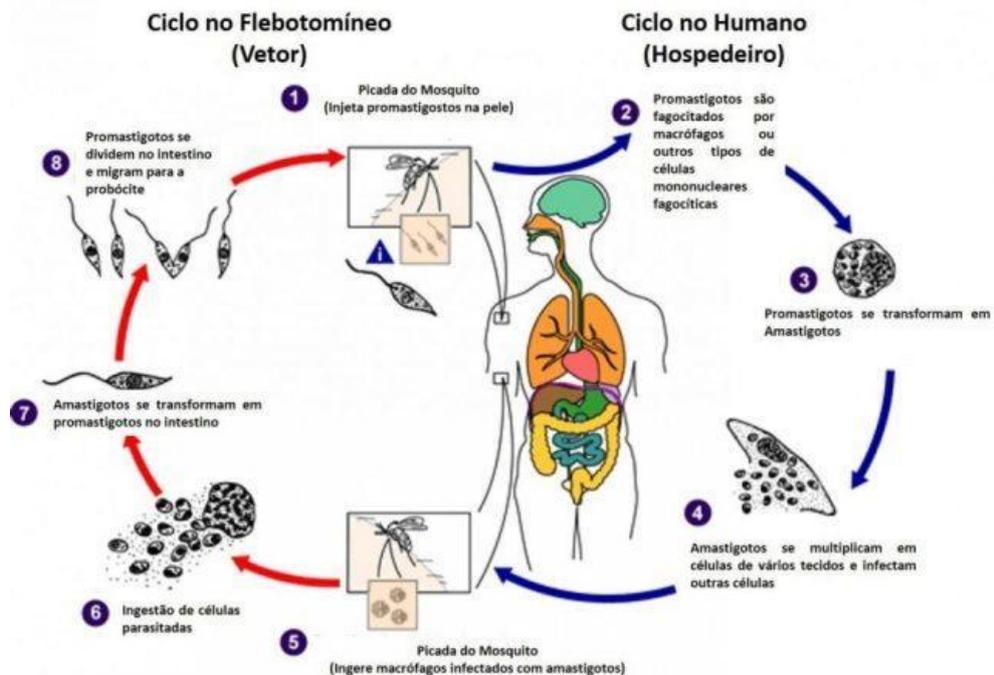
Legenda: À esquerda, forma flagelada promastigota e à direita forma amastigota intracelular do parasito em meio de cultura. Fonte: Jaqueline Zequini, 2022.

O ciclo biológico dos parasitos (Figura 2) nos hospedeiros vertebrados inicia-se quando o flebótomo fêmea inocula formas promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo no hospedeiro (CHANG et al., 1985, HARHAY et al., 2011). Após serem introduzidas, essas formas atingem as células do SMF, por exemplo

macrófagos, células dendríticas e passam por uma modificação morfológica diferenciando-se em amastigotas (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017). A partir daí inicia-se o processo de replicação por fissão binária na célula hospedeira até que ocorra a lise celular, liberando amastigotas na corrente sanguínea, sistema linfático e tecidos, assim parasitando novas células do hospedeiro (KASZAK; PLANELLAS; DWORECKA-KASZAK, 2015).

O ciclo se reinicia após as fêmeas do flebotomo realizarem o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado (Figura 2), neste momento elas se alimentam do sangue contendo as formas amastigotas que chegam ao intestino médio do inseto vetor e sofrem modificação para formas promastigotas procíclica, após multiplicações estas migram para a porção faríngea, na porção anterior a probóscide denominada válvula estomodeal, e diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas, estando aptas a infectar um novo hospedeiro durante o próximo repasto sanguíneo que o inseto vetor for realizar (KASZAK; PLANELLAS; DWORECKA-KASZAK, 2015; ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017).

Figura 2. Ciclo biológico das leishmanioses



Fonte: CDC - Center for Disease Control and prevention.

Um dos fatores que torna o sistema de transmissão da leishmaniose complexa é que a interação do inseto vetor com seu reservatório natural é multifatorial,

imprevisível e muito dinâmico, além de estar em constante mudança de acordo com as condições ambientais (OSHAGHI et al., 2006; MAIA; CAMPINO, 2011).

Esses insetos vetores habitam uma variedade de ambientes, incluindo pés de serra, boqueirões, matas virgens, domicílios (habitações humanas) e peridomicílios (abrigo de animais domésticos) (MADEIRO, 2013). Durante o dia, eles se escondem em locais úmidos e escuros, como fendas de rochas, frestas de paredes ou troncos de árvores (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

2.1.2 Flebótomos

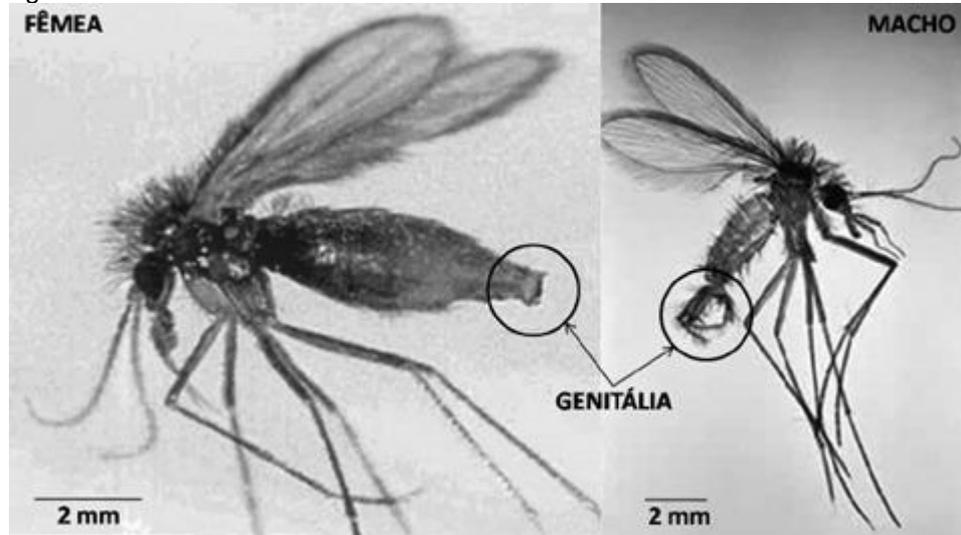
Os insetos vetores são dípteros da família Psychodidae e subfamília Phebotominae, com mais de 927 espécies descritas na literatura, diversos gêneros estão incluídos na epidemiologia das leishmanioses. Entre eles, destacam-se: *Lutzomyia*, *Bichromomyia*, *Nyssomyia*, *Psychodopygus*, *Migonemyia* que compreende grande parte das espécies nas Américas e *Phlebotomus*, que inclui os transmissores de leishmaniose da África, Europa e Ásia (ANVERSA et al., 2018; GALATI, 2023).

No Brasil são incluídos na transmissão, espécies como *Bichromomyia flaviscutellata* (*B. flaviscutellata*), *Lutzomyia longipalpis* (*L. longipalpis*), *Nyssomyia umbratilis* (*N. umbratilis*), *Nyssomyia whitmani* (*N. whitmani*), *Nyssomyia intermedia* (*N. intermedia*), *Psychodopygus wellcomei* (*P. wellcomei*) e *Migonemyia migonei* (*M. migonei*) (GALATI, 2023).

Os flebotomíneos (Figura 3) são pequenos insetos amarelados popularmente conhecidos como “mosquito-palha”, sua estrutura morfológica é caracterizada por um par de asas e um par de pequenas estruturas, chamados de halteres ou balancins, que promovem a estabilidade do voo e do zumbido, possuem vôo saltitante, podendo voar cerca de 400m em zigue-zague (MADEIROS, 2013). Os insetos adultos possuem o corpo coberto por cerdas com posição de repouso bem característico, as asas ficam juntas à região torácica. São insetos holometábolos (insetos que passam por uma metamorfose completa, que inclui quatro estágios distintos: ovo, larva, pupa e adulto), cada fêmea pode colocar uma postura mediana de 40 a 50 ovos, as larvas necessitam de quatro estágios até chegar à fase de pupa que se fixa no substrato e após alguns

dias ocorre eclosão do adulto (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; MADEIROS, 2013).

Figura 3. Inseto flebotomíneo fêmea e macho



Legenda: a imagem mostra dois espécimes de flebotomíneo, à esquerda se encontra a fêmea e à direita o macho, observando nos círculos o aparelho reprodutor que os diferem. Fonte: Somavilla, 2013.

Em ambiente controlado de laboratório, foi observado que machos e fêmeas podem sobreviver por um período entre 20 e 30 dias, já na natureza o seu tempo de vida é desconhecido (Brazil; Brazil, 2003). A umidade desempenha um papel crucial na sobrevivência do flebotomíneo em qualquer fase de vida, uma vez que eles não conseguem sobreviver em umidades relativas abaixo de 50%. No entanto, podem viver em temperaturas que variam de 16°C a 44°C e em altitudes de até 1500 metros acima do nível do mar (Brazil; Brazil, 2003). São insetos com hábitos crepusculares e noturnos, buscando abrigo em locais protegidos onde não ocorrem grandes variações ambientais como raízes, troncos de árvores e tocas de animais são alguns dos principais refúgios de flebotomíneos em ambientes florestais (CABANILLAS; CASTELLON; ALENCAR, 1995).

Os adultos (machos e fêmeas) alimentam-se de substâncias açucaradas (carboidratos) como néctar, seiva vegetal e afídeos (pulgões) ou outros homópteros (KELLY et al., 2017). Somente as fêmeas são hematófagas e iniciam a busca por uma fonte de sangue para se alimentar entre 3 a 5 dias após a sua emergência da pupa (esse tempo pode variar de acordo com a espécie e as condições ambientais) (KILLICK-KENDRICK, 1987). Esses insetos possuem hábitos ecléticos, ou seja,

alimentam-se do sangue de diversos animais, incluindo mamíferos (roedores, marsupiais, xenarthras, raposas, entre outros), aves (galináceos) (BRAY et al., 2010). Este hábito alimentar torna os flebotomíneos importantes transmissores de protozoários parasitas, no entanto poucas espécies de flebotomíneo são antropófagas, ou seja, que utilizam o sangue de seres humanos como alimento (CAVALCANTE et al., 2021).

Anteriormente considerada uma doença predominantemente rural, a leishmaniose encontrava habitat propício para o desenvolvimento do inseto vetor em florestas densas com grande quantidade de matéria orgânica (HASHIMOTO, 2014). Ao final dos anos 80, houve a adaptação dos vetores ao ambiente urbano, pois com o passar dos anos, acredita-se que a interferência dos seres humanos no habitat do vetor e hospedeiros selvagens esteja ocasionando a urbanização do ciclo de transmissão das leishmanioses (OLIVEIRA et al., 2000; BRASIL, 2014). O aumento dos desmatamentos e eliminação dos hospedeiros selvagens, levou a maior suscetibilidade de infecção do cão, promovendo a constante manutenção do ciclo de transmissão (BRASIL, 2017). Na área urbana, tanto o vetor quanto o parasito encontraram meios de adaptarem-se ao ambiente, principalmente nas periferias, onde a falta de saneamento e acúmulo de matéria orgânica favorecem o desenvolvimento do vetor e, conseqüentemente, a transmissão de *Leishmania* aos cães, considerados o principal reservatório da LV nesse ambiente (REIS et al., 2019).

A partir da literatura científica, podemos inferir que fatores internos nos flebotomíneos podem influenciar sua susceptibilidade ao desenvolvimento de *Leishmania* sp. Esses fatores sugerem uma coevolução entre as espécies de *Leishmania* e seus vetores flebotomíneos (KILLICK-KENDRICK, 1987). Estudos mais recentes conduzidos por Kelly e colaboradores, (2017) examinaram mais de 2000 fragmentos do intestino de *L. longipalpis* e investigaram a interação de *L. infantum* com as bactérias da microbiota intestinal. A eliminação das bactérias resultou em uma redução significativa na replicação da *Leishmania*, reduzindo assim sua capacidade de inocular formas metacíclicas em um hospedeiro (KELLY et al., 2017).

2.2 Endemicidade leishmaniose visceral humana

Nas Américas, a leishmaniose visceral é causada pelo parasito *L. infantum*, é uma das endemias prioritárias pela OMS devido à sua distribuição global e altos índices de morbimortalidade, causando enfermidade que afeta os seres humanos e animais após a picada de flebotomíneos fêmeas infectadas (MARCHI; MASCARENHAS; LAGO, 2013; MORADI-ASL, 2017).

As formas amastigotas de *L. infantum* manifestam um tropismo por órgãos que possuem uma alta concentração de células do SMF, tais como baço, fígado, medula óssea e linfonodos tanto em animais quanto em humanos (OPAS, 2019).

As manifestações clínicas em seres humanos abrangem um espectro variado, desde a ausência de sintomas por anos até a presença de sinais clínicos leves, moderados ou graves (ANVERSA et al., 2018). A evolução da doença pode, inclusive, resultar em autocura ou óbito quando não diagnosticada e tratada de maneira adequada (OPAS, 2019).

Os indícios da LV em seres humanos manifestam-se num intervalo que varia de 2 semanas a 2 meses após o contato com o parasito (WHO, 2024). Os sintomas clínicos podem ser confundidos com os de outras patologias, caracterizando-se por febre constante ou intermitente, esplenomegalia discreta (presente na maioria dos casos de LV), hepatomegalia (nem sempre evidente), linfadenopatia (sem sensibilidade à palpação), palidez mucocutânea (resultante de anemia severa) e perda de peso gradual e contínua (OPAS, 2019; WHO, 2024). Nos exames laboratoriais, é comum observar hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia, leucopenia, trombocitopenia, predispondo a infecções oportunistas e hemorragias (OPAS, 2019).

Figura 4. Sintomas de leishmaniose visceral e cutânea



Legenda: Imagem à esquerda apresenta um paciente com esplenomegalia, sintoma característico de leishmaniose visceral, à direita se trata de um paciente com sintomas de leishmaniose cutânea.

Fonte: Sanarmed, 2023.

A manifestação mais severa da leishmaniose visceral comumente impacta crianças, idosos, pessoas imunossuprimidas e indivíduos desnutridos, podendo resultar em óbito se não for identificada e tratada de maneira oportuna e apropriada, conforme indicado pela OPAS (OPAS, 2019).

2.2.1 Endemicidade leishmaniose visceral canina

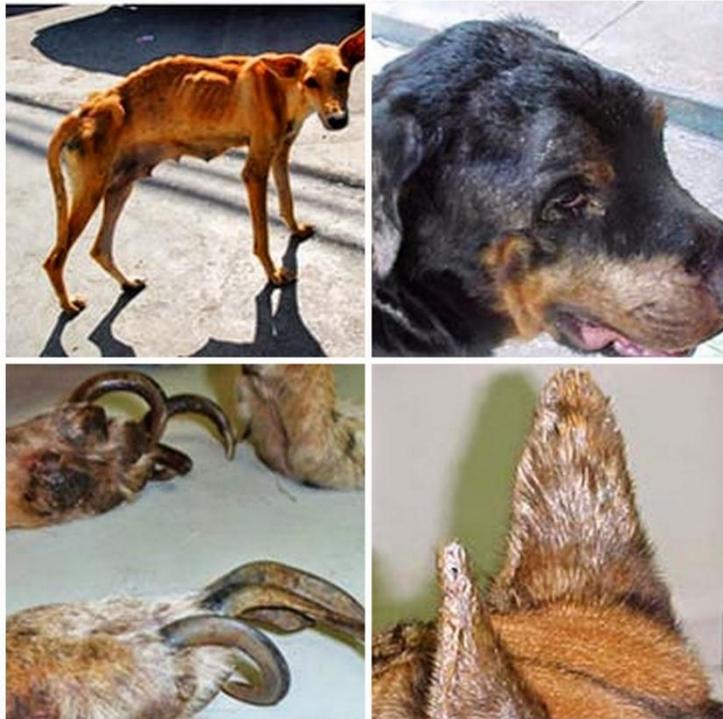
Na área urbana, o cão é identificado como o principal reservatório de *L. infantum*, contribuindo para a manutenção da doença (GONTIJO; MELO, 2004; MENDONÇA et al., 2017). A infecção canina ocorre de maneira análoga à observada em outros hospedeiros animais e em seres humanos (KASZAK; PLANELLAS; DWORECKA-KASZAK, 2015).

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma afecção sistêmica grave de progressão lenta, apresentando uma variedade de manifestações clínicas fortemente influenciadas pela resposta imunológica do animal infectado, podendo manifestar-se de forma oligossintomática ou sintomática (KASZAK; PLANELLAS; DWORECKA-KASZAK, 2015; OPAS, 2019).

Entre as manifestações clínicas clássicas observadas em cães, destacam-se lesões cutâneas (descamação e eczema), pequenas úlceras rasas (frequentemente localizadas nas orelhas, focinho, cauda e articulações) e pelagem opaca. Na fase avançada da doença, evidencia-se onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia,

alopecia, dermatites, úlceras cutâneas, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema nas patas, vômitos e hiperqueratose (ALMEIDA et al., 2012; CASTRO, 2020). Na fase terminal, ocorre uma paresia nas patas posteriores, caquexia, inanição e óbito. (FARIAS; ANDRADE, 2012.)

Figura 5. Sintomas de leishmaniose em cães



Legenda: Cães apresentando emagrecimento excessivo, lesões cutâneas, onicogribose, dermatites, sintomas comuns de leishmaniose. Fonte: Animais veterinária, 2023.

Muitos cães infectados permanecem assintomáticos por um período prolongado e cães sem sintomas representam um desafio significativo para a saúde pública, pois, mesmo na ausência de sinais clínicos, são capazes de transmitir o parasito para os flebótomos, que por sua vez irão transmitir para outros hospedeiros em um próximo repasto sanguíneo (GONTIJO; MELO, 2004; KASZAK; PLANELLAS; DWORECKA-KASZAK, 2015; OPAS, 2019).

2.3 Aves e reservatórios

As leishmanioses têm se mostrado altamente ajustadas aos grandes centros urbanos, demonstrando uma grande resistência dos vetores e parasitos às modificações ambientais causadas pelo homem (GONTIJO; MELO, 2004). Oshaghi e

colaboradores (2006) indicam que insetos vetores, em geral, possuem hábitos generalistas, podendo se alimentar de sangue de diferentes animais, o que amplia sua rede de alimentação e, conseqüentemente, de infecção. Isso pode levar à infecção de gado, humanos, aves e répteis, ampliando as possibilidades de reservatórios para doenças parasitárias. (OSHAGHI et al., 2006). Roque e Jansen, 2014, consideram reservatórios o conjunto de espécies que garantem a manutenção de um parasito no meio ambiente incorporado em um recorte de tempo e espaço. No geral, os indivíduos das espécies de reservatórios expressam hábitos sociais entre si, possuem um contato intenso com o inseto vetor e infecção parasitária leve de longo curso (ASHFORD, 1996; LANE, 2016).

No perímetro urbano o cão é o principal reservatório da leishmaniose (GONTIJO; MELO, 2004; MENDONÇA et al., 2017). Em Campo Grande, capital de Mato Grosso do Sul, foram registrados 1.670 cães positivos para leishmaniose em 2022 (BRASIL, 2023). Esses dados foram obtidos de tutores que levaram seus cães ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) para realização de testes (BRASIL, 2023). Na mesma cidade, em 2019, foi realizado o Inquérito Canino Amostral para o diagnóstico de LVC nas sete macrorregiões: Centro, Imbirussu, Prosa, Segredo, Bandeira, Anhanduizinho e Lagoa. As três últimas apresentaram as maiores taxas de prevalência de infecção, respectivamente (BRASIL, 2021).

No ambiente silvestre, as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) desempenham o papel como reservatórios de *Leishmania* spp. (BRASIL, 2014). Porém, frente a literatura nos deparamos com relatos de contato de aves silvestres com este parasito. Otranto *et al.* (2010) relataram, com técnicas de sorologia, a infecção de *L. infantum* nas espécies de aves *Anser anser* e *Phasianus colchicus*. Outro caso mais recente, em Mato Grosso do Sul, relatando a presença do DNA de *Leishmania* do Subgênero *Viannia* em um espécime de *Alipiopsitta xanthops* que se encontrava internado no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS) da capital Campo Grande (MATHEUS et al., 2021). Além disso, foi relatado que as aves podem albergar a *Leishmania* spp, mas as informações disponíveis são limitadas por escassez de estudos relacionados a esse tema (MORALES et al., 2019).

Cientistas já constataram a existência de predileção do inseto vetor em realizar o repasto sanguíneo em espécies *galináceas*, esse hábito pode ser atribuído pelas

características morfofisiológicas dessas aves, tais como a temperatura corpórea de 41°C e a alta emissão de CO₂ (BRAY et al., 2010). Alguns cientistas destacam a possibilidade de as aves estarem atuando como sentinelas na detecção da presença de vetores em áreas endêmicas para *Leishmania* (Lei nº 1/2023 define sentinela como um organismo usado como indicador para monitorar a presença, prevalência ou disseminação de uma doença em uma determinada área) (SOARES et al., 2012). Segundo Flores e Weiblen (2009), as aves selvagens podem ser usadas como hospedeiros sentinela, para detectar a disseminação de doenças como a febre do Nilo Ocidental.

2.3.1 Araras-canindé

A família Psittacidae abriga 421 espécies distribuídas globalmente, sendo 87 dessas espécies encontradas no Brasil, o que confere ao país a posição de maior diversidade de psitacídeos (GUEDES, 2012; CBRO, 2014; IUCN, 2023). Essa família encontra-se significativamente presente em ambientes urbanos, com algumas espécies se destacando nesse contexto, tais como a *Ara ararauna* (arara-canindé), *Ortopsittaca manilatus* (maracanã-de-cara-amarela), *Eupsittula aurea* (periquito-rei), *Psittacara leucophthalmus* (periquitão-maracanã), *Brotogeris chiriri* (Periquito-de-encontro-amarelo) e *Diopsittaca nobilis* (maracanã-nobre) (FRANCHIN; JÚNIOR, 2004; PEREIRA et al., 2005; MARQUES, 2012; GUEDES, 2012).

A. ararauna, destaca-se por apresentar partes superiores azuis, inferiores amarelas, fronte verde, garganta negra e possui fileiras de penas faciais negras (MONTAÑO et al., 2009; BARBOSA et al., 2012). Possui um bico alto e recurvado, além de unhas muito fortes que auxiliam na manipulação de alimentos e na escalada de troncos. Não possuem dimorfismo sexual e apresentam o comportamento de monogamia, trocando de parceiro somente em caso de morte de um dos indivíduos (BIANCHI, 1998; GUEDES, 2012).

Figura 6. *Ara ararauna* (arara-canindé)



Legenda: Casal de Arara-canindé em cima de seu ninho. Fonte: SeMA-UnB, 2023.

Para *A. ararauna*, a oviposição ocorre de forma assíncrona, tal qual para as outras espécies de psitacídeos (BIANCHI, 1998; GUEDES, 2012). Esse processo se inicia após o preparo do ninho (PEREIRA et al., 2012; BARBOSA et al., 2023). O processo de construção e ocupação de ninhos para a reprodução das *A. ararauna*, ocorre em troncos de palmeiras mortas, como palmeira-imperial (*Roystonea oleracea*) e buriti (*Mauritia flexuosa*) (PEREIRA et al., 2012; BARBOSA et al., 2023). A incubação dos ovos dura, em média 26 dias, podendo, cada fêmea colocar de um a seis ovos por estação reprodutiva (BIANCHI, 1998; GUEDES, 2012). Após a eclosão, os filhotes ficam aos cuidados dos pais no ninho por cerca de 90 dias, até o primeiro voo. Após voar, acompanham os pais e necessitam de seus cuidados por cerca de um ano até atingirem a maturidade sexual (GUEDES, 2012; PEREIRA et al., 2012; BARBOSA, 2018).

Embora seja comum na natureza, as populações dessas aves vêm sofrendo declínio em algumas regiões e já foram extintas em outras, principalmente devido à perda de hábitat e à captura ilegal de exemplares silvestres (GWYNNE et al., 2010; IUCN, 2023).

A distribuição geográfica da *A. ararauna* abrange extensivamente o território brasileiro, estendendo-se desde o sul da América Central até a área central do Brasil (GUEDES, 2012; BARBOSA et al., 2023). Sua presença é registrada em diferentes estados, incluindo o Amazonas, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e, mais

recentemente, Paraná e São Paulo (GUEDES, 2012). A dieta das *A. ararauna* é bastante variada, com a capacidade de se alimentar de uma gama diversificada de itens, incluindo frutas, sementes, flores, folhas, partes apicais e galhos (TUBELIS, 2009; GUEDES, 2012; BARBOSA et al., 2023).

2.4 Saúde única e aves

O termo “Uma Só Saúde” ou “Saúde Única” chegou no Brasil em meados dos anos 2000, mas o conceito de saúde em humanos, animais e ambiente vem de civilizações antigas, podendo ser atribuído ao conhecimento tradicional dos povos indígenas (BRASIL, 2024). Saúde Única é uma abordagem interdisciplinar que integra a saúde humana, animal e ambiental, visando equilibrar e otimizar os recursos e ações em saúde, incluindo a promoção, de forma sustentável, integrada e preventiva, com ação dos diferentes setores e da sociedade (FAO, 2021).

Uma abordagem “Uma Só Saúde” é fundamental para prevenir ameaças na interface homem-animal-ambiente, protegendo também a biodiversidade (FAO, 2021). VARELLA (2022), destaca sobre a importância da emergência climática associada com a diminuição da biodiversidade e o aumento do risco de outras pandemias, zoonoses ou doenças que ameaçam a saúde humana, a segurança alimentar e o meio ambiente.

Garantir a saúde das plantas e animais evitará o risco de propagação de doenças transfronteiriças que afetam negativamente a subsistência, o comércio e o crescimento econômico de nações do globo (BRASIL, 2016; VARELLA, 2022). Cerca de três em cada quatro doenças infecciosas emergentes em pessoas se originam de animais domésticos ou selvagens, e há evidências crescentes de que os principais fatores são mudanças na paisagem e perda de biodiversidade (VARELLA, 2022).

FAO (2021) ainda destaca que 60% das doenças que infectam humanos são de origem zoonóticas e 75% passam entre diferentes espécies causando grandes impactos e afetando a disponibilidade e qualidade de alimentos de origem animal. Por exemplo, várias aves mantidas em contato umas com as outras, quando estão em granjas, gaiolas no ambiente domiciliar/cativeiro, propiciam uma maior disseminação das doenças infecciosas (SILVA et al., 2008).

Enfermidades como a influenza aviária e a malária podem acometer os seres humanos e já foram responsáveis por uma alta taxa de letalidade, e a possibilidade

de transmissão entre os seres humanos pode representar um alto risco para a população mundial (RICKLEFS et al., 2016; BRASIL, 2023).

Assim como foi na última pandemia que se tem registro, que ocorreu em 2020, com o agente etiológico Sars-Cov-2 (WHO, 2021). A hipótese mais aceita entre os cientistas é que o vírus tenha passado de morcegos para outro animal antes de ser transmitido para humanos (WHO, 2021). Zhou e colaboradores (2020) apontam pangolins como possíveis hospedeiros intermediários os primeiros casos estavam ligados a um mercado de frutos do mar e animais vivos em Wuhan, sugerindo que a transmissão inicial para humanos poderia ter ocorrido em um ambiente de contato próximo com animais infectados (WHO, 2021).

Dessa forma, a ciência precisará empregar uma ousada mudança de paradigma para abordagens integradas, transdisciplinares e convergentes, assim certamente terá maiores chances de sucesso (VARELLA, 2022).

2.5 A aplicação da PCR na detecção de *Leishmania* spp.

A alta especificidade e sensibilidade apresentadas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) auxilia na detecção de patógenos em pesquisas moleculares e estudos epidemiológicos. No diagnóstico da leishmaniose, assim como na detecção de agentes etiológicos de outras doenças infecciosas e parasitárias, a PCR proporciona a identificação do parasito, confirmando os casos em animais, além de contribuir com estudos de vetores e animais silvestres como possíveis reservatórios (LOPES et al., 2016).

A PCR permite a detecção molecular dos patógenos pelo uso de iniciadores (sequência de oligonucleotídeos conhecidos) que se hibridizam com alvos do DNA do parasito, o que proporciona sua replicação em ampla escala. Posteriormente, por meio do sequenciamento, dependendo da região amplificada na PCR, é possível identificar a espécie envolvida na infecção (FERREIRA et al. 2015; LOPES et al., 2016).

No estudo da LV, a escolha da amostra, assim como, o direcionamento dos alvos genéticos a serem pesquisados aumentam a capacidade de detecção do conteúdo molecular do parasito (FARIA; ANDRADE, 2012). Dentre os alvos genéticos, o conteúdo mitocondrial (minicírculo k-DNA ou cinetoplasto) apresenta um alto grau

de resposta, por serem pouco afetados pela substituição de nucleotídeos durante sua replicação (LOPES et al., 2016; ROLIM et al., 2016).

Destaca-se também a *Leishmania* nested PCR (*Ln*-PCR) por sua alta sensibilidade em detectar as regiões-alvo referentes à *Leishmania*. CRUZ et al. (2002) relatam que através dos programas BLAST e FASTA foi constatado a especificidade dos iniciadores R223 e R333 que chegou à 100% para *Leishmania*, confirmando que nenhuma amplificação ocorrerá com outros tripanosomatídeos. A *Ln*-PCR realizada em amostras de sangue de pacientes coinfectados com *Leishmania* e Vírus da imunodeficiência humana (HIV) mostrou um alto nível de sensibilidade em comparação com outros métodos diagnósticos convencionais, confirmando os resultados obtidos com o PCR por outros autores (NUZUM et al., 1994; ADHYA et al., 1995).

O ensaio de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição da PCR (PCR-RFLP) para o gene da proteína de heat-shock protein 70 (HSP70) foi apresentado como uma ferramenta simples e universal para a identificação de espécies de *Leishmania* tanto do Novo quanto do Velho Mundo (MONTALVO et al., 2010). Em geral, os genes da família de proteínas do HSP70, podem ter regiões conservadas, que são importantes para a função da proteína, e regiões variáveis, que podem divergir entre as espécies. Desta forma, há a possibilidade de detectar o DNA de *Leishmania* em amostras biológicas e, após realização de uma técnica com enzima de restrição, diferenciá-los entre as espécies (GRAÇA et al., 2012; FERREIRA et al., 2017).

2.6 Aplicação do georreferenciamento no mapeamento de patógenos

O georreferenciamento consiste em um conjunto de tecnologias que atribui coordenadas geográficas precisas (como latitude e longitude) a um objeto, imagem ou conjunto de dados (LONGLY et al., 2015). Quando esses dados são posicionados corretamente em um sistema de referência espacial, produzem informações geográficas valiosas, contribuindo para o mapeamento de áreas de risco e o reconhecimento do território estudado (NARDI et al., 2013; RIBEIRIO et al., 2014; LONGLY et al., 2015).

Os dados do geoprocessamento podem ser processados por meio de softwares dos sistemas de informações geográficas (SIG) e hardware (Global Positioning System “GPS”), ou imagens de satélites (como google Earth) que possibilitam a criação de mapas e gráficos dirigidos para análise do objeto de estudo (BARCELLOS et al., 2004).

Ao ser aplicado nas ações de saúde, o georreferenciamento permite o mapeamento da distribuição de doenças, avaliação de riscos e o planejamento de ações de prevenção de doenças infecciosas e não transmissíveis (RIBEIRIO et al., 2014; NARDI et al., 2013).

Segundo Barcellos e colaboradores (2017), o SIG tem se mostrado uma ferramenta muito importante na pesquisa relacionadas à saúde. O trabalho de Silva e colaboradores (2016) utilizou o SIG para mapear a distribuição espacial de pacientes do Hospital Universitário Clemente de Faria (HUCF) com Doenças Tropicais Negligenciadas na região norte de Minas Gerais, em Montes Claros.

O uso do georreferenciamento na vigilância da LV permite pontuar áreas e visualizar a distribuição dos cenários da doença, possibilitando nortear as ações de controle da doença visando diminuir sua transmissão (ARAUJO, 2017; D' ANDREA; GUIMARÃES, 2018).

Silva e colaboradores (2007), estudaram o comportamento e sazonalidade do *L. longipalpis*, durante os anos 2003 a 2005, na cidade de Campo Grande. Por meio do georreferenciamento, eles puderam demonstrar em quais ecótopos esse inseto foi encontrado, além de identificar em quais locais e estações ele foi mais abundante (SILVA et al., 2007).

Outro estudo que utilizou o georreferenciamento com o objetivo de aprimorar as estratégias de controle da doença foi realizado por Marques *et al.* (2017), que analisaram a incidência da leishmaniose visceral nos bairros de Campo Grande entre os anos de 2007 e 2011, utilizando ferramentas de análise espacial.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar as araras-canindés como hospedeiras de *Leishmania* spp. em Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar coleta de sangue em indivíduos da espécie *A. ararauna* de vida livre e em reabilitação.
- Detectar a presença de DNA de *Leishmania* spp. em amostras de sangue da *Ara ararauna* (Arara-Canindé) de Campo Grande-MS.
- Comparar ocorrência de *Leishmania* spp. em *A. ararauna* de vida livre com indivíduos em reabilitação no CRAS.
- Identificar as espécies de *Leishmania* spp. presentes nos espécimes infectados.
- Correlacionar a distribuição de *Leishmania* spp. detectadas em aves com a prevalência dos casos caninos relatados nas regiões estudadas nos últimos anos.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Transversal, descritivo, usando dados primários e secundários.

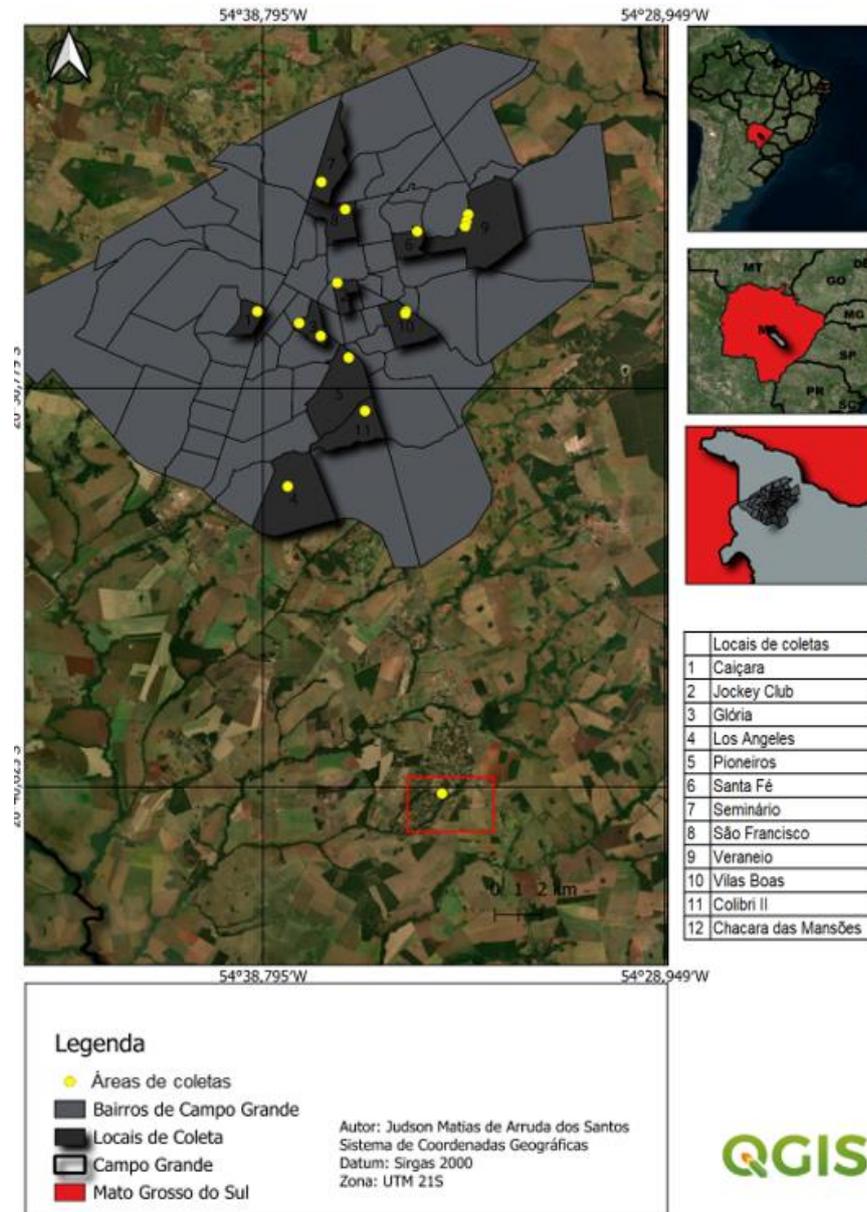
4.2 Aspectos éticos

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA) da Universidade Anhanguera-Uniderp (Protocolo nº 3147/2023) (Anexo I).

4.3 Local e período da pesquisa

O trabalho foi realizado no município de Campo Grande (latitude de 20°26'34" Sul e longitude de 54°38'47" Oeste), capital do estado de Mato Grosso do Sul (Figura 4) (IBGE, 2023). O município possui uma área aproximada de 252,63 Km², dividido em 79 bairros, com uma população estimada de aproximadamente 898.100 habitantes (IBGE, 2022). A capital se situa no bioma Cerrado e apresenta um percentual de 96,3% de domicílios urbanos e vias públicas com arborização no censo de 2010 (IBGE, 2023).

Figura 7. Distribuição espacial de ninhos das aves amostradas no Município de Campo Grande-MS.



Fonte: Dados da pesquisa, 2024. Legenda: Áreas de coletas distribuídos em diferentes localizações da cidade de Campo Grande, sendo eles: Caçara (1), Jockey Club (1), Glória (2), Los Angeles (1), Pioneiros (1), Santa Fé (2), Seminário (1), São Francisco (1), Veraneio (6), Vilas Boas (2) e Colibri II (1). Houve também uma coleta em um ponto dentro da região periurbana da cidade, na Chácara das Mansões (1).

As coletas com o Projeto Aves Urbanas – Araras na Cidade foram realizadas em 11 bairros na área urbana e uma periurbana (Figura 4) entre novembro de 2022 a janeiro de 2023. Já as coletas realizadas com o CRAS ocorreram nos meses de março e agosto de 2023.

4.4 População de estudo, coleta e armazenamento das amostras

Neste estudo, foi analisado o sangue de indivíduos da espécie *A. ararauna* em reabilitação, sendo a maioria oriunda de vida livre e que se encontrava no CRAS, além de filhotes de vida livre monitorados pelo Projeto Aves Urbanas – Araras na Cidade, desenvolvido pelo Instituto Arara Azul (ITA), no perímetro urbano e periurbano da cidade de Campo Grande, capital de Mato Grosso do Sul. O número amostral foi obtido por livre demanda, e os critérios de inclusão das aves em reabilitação no CRAS incluíram a coleta de amostras de sangue de todos os espécimes de *A. ararauna* (filhotes e adultos) que estivessem nos recintos da área de voo, alojamento e quarentena. Para as aves de vida livre, o critério consistiu na captura de filhotes de *A. ararauna* com mais de 60 dias de vida nos ninhos monitorados pelo Projeto Aves Urbanas – Araras na Cidade, executado pelo ITA (Figura 5).

Figura 8: Procedimento de captura de filhote *A. ararauna*.



Legenda: Procedimentos realizados na fase de coleta de material biológico das araras. Observa-se em “A” escada utilizada para acessar os ninhos de araras; “B” profissional realizando coletas de informações e fotografias dos ninhos; “C” foto mostrando o interior do ninho, contendo dois filhotes de araras-canindés e “D” coletas de informação de tamanho corpo e bico, peso e coleta de sangue. Fonte: Instituto Arara Azul, 2023.

As coletas dos indivíduos monitorados pelo Projeto foram realizadas em filhotes com mais de 60 dias idade, independente do sexo do animal. Os filhotes foram capturados dentro dos ninhos naturais, que se encontravam em palmeiras. Foi seguindo os métodos adaptados de escalada em árvores, utilizando uma escada de 9,8 metros e alguns equipamentos utilizados para ascensão (corda, mosquetões, cadeirinha e peitoral) (GUEDES; SEIXAS, 2002; BARBOSA, 2015). Após a coleta, o filhote foi devolvido ao seu ninho de origem. Ambas as coletas (Projeto Aves Urbanas e CRAS) foram realizadas por biólogos e médicos veterinários habilitados.

As amostras de sangue total foram obtidas por meio de coleta com seringas de 3 mL e agulhas 12,7x0,33mm acesso pela veia ulnar. Foi coletado aproximadamente 1 mL de sangue de cada espécime e as amostras foram armazenadas em microtubo cônico de 1,5 mL por indivíduo (CALLE; CEVALLOS, 2022). As amostras foram identificadas no ato da coleta, quando coletado pelo Projeto Aves Urbanas – Araras na Cidade, continham o número da anilha, número do ninho, ordem de nascimento (determinado pelo nível de desenvolvimento do indivíduo em comparação com os demais do mesmo ninho) e data de coleta. Já para as coletas realizadas no CRAS os tubos foram identificados com data e sequência da coleta e anilha da ave. Após identificação, as amostras foram acondicionadas em caixa térmica refrigerada até o momento de envio ao laboratório para conservação em freezer -20°C até o momento da realização dos testes moleculares.

4.5 Detecção de DNA de *Leishmania spp.* em amostras de sangue periférico de aves

4.5.1 Extração e dosagem de DNA das amostras sanguíneas

As amostras de sangue das araras foram submetidas à extração de DNA no laboratório de Parasitologia e Biologia Molecular da Universidade Anhanguera UNIDERP, seguindo o protocolo de extração de sangue do kit Wizard®- Genomic DNA Purification kit (Promega), resultando em um volume final de 100 µL de DNA. O DNA foi quantificado utilizando 1 µL de amostra contendo o DNA inserida no compartimento de medição do espectrofotômetro Thermo Scientific™ Invitrogen™ Nanodrop™ One, para verificação da concentração de DNA em cada amostra. O espectrofotômetro

utiliza uma fonte de luz ultravioleta (UV), e a absorvância da luz pela amostra é medida em comprimentos de onda específicos entre 260 nm a 280 nm. Essa etapa é realizada a fim de verificar a concentração de DNA de cada amostra para garantir o sucesso da extração e possibilitar seu uso na etapa de PCR, na qual é necessária uma quantidade específica ou mínima de DNA para amplificação.

4.5.2 Amplificação do DNA e leitura dos resultados

Para as amostras, foram utilizados os protocolos descritos (SILVA et al., 2000; CRUZI et al., 2002; GRAÇA et al., 2012; FERREIRA et al., 2017). Após a purificação do DNA, foi preparado um mix contendo os seguintes volumes: água purificada para PCR = 10 µL, Buffer = 2,5 µL, MgCl₂ = 1,5 µL, DMSO = 2,5 µL, dNTPs [10mM] = 0,5 µL, kDNA A [10mM] = 1,0 µL, kDNA B [10mM] = 1,0 µL, Taq DNA polimerase [5U/µL] = 1,0 µL, formando o volume final de 20 µL por amostra.

A sequência de primers utilizados como alvo foram: kDNA A 5' (C/G)(C/G)(G/C)CC(C/A) CTA T(T/A)T TAC ACC AAC CCC 3' e kDNA B: 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3' (SILVA et al., 2000).

Para a amplificação do DNA, foram utilizados 20 µL do mix e 5 µL de amostra para cada ave testada, assim como, para o controle positivo (DNA de *Leishmania* spp.) e controle negativo (apenas o mix com adição de 5 µL de água de PCR). A amplificação das amostras foi realizada seguindo o procedimento de ciclos no termociclador 1 x 94°C por 4 minutos, 35 x (94°C/30s, 60°C/30s, 72°C/30s), 1 x 72°C por 5 minutos. O produto final da amplificação apresenta banda única de 120 pares de bases (pb).

Todas as amostras, após análise dirigida ao kDNA, passaram para a análise de PCR dirigida ao alvo do SSUrRNA, que é uma região conservada entre todas as espécies de *Leishmania*, foram utilizados os primers R221: 5' GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG 3' e R332: 5' GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG 3' (CRUZI et al., 2002) e às condições do mix seguiram o seguinte protocolo: água purificada para PCR = 27,6 µL, Buffer = 5 µL, MgCl₂ = 3 µL, dNTPs [10mM] = 1 µL, R221 [10mM] = 1,0 µL, R332 [10mM] = 1,0 µL, Taq DNA polimerase [5U/µL] = 1,4 µL, sendo o volume final de 40 µL por amostra.

Para a amplificação do DNA, foram utilizados 40 µL do mix e 10 µL de amostra para cada ave testada, assim como, para o controle positivo (DNA de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guianensis*) doados pela Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC) e controle negativo (apenas o mix com adição de 10 µL de água de PCR). A amplificação das amostras foi realizada no termociclador seguindo o procedimento de ciclos 1 x 94°C por 5 minutos, 30 x (94°C/30s, 60°C/30s, 72°C/30s), 1 x 72°C por 10 minutos.

Logo após, o produto dessa reação (amplicons) foi diluído (5:200) para aplicação em uma nested PCR (LnPCR), da seguinte maneira: 5 µL de amplicon do produto final da amplificação em 200 µL de água purificada de PCR, esse preparo foi necessário para realizar a LnPCR.

Na LnPCR com os primers R223: 5' TCC CAT CGC AAC CTC GGT T 3' e R333: 5' AAA GCG GGC GCG GTG CTG 3' (CRUZI et al., 2002), foi feito um mix nas proporções de: água purificada para PCR = 9,5 µL, Buffer = 2,5 µL, MgCl₂ = 1,5 µL, dNTPs [10mM] = 1 µL, R221 [10mM] = 0,5 µL, R332 [10mM] = 0,5 µL, Taq DNA polimerase [5U/µL] = 0,7 µL, sendo seu volume final de 15 µL por amostra, seguindo as orientações do autor Cruz e colaboradores (2002). Para a amplificação do DNA, foram utilizados 15 µL do mix e 10 µL do amplicon preparado anteriormente, produto da primeira reação. Depois do preparo do mix, as amostras foram para o termociclador, seguindo o procedimento de ciclos 1 x 94°C por 4 minutos, 30 x (94°C/30s, 65°C/30s, 72°C/30s), 1 x 72°C por 10 minutos. O produto final da amplificação apresenta banda única de aproximadamente 359 pb.

As amostras que foram positivas em pelo menos uma das PCRs citadas acima passaram para a PCR dirigida ao alvo HSP70C, utilizando as condições do mix nas seguintes proporções: água purificada para PCR = 17,36 µL, Buffer = 2,5 µL, MgCl₂ = 1,5 µL, dNTPs [10mM] = 0,5 µL, HSP70C 1 [20mM] = 1,0 µL, HSP70C 2 [10mM] = 1,0 µL, Taq DNA polimerase [5U/µL] = 0,14 µL, formando o volume final de 24 µL por amostra. Para amplificação do alvo genético foi utilizado os iniciadores HSP70C 1: 5' GGA CGA GAT CGA GCG CAT GGT 3' e HSP70C 2: 5' TCC TTC GAC GCC TCC TGG TTG 3' (GRAÇA et al., 2012; FERREIRA et al., 2017). Para a amplificação do DNA foram utilizados 24 µL do mix e 1 µL de amostra para cada ave, assim como, para o controle positivo (DNA de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guianensis*) e controle negativo (apenas o mix com adição de 1 µL de água de PCR). Para a

amplificação das amostras foi utilizado o termociclador seguindo o procedimento de ciclos 1 x 94°C por 5 minutos, 30 x (94°C/30s, 61°C/1m, 72°C/3m), 1 x 72°C por 8 minutos. Foi necessário realizar uma reamplificação utilizando os amplicons gerados da primeira reação, seguindo as mesmas condições da etapa do mix e termociclador descritas acima. O produto final desta PCR apresenta banda única de 234 pb.

Para a elaboração dos mixes das diferentes PCRs deste trabalho, foram usados os reagentes da marca Ludwig®. Já na etapa no termociclador, foi utilizado um automático SimpliAmp™-Thermo Fisher Scientific™, após a etapa de amplificação no termociclador as amostras eram mantidas a 4°C até o momento da eletroforese em gel de agarose a 2%, corado por 8 µL de Sybr Safe DNA gel stain (Invitrogen), e o marcador de peso molecular utilizado foram os ladders de 100pb e 50pb da Ludwig®. Foram adicionados 10 µL do produto de amplificação de cada amostra nos poços do gel de agarose, e a corrida eletroforética foi realizada durante 50 minutos a 90 volts. A revelação do produto amplificado foi realizada com auxílio do fotodocumentador para gel de eletroforese L-PIX TOUCH da LOCCUS®, arquivando as imagens em formato digital.

Após todas as etapas de PCR e análise de resultados, as amostras de aves amplificadas na PCR dirigida ao HSP70C passaram para última etapa, a técnica de RFLP HAE III (Promega), sendo o mix nas proporções de: água purificada para PCR = 2,5 µL; Enzyrna buffer = 1,5 µL; HAE III = 1 µL. A região de clivagem 5'... GG*CC ...3' 3'...CC*GG... 5' (GRAÇA et al., 2012).

Após preparo do mix, foi encaminhado ao termociclador automático SimpliAmp™-Thermo Fisher Scientific™, onde ficou incubado por 2 horas em 37°C. Logo após a incubação, foi preparado um gel de agarose a 3%, corado por 8 µL Sybr Safe DNA gel stain (Invitrogen) e o marcador de peso molecular utilizado foi o ladder de 50pb da Ludwig®. Foram adicionados 5 µL do produto de amplificação de cada amostra nos poços do gel de agarose e a corrida realizada durante 50 minutos a 90 volts. A revelação do produto amplificado foi realizada com auxílio do fotodocumentador para gel de eletroforese L-PIX TOUCH da LOCCUS®, arquivando as imagens em formato digital.

4.6 Georreferenciamento

Os ninhos que tiveram amostras coletadas foram georreferenciados para a confecção de mapas utilizando o software Quantum GIS 4.3 (QGIS), foi realizado com os dados latitudinais e longitudinais fornecidos pelo Projeto Aves Urbanas-Araras na Cidade.

5 RESULTADOS

Foram coletadas amostras de 28 espécimes de *A. ararauna* de vida livre e 19 espécimes em reabilitação, totalizando 47 indivíduos amostrados.

5.1 Análise molecular

5.1.1 Dosagem de DNA

O estudo demonstrou que, na extração de DNA das 47 amostras de sangue de *A. ararauna* coletadas, a maior concentração de DNA obtida foi de 420,2 ng/μL, enquanto a menor dosagem observada foi de 0,1 ng/μL. No total, a mediana da concentração de DNA dessas amostras foi de 43,90 ng/μL (Tabela 1).

Tabela 1: Resultado dosagem de DNA.

Amostras (n=47)	%	Concentração em ng/μL
8	17,02	0,1 – 1
16	34,04	1,1 - 10,3
14	29,79	13,1 - 109,6
9	19,15	113 - 420,2

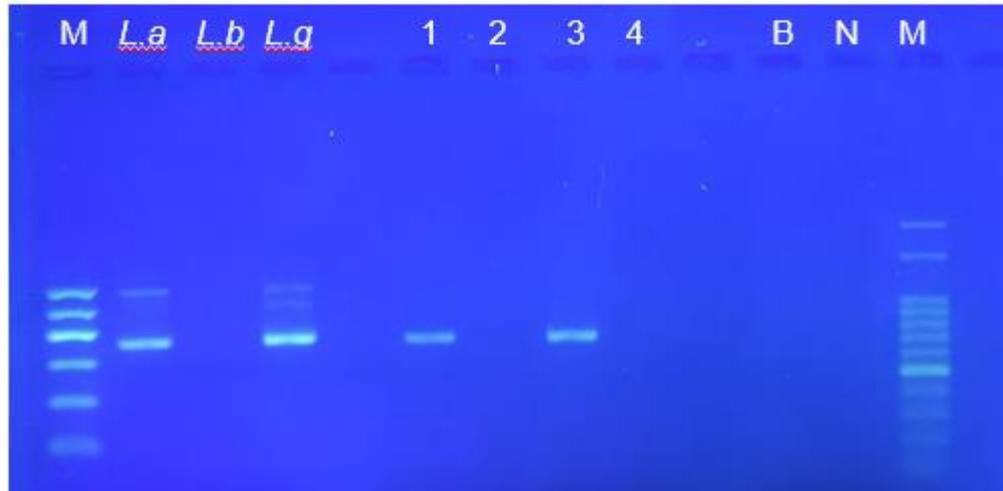
Fonte: Dados da pesquisa.

A tabela acima refere-se a todos os resultados obtidos por meio da dosagem de DNA das amostras, após passarem pela etapa de extração de sangue das aves coletadas nesta pesquisa. Sendo os números de 1 a 47 o código das amostras e a variação de 0,1 ao 420,2 ng/μL o resultado que cada amostra desempenhou na leitura da concentração.

5.2 Prevalência de casos positivos

Um total de seis (12,7%) aves apresentaram positividade em pelo menos um dos diferentes alvos genéticos testados (kDNA e/ou SSUrRNA), sendo quatro de vida livre e duas em reabilitação (Figura 6).

Figura 9: Resultado Ln-PCR visualizado em gel agarose.



Legenda: M – Marcador molecular 100 pb, *L.a* (*Leishmania amazonensis*), *L.b* (*Leishmania braziliensis*), *L.g* (*Leishmania guianensis*), amostras 1 a 4 amplificadas em 359 pb, B – Branco (H₂O), N – Negativo (Amostra negativa), M – Marcador molecular 50 pb.

A concentração de DNA das amostras positivas variou entre 22,7 ng/μL e 239,2 ng/μL. Para a região do HSP70C, os testes foram realizados apenas nas amostras que apresentaram positividade em reações dirigidas a outras regiões-alvo, exceto em dois indivíduos cuja amostra acabou. Dessa forma, foram realizados testes em um total de 4 indivíduos (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de positividade da *Leishmania* em aves por alvo analisado.

Especie	Amostras				PCR		
	Coletado	Indivíduo	Kg	cm	kDNA	SSUrRNA	HSP70C
<i>Ara ararauna</i>	Vida livre	1970	1,07	50	+	+	-
		1986	1,19	51,6	-	+	+
		1999	1,25	57	+	+	+
		2101	827	55	+	-	NR
	Reabilitação	395	NR	NR	+	-	NR
		S/N - 17	NR	NR	-	+	+

Legenda: NR - Não Realizado.

Fonte: Dados da pesquisa. Legenda: resultados obtidos da análise das PCRs em amostras de sangue de *A. ararauna*.

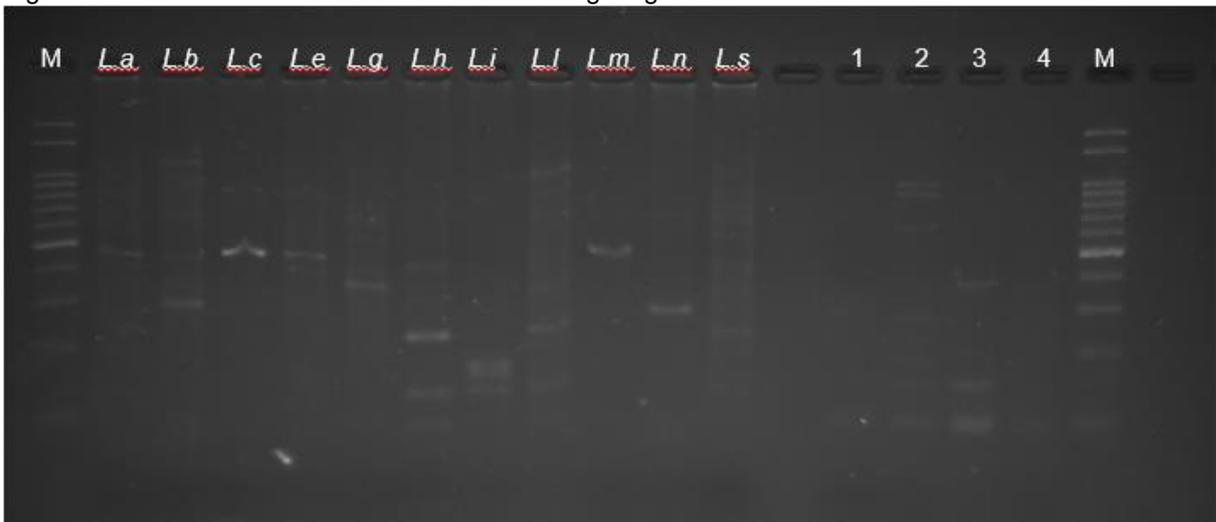
Comparando a prevalência em todas as aves positivas nos testes moleculares, observou-se que as regiões dirigidas ao alvo do kDNA e SSUrRNA alcançaram prevalência de 8,5% (n=04/47) cada uma (Tabela 1), sendo em três indivíduos de vida livre e um em reabilitação (Tabela 2). Já para o HSP70C, que foi aplicado apenas nas amostras positivas, somente três indivíduos amplificaram nessa região alvo. Houve casos em que duas regiões alvo diferentes apresentaram positividade em algumas aves.

Nos resultados obtidos, foi identificado um caso em que as regiões alvo kDNA e SSUrRNA apresentaram positividade simultânea, amostra do indivíduo 1970 (vida livre). Além disso, registrou-se dois casos em que a positividade ocorreu para SSUrRNA em conjunto com HSP70C, sendo os indivíduos 1986 (filhote de vida livre) e S/N – 17 (reabilitação). Adicionalmente, observou-se duas amostras positivas apenas para o kDNA, sendo negativas para o SSUrRNA e que não havia amostra suficiente para ser testada com HSP70C, esses eram os indivíduos 2101 e 395 (filhote de vida livre e espécime em reabilitação, respectivamente). É importante destacar que houve uma amostra positiva simultaneamente para as três regiões alvo em um indivíduo de vida livre, esse era o filhote 1999.

5.2.1 Identificação das *Leishmanias*

Dos quatro indivíduos testados positivos na região do HSP70C, sendo três de vida livre e um em reabilitação, esses seguiram para a etapa de RFLP utilizando enzimas de restrição *HAE III*, os resultados alcançados na PCR RFLP seguem demonstrado na imagem abaixo (Figura 6).

Figura 10: Resultado PCR-RFLP visualizado em gel agarose.



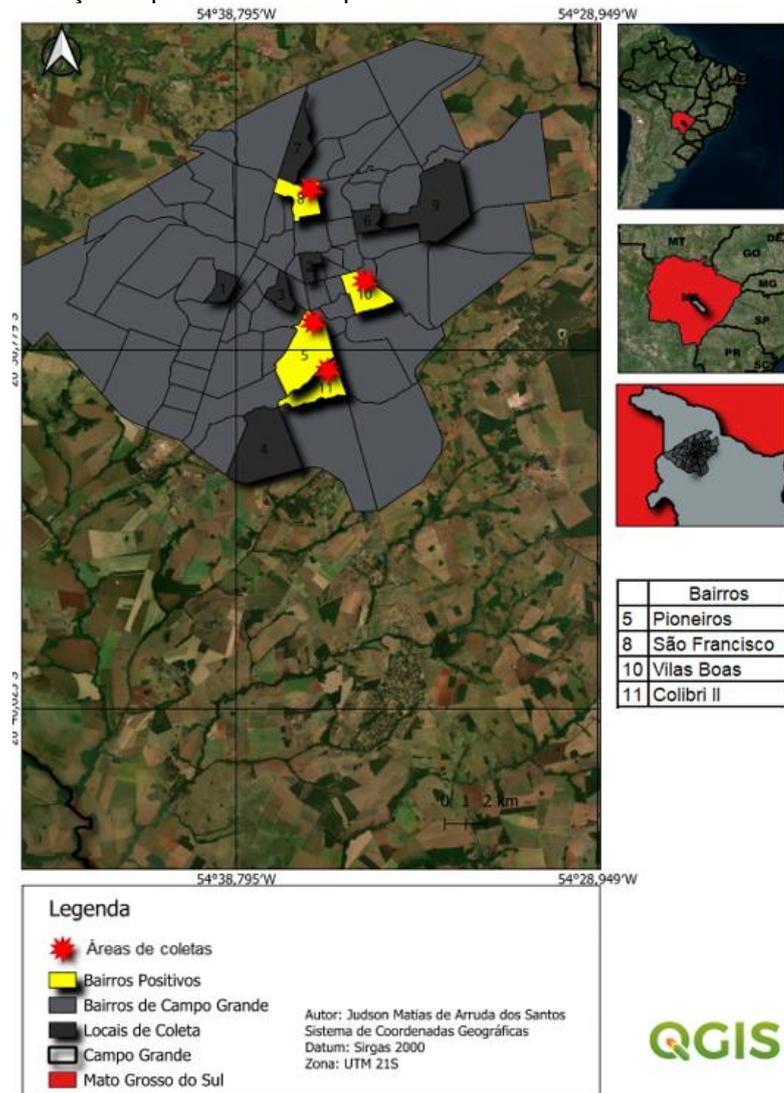
Legenda: M – Marcador molecular 50 pb, *L.a* (*Leishmania amazonensis*), *L.b* (*Leishmania braziliensis*), *L.c* (*Leishmania colombiani*), *L.e* (*Leishmania equatoriana*), *L.g* (*Leishmania guianensis*), *L.h* (*Leishmania hertigi*), *L.i* (*Leishmania infantum*), *L.l* (*Leishmania lansoni*), *L.m* (*Leishmania mexicana*), *L.n* (*Leishmania naiffi*), *L.s* (*Leishmania shawi*), amostras 1 a 4.

O resultado em gel de agarose a 2% demonstra a sequência de bandas, não apresenta semelhança com as bandas dos controles positivos e por isso não houve uma definição de quais espécies de *Leishmania* estão circulando nos espécimes de *A. ararauna*.

5.3 Análise espacial dos casos positivos das aves de vida livre

Foi realizada a coleta de amostra de sangue de 28 filhotes de *A. ararauna* em 19 ninhos naturais na cidade de Campo Grande. Dos quais 18 pontos foram dentro do perímetro urbano e um no perímetro periurbano da cidade (Figura 7).

Figura 11: Distribuição espacial de casos positivos.



Fonte: Dados da pesquisa. Legenda: Mapa dos bairros de Campo Grande onde houve as coletas em ninhos, os pontos vermelhos são os casos de filhotes de araras positivas para *Leishmania* e em amarelo os bairros onde se encontravam os ninhos dessas aves.

Comparando os dados de origem das amostras, observa-se casos positivos em ninhos localizados em áreas residenciais e um centro universitário, próximos à região de matas e terrenos baldios nos bairros Pioneiros, Vilas Boas, Jardim Colibri e São Francisco respectivamente.

Dos quatro indivíduos de vida livre que testaram positivo, três deles estavam em ninhos naturais, enquanto um indivíduo estava em um ninho artificial (Figura 12).

Figura 12: Filhotes de arara-canindé em ninho artificial.



Fonte: Dados da pesquisa, Projeto Aves Urbanas – Araras na Cidade. Legenda: Imagens dos filhotes em ninho artificial, sendo as imagens A e B do indivíduo que apresentou positividade para *Leishmania*, e as imagens C e D mostram os dois filhotes que habitavam este ninho.

Havia dois filhotes de *A. ararauna* vivendo no ninho (Imagem C e D), ambos apresentando lesões e sendo parasitado pelos percevejos, e também por larvas de moscas (Berne). Desses dois filhotes, apenas um indivíduo (indivíduo 1986) testou positivo para *Leishmania* (Imagem A e B), este pesava 1,19 Kg e tinha 51,6 cm e seu aspecto físico era saudável.

Vale salientar que o ninho localizado em uma residência do bairro Colibri, está ao lado de um terreno baldio, a 324 metros de uma área de mata florestal e a 134 metros da Escola Municipal Professora Iracema de Souza Mendonça (Figura 9).

Figura 13: Localização do ninho artificial.



Fonte: Dados da pesquisa. Legenda: Ninho artificial localizado em região com dois terrenos baldio, perto de mata e escola.

Houve um filhote, o indivíduo 2101 de vida livre, que apresentou positividade para *Leishmania* e veio a óbito. Este se encontrava em ninho natural localizado na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) (Figura 10). Esse filhote pesava 827 gramas, tinha 550 cm de comprimento, sem lesões ou ectoparasitas no indivíduo.

Figura 14: Filhote na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

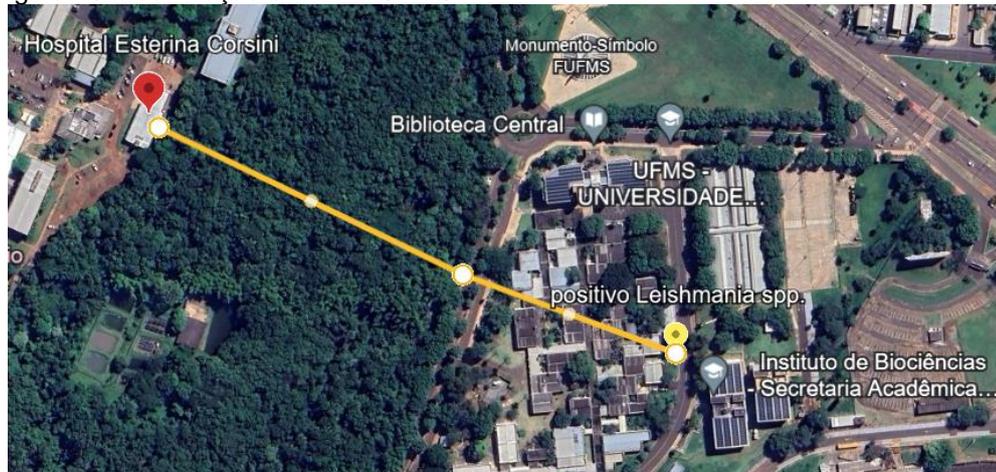


Fonte: Dados da pesquisa, Instituto Arara Azul. Legenda: Filhote do ninho na UFMS sendo as imagens A e B a coleta de sangue e manejo do indivíduo realizada pela equipe do Projeto Aves

Urbanas – Araras na Cidade, imagem C indivíduo recebendo cuidados parentais e imagem D o animal encontrado morto.

O filhote se desenvolveu normalmente e tentou alçar voo, não tendo sucesso. O animal se encontrava saudável e de papo cheio, apesar de não conseguir absorver os nutrientes dos alimentos que ingeria, trazidos pelos pais (Figura A, B e C), tempos depois o filhote foi encontrado morto (Figura D). O ninho se localizava a 156 metros da mata ciliar e a 380 metros do Hospital Esterina Corsini (Figura 11).

Figura 15: Localização do ninho UFMS.



Fonte: Google Earth. Legenda: Figura 10 mostra a distância entre o ninho que abrigava o filhote positivo para *Leishmania* e o hospital Esterina Corsini, além da distância da mata de galeria que se encontra nas dependências da UFMS.

Os outros dois filhotes de vida livre, encontrados nos ninhos dos bairros São Francisco e Vilas Boas, que apresentaram positividade para *Leishmania* nesta pesquisa, voaram com sucesso dos seus ninhos (Figura 12).

Figura 16: Filhotes positivos para a *Leishmania*.

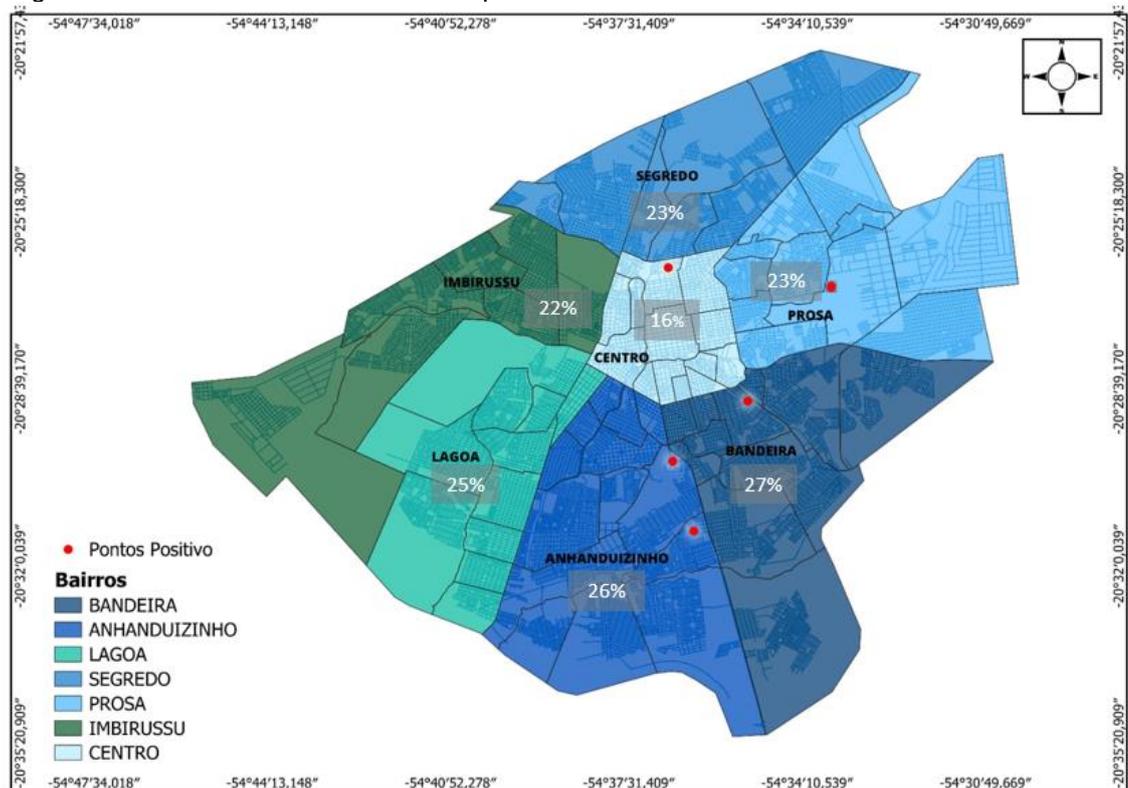


Fonte: Dados da pesquisa, Projeto Aves Urbanas – Araras na Cidade. Legenda: O filhote da figura A pertence ao ninho natural localizado em condomínio do bairro Vilas Boas, filhote da figura B, ninho natural localizado em residência do bairro São Francisco.

Eles se desenvolveram normalmente e não apresentaram sinais clínicos, o indivíduo da primeira imagem (Figura 12A) pesava 1,25 Kg e 570 cm, já o indivíduo da segunda imagem (Figura 12B) pesava 1,07 Kg e 50 cm, sendo considerados dentro do normal para a idade. Nenhum dos filhotes apresentou algum tipo de lesão ou ectoparasitas durante o monitoramento.

Cruzando os dados do Inquérito Canino para o Diagnóstico de Leishmaniose Visceral, realizado no município de Campo Grande em 2019, e os resultados obtidos nesta pesquisa com as *A. ararauna*, observou-se a localidade onde haviam ninhos que apresentaram filhotes positivos para *Leishmania*, segundo mapa abaixo (Figura 13).

Figura 17: Prevalência de LVC em Campo Grande.



Fonte: Dados da pesquisa e modificado de BRASIL, 2021. Legenda: Mapa correlacionando os casos prevalentes de LVC de 2019 com os achados em *A. ararauna* de 2022/2023.

Os quatro filhotes positivos para *Leishmania* se encontravam nos ninhos situados nestas regiões com maior prevalência, sendo que o ninho da ave do Centro localizado na divisa com a região Segredo, dois ninhos na região Anhanduizinho e um ninho na região Bandeiras. Já os dois indivíduos positivos para *Leishmania* que se encontravam nas dependências do CRAS, localizado na macroregião do Prosa é

importante salientar que não se sabe se essas aves já chegaram contaminadas ao local.

6 DISCUSSÃO

Por meio das análises dos resultados, foi possível identificar a ocorrência natural de *Leishmania spp.* em aves da espécie *A. ararauna* em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, uma região endêmica para leishmanioses. Essa interação parasito-hospedeiro é inédita entre essas espécies, sem registros anteriores na literatura científica. De acordo com Fialová *et al.* (2021), esse tema é considerado negligenciado na comunidade científica porque esses parasitos apresentam baixa patogenicidade e importância econômica.

Embora a literatura possa indicar que as aves são refratárias a parasitos tripanossomatídeos, como *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma thomashamiltoni*, fato este atribuído à baixa patogenicidade em aves e à capacidade limitada desses parasitas de completar seu ciclo de vida em hospedeiros avianos (GUIMARÃES *et al.*, 1974; FIALOVÁ *et al.*, 2021). Estudos de FIALOVÁ *et al.* (2021) sugerem que, apesar de sua presença em aves, os tripanossomatídeos raramente causam doenças graves, e sua transmissão pode ocorrer através de vetores dípteros, mas de forma menos eficiente em comparação com outros hospedeiros. No entanto, observa-se, nos últimos anos, a infecção em diversas espécies de aves, tanto domésticas quanto silvestres, porém esses estudos não concluem a participação no ciclo de transmissão da *Leishmania spp.* Calle e Cevallos (2022) comprovaram, por meio de microscopia, a infecção natural por espécies de *Trypanosoma spp.* em *Rhodospingus cruentus*, aves passeriformes encontradas em florestas caducifólias no Equador.

Em Campo Grande, já houve relato de *Leishmania* do subgênero *Vianna* em um espécime de *Alipiopsitta xanthops*, que se encontrava em reabilitação no CRAS (MATHEUS *et al.*, 2021), relato esse que corrobora com os achados deste estudo. Há outros relatos de aves infectadas por *Leishmania*, não somente no MS, mas também em outros estudos realizados em outras partes do Brasil (TATTO, 2022).

O estudo de TATTO (2022), na Santa Maria no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, envolvendo aves de produção em ambiente rural, foi demonstrado sorologicamente a ocorrência do contato com o parasito *Leishmania spp.* em galinhas (*Gallus gallus*), perus (*Meleagris gallopavo*), galinhas D'Angola (*Numida meleagris*) e gansos (*Anser anser*). Esses animais são amplamente criados e manipulados com fins comerciais em criadouros, granjas e galinheiros. O estudo de Otranto (2010),

Itália, também expõe a ocorrência de anticorpos anti-*L. infantum* em gansos domésticos (*Anser anser*) e em faisão (*Phasianus colchicus*) e aponta seu possível papel na epidemiologia da leishmaniose visceral.

No presente trabalho, a presença de *Leishmania* em *A. ararauna* foi mais prevalente em animais de vida livre (14,29%), se comparada com aquelas que se encontram em tratamento no CRAS (10,53%). No entanto, é válido salientar que o N amostral obtido nesta pesquisa foi baixo, sendo 28 amostras de aves de vida livre e 19 amostras de aves em reabilitação, mais estudos são necessários. Outro ponto, as aves que se encontram em reabilitação no CRAS, em sua maioria, provêm da natureza e sua chegada no CRAS é mediante a resgates e apreensão do tráfico de animais silvestres. Logo, neste estudo realizado com os indivíduos do CRAS não podemos dizer se as aves contraíram a *Leishmania spp.* em vida livre ou nas dependências do CRAS. No entanto, os resultados obtidos demonstram que há a possibilidade de ocorrer a presença do DNA de *Leishmania* nessas aves, contanto que essas tenham contato com o vetor infectado pelo parasito.

As macrorregiões que apresentaram maior prevalência para LVC em 2019 foram, respectivamente, as regiões Bandeiras (27%) e Anhanduizinho (26%); sendo a menor prevalência observada na região do Centro (16%) (BRASIL, 2021). Essas mesmas regiões se encontraram os ninhos que possuíam filhotes de *A. ararauna* infectado por *Leishmania spp.* e as aves que se encontravam nas dependências do CRAS, essas situam-se na macrorregião do Prosa, onde foi registrada uma prevalência de 23% de casos de LVC em 2019.

A coleta foi realizada apenas uma vez em cada indivíduo de vida livre, devido à impossibilidade de recolher mais amostras dessas aves após alçarem voo e deixarem o ninho. Portanto, quando as amostras extraídas acabavam, não era possível obter mais, uma vez que não havia mais acesso a esses animais. Essas limitações podem impactar a abrangência e a continuidade do estudo, uma vez que a amostragem foi limitada pelo comportamento natural das aves. A dificuldade de trabalhar com baixas quantidades de DNA, principalmente quando se refere a técnica de RFLP é citada pelo trabalho de Gill e colaboradores (2000), que ressaltam a importância em se obter um DNA em grande quantidade e qualidade para realizar a técnica de RFLP de forma eficiente. O DNA em baixa concentração pode apresentar resultados incompletos ou inconclusivos, uma vez que as enzimas de restrição podem

encontrar dificuldade em cortar com eficiência o DNA (GILL et al., 2000; DABNEY et al., 2013).

Dos animais desta pesquisa que apresentaram positividade para *Leishmania* spp., não foi observado nenhum tipo de sintomas ou morte decorrente da leishmaniose. Foi constatado durante os monitoramentos de ninhos/filhotes, que não houve prejuízo no seu desenvolvimento morfológico, pois as aves apresentaram aspectos saudáveis. Normalmente os fatores que desencadeiam a morte de *A. ararauna* no perímetro urbano, são ocasionados por eletrocussão, atropelamento, ataque por cães, acidentes com linha de pipa com material cortante e colisão com estruturas prediais (BARBOSA, 2018). Não se tem estudos na literatura científica atual que comprovem se a infecção por este parasito pode causar interferência fisiológica ou morte nessas aves, pois esta é a primeira vez que há registro de *Leishmania* nesses psitacídeos.

Referente ao quadro clínico das infecções por *Leishmania* em aves, Otranto et al. (2010) analisaram galinhas infectadas experimentalmente, e foram constatadas amostras positivas na PCR convencional e qPCR. No entanto, assim como observado nos resultados deste estudo analisando *A. ararauna*, Otranto et al. (2010) não detectaram nenhum tipo de sinal clínico nas aves. É válido salientar que ambos os estudos se tratam de animais diferentes e situações distintas, sendo o primeiro realizado por meio de inoculação experimental em galinhas em laboratório e no presente trabalho foi investigada a presença de *Leishmania* sp. em *A. ararauna* de vida livre.

Os filhotes dos ninhos localizados nos bairros Pioneiros (UFMS) e no Jardim Colibri, se encontravam perto do Hospital Esterina Corsini e Escola Municipal Professora Iracema de Souza Mendonça, respectivamente, além de ambos se situarem próximos à terrenos e mata florestal que se inicia na Fazenda Imbirussu, em Campo Grande. Adentra a cidade pelo bairro Parque do Lageado e estende-se até o Jardim Colibri (onde se encontra o ninho que continha o filhote positivo para *Leishmania* spp.), onde a mata se fragmenta e termina um pouco mais à frente.

Segundo Missawa e Lima (2006), a rápida expansão dos casos de leishmaniose está relacionada à destruição de ecótopos, à ruralização das áreas periurbanas e às condições socioeconômicas da população. A ocupação por comunidades humanas marginalizadas tende a ser mais precária, ocorrendo o

acúmulo de lixo e matéria orgânica o que contribui para o aumento dos casos de leishmaniose (MISSAWA; BORBA, 2009). Esses fatores de risco ocorrem porque a vegetação e as pastagens geram altos níveis de matéria orgânica, o que favorece a manutenção do inseto vetor (GONTIJO; MELO, 2004). A destruição dessas áreas acarreta modificações nas cadeias biológicas, o que pode propiciar o surgimento ou ressurgimento de doenças (BRASIL, 2021).

As transmissões de zoonoses são amplamente influenciadas pela destruição de habitats naturais, que leva os animais a migrarem do ambiente silvestre para áreas urbanas, forçando a convivência entre animais domésticos, selvagens e seres humanos, o que aumenta significativamente o risco de transmissão de doenças e gera impactos negativos para todos os envolvidos (ZETUN et al., 2014; BRASIL, 2021).

Os fatos descritos acima podem ser exemplificados por eventos observados em Mato Grosso do Sul. Em 1999, após um longo período de seca combinado com desmatamentos e queimadas na área rural e em municípios vizinhos à capital, várias espécies de animais, incluindo a *A. ararauna*, migraram para zonas urbanas (GUEDES, 2012). Um ano após a degradação e migração das araras, foi relatado também o avistamento pela primeira vez do vetor *Lutzomyia longipalpis*, e em 2001 examinaram-se 3.250 cães dos quais 2,1% foram soropositivos (FURLAN, 2010). Em 2002 foram notificados os primeiros casos humanos autóctones, caracterizando o início da epidemia de LV na capital do estado (OLIVEIRA et al., 2000).

Tendo em vista o exposto, Varella (2022) propõe que a abordagem de Saúde Única é essencial ao progresso de antecipar, prevenir, detectar e controlar doenças que se propagam entre animais e humanos, prevenir ameaças à saúde humana e animal relacionadas ao meio ambiente, bem como combater outros desafios.

Dessa forma é importante entender como o ciclo da doença ocorre na natureza e em qual momento os agentes vetores estão entrando em contato com essas aves. Carvalho *et al.* (2006) ressalta a importância de esclarecer os fatores que podem impactar a relação da fauna de artrópodes associada aos ninhos de araras, sejam eles naturais ou artificiais. Essa observação pode ter implicações relevantes na epidemiologia das leishmanioses. Portanto, é crucial intensificar os estudos relacionados ao achado de *Leishmania* em espécimes de *A. ararauna*, artrópodes e outros animais que ocupam esses ninhos, a fim de compreender melhor a infecção desse microrganismo no tocante às *A. ararauna* e sua disseminação no ambiente.

Dada a elevada capacidade da *Leishmania* spp. em infectar seres humanos e animais, destaca-se a importância de novos estudos com psitacídeos e flebotómíneos, para entender como ocorre o ciclo de transmissão nos habitats estudados.

Com base nos resultados desta pesquisa, a detecção de *Leishmania* spp. em *A. ararauna* pode sugerir uma maior amplitude nas fontes alimentares dos vetores. Isso se estende a outras espécies de aves, como galináceos, incluindo galinhas de granja, peru, ganso e faisão; passeriformes como os *Tico-tico-rei-carmim* e psitacídeos (OTRANTO et al., 2010; MATHEUS et al., 2021; CALLE; CEVALLOS, 2022).

Além disso, os resultados frente a literatura, podem sugerir que a presença do parasita em aves parece não estar restrita apenas a animais em ambientes silvestres, mas também pode ser encontrada em ambientes modificados pela intervenção humana em perímetro urbano, no caso de ninhos, criadouros, galinheiros e granjas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível comprovar pela primeira vez a presença do DNA da *Leishmania* spp. em *A. ararauna*. No entanto, apenas o encontro de amostras positivas não indica que essas aves desempenham algum papel no ciclo de transmissão, mas pode abrir novas perspectivas para o campo de investigação ao que se refere à ecoepidemiologia das leishmanioses. Recomenda-se mais estudos aprofundados para investigar a importância dessas aves no ciclo de transmissão e manutenção do parasito da *Leishmania* na natureza.

É necessário também elaborar novas técnicas de diagnóstico de *Leishmania* em aves, a fim de melhorar e otimizar os protocolos atuais, visto que esse ponto pode se tornar limitante, devido à quantidade de DNA extraído em um volume de 100 µl e à coleta de amostras conforme a disponibilidade na natureza.

Ajustes na PCR-RFLP são necessários, pois os resultados alcançados nesta pesquisa não foram satisfatórios, não sendo possível chegar em uma identificação clara das espécies de *Leishmania* spp. que circulam na população de *A. ararauna*. Dessa forma, sugerimos tais modificações para obter resultados mais confiáveis e distinguir quais espécies desses parasitas estão circulando na população de *A. ararauna* em Campo Grande.

8 CONCLUSÃO

- As araras da espécie *A. ararauna* podem ser hospedeiras de *Leishmania* spp. em Campo Grande, Mato Grosso do Sul.
- Foi possível coletar sangue da espécie *A. ararauna* de vida livre e em reabilitação.
- Foi encontrado DNA de *Leishmania* spp. em amostras de sangue da *A. ararauna* de Campo Grande-MS.
- Comparou-se ocorrência de *Leishmania* spp. em *A. ararauna* de vida livre com indivíduos em reabilitação no CRAS.
- Foi possível correlacionar a distribuição de *Leishmania* spp. detectadas em aves com a prevalência dos casos caninos relatados nas regiões estudadas nos últimos anos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHYA, S., CHATTERJEE, M., HASSAN, M. D. Q., MUKHERJEE, S., SEN, S. (1995). Detection of Leishmanza in the blood of early kala-azar patients with the aid of the polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, 89,622-624.
- ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: a review on parasite, vector and reservoir host. **Health Science Journal**, v. 11, n. 4:519, p. 1-6, ago., 2017.
- ALMEIDA, A. B. P. F.; *et al.* Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence na risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 4, p. 359-365, out./dec., 2012.
- ANVERSA, L.; TIBURCIO, M. G. S.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; RAMIREZ, L. E. Human leishmaniasis in Brazil. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n.3, p. 281-289, 2018.
- ARAUJO, D. C. Análise espacial dos casos humanos de leishmaniose visceral. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 24(2), p. 71-75, abr./jun., 2017.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 269-281, 2000.
- Barbosa, L. T.; Calderan, A.; Appel, S.; Pereira, E.; Toledo, M.; Guedes, N. Dynamics of nest availability occurrence of Blue and Yellow Macaw (*Ara ararauna*) nests in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Urban Ecosystems**. v. 26. p.1-8, jul., 2023.
- BARBOSA, L. T.; PEREIRA, E. L. D.; RABENHORST, K. C.; FERREIRA, L. P.; GUEDES, N. M. R. PROJETO AVES URBANAS – Araras da cidade. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL CONSERVAÇÃO DE AVES, 1, 2012, Foz do Iguaçu. **Apresentação de painel...** Foz do Iguaçu: Parque das Aves, 05 a 06 de dezembro 2012.
- BARCELLOS, C. et al. Identificação de locais com potencial de transmissão de dengue em Porto Alegre através de técnicas de geoprocessamento. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 38, n.3, p. 246-250, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/ZxmK9DM6BZj445CgXPJgZYB/?lang=pt> Acessado em: 25 de ago. 2024.
- BIANCHI, C. A. C. **Biologia reprodutiva da arara-canindé (*Ara ararauna*, Psittacidae) no Parque Nacional das Emas, Goiás.** 1998. 75f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Departamento de Ecologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.
- BOTELHO, A. C. A; NATAL, D. Primeira descrição epidemiológica da leishmaniose visceral em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 503-508, 2009. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/rrnVq7GrYbDtvbdKDZLdNqt/#:~:text=De%202002%20a%202006%20ocorreram,dos%2020%20aos%2049%20anos.&text=Este%20trabalho%20%C3%A9%20a%20primeira,no%20munic%C3%ADpio%20de%20Campo%20Grande>. Acessado em: 25 out. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Uma só Saúde**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/u/uma-so-saude>. Acessado em: 22/04/2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. **PLANO MUNICIPAL DE SAÚDE 2022 - 2025**. Campo Grande: Secretaria Municipal de Saúde, 136 p., 2021.

BRASIL. Em Campo Grande exame laboratorial para detecção da leishmaniose visceral canina é disponibilizado gratuitamente. Campo Grande, 18/07/2023. Disponível em: <https://www.campogrande.ms.gov.br/cgnoticias/noticia/em-campo-grande-exame-laboratorial-para-deteccao-da-leishmaniose-visceral-canina-e-disponibilizado-gratuitamente/#:~:text=Campo%20Grande%20est%C3%A1%20localizada%20em,%C3%B3rg%C3%A3o%20para%20realizar%20o%20teste>. Acessado em: Abr. 2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Influenza Aviária (IA). 15 mai. 2023. Acessado em 05/06/2024 disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/influenza-aviaria>

BRAZIL, R. P; BRAZIL, B. G. Biologia de Flebotomíneos Neotropicais. In: RANGEL, E.; LAINSON R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Ed. Fio Cruz, Rio de Janeiro, p. 257-274, 2003

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância, prevenção e controle de zoonoses: normas técnicas e operacionais. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 121 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2017. 189p.

BRASIL. Coordenadoria de Educação Ambiental (CEA). Educação Ambiental e Saúde Única. **Portal da Educação Ambiental**. São Paulo Governo do Estado. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014. 120p.

BRASIL. Lei nº 1, de 26 de junho de 2023. Dispõe sobre a atualização do Anexo Único da Resolução Conjunta SMA/SES nº 01/2016, que aprova as “Diretrizes técnicas para a vigilância e controle da Febre Maculosa Brasileira no Estado de São

Paulo - classificação de áreas e medidas preconizadas”, e dá outras providências. Diário Oficial do Estado, São Paulo, SP, 26 jun. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar**. 1.ªEd. Brasília, Editora MS, 2017. 72p.

Barbosa, L. T. **Fatores que influenciam o sucesso reprodutivo da arara-canindé (Ara Ararauna) em Campo Grande, Mato Grosso do Sul**. Tese (Doutorado) – Universidade Anhanguera Uniderp, 2018. Campo Grande, 2018. 121f.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 392, p. 951-970, set., 2018.

CABANILLAS, M.R.S.; CASTELLON, E.G.B.; ALENCAR, M.O. Estudo sobre abrigos naturais dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) na Reserva Florestal Ducke Manaus, AM, Brasil. **Boletín/Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental XXXV**, p. 63-75, 1995.

CALLE R. R.; CEVALLOS J. S. S.; **Estandarización de protocolos para el monitoreo del estado de salud de aves como reservorios de hemoparásitos en el Bosque Protector La Prosperina. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL** (Facultad de Ciencias de la Vida). GUAYAQUIL – ECUADOR, 2022.

CAMPO GRANDE (MS). Lei n.º 5.274, de 6 de agosto de 2015. Reconhece a arara-canindé (A. ararauna) como ave símbolo do município de Campo Grande. Diário Oficial de Campo Grande, Campo Grande, MS, 7 ago. 2015.

CAMPO GRANDE (MS). Lei n.º 6.568, de 20 de outubro de 2021. Reconhece Campo Grande como a "Capital das Araras". Diário Oficial de Campo Grande, Campo Grande, MS, 21 out.

CASTRO, Simone Vieira. MILTEFOSINA NO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA–RELATO DE CASO/Use of miltefosin in the treatment of canine visceral leishmaniasis. **Jornal Interdisciplinar de Biociências**, v. 5, n. 1, p. 38-42, 2020.

CBRO – Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Lista de Aves do Brasil**. 12 ed. 2015. 42p. Disponível em: <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: 23 jan. 2024.

CHANG, K. P.; FONG, D.; BRAY, R. S. **Biology of Leishmania and leishmaniasis**. In: KP. Chang & RS Brayeds Leishmaniasis, Elsevier, Landom.p 1-30. 1985.

CRUZI, CAÑAVATEC, RUBIO JM, MORALES M. A., CHICHARROC, LAGUNA F, JIMÉMEZ-MEJÍASM, SIRERAG, VIDELAS, ALVARJ. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring Leishmania infantum infection in co-infected patients with human immunodeficiency virus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. S185-S189, 2002.

DABNEY, J.; MEYER, M.; PÄÄBO, S. Ancient DNA damage. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, a012567, 2013.

DANTAS-TORRES, F. **Epidemiologia da Leishmaniose Visceral no município de Paulista, estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil**. Recife, 96p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. 2006.

D'ANDREA, L. A. Z.; GUIMARÃES, R. B. A importância da análise de distribuição espacial da leishmaniose visceral humana e canina para as ações de vigilância em saúde. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 14(28), p. 121-138, jun., 2018.

DE SOUZA CAVALCANTE, K. *et al.* Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em uma área periurbana na cidade de Macapá, Amapá, Brasil. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 2, p. 2417-2426, 2021.

ELMAHALLAWY, E. K.; *et al.* Diagnosis of leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8(8), p. 961-972, 2014.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **One health**. Disponível em: <https://www.fao.org/one-health/en> Acesso em: 22 abr. 2024.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3:2, p. 47-57, 2012.

FERREIRA, C. Eutanásia em cães com leishmaniose não diminui a doença entre humanos, dizem especialistas. **Agência Câmara de Notícias**, Brasília, 03 de setembro de 2021. Disponível em: <https://www.camara.leg.br/noticias/803457-eutanasia-em-caes-com-leishmaniose-nao-diminui-a-doenca-entre-humanos-dizem-especialistas/#:~:text=C%C3%A2mara%20dos%20Deputados-,Eutan%C3%A1sia%20em%20c%C3%A3es%20com%20leishmaniose%20n%C3%A3o,doen%C3%A7a%20entre%20humanos%2C%20dizem%20especialistas&text=A%20morte%20de%20c%C3%A3es%20que,doen%C3%A7a%20entre%20os%20seres%20humanos>. Acessado em 17/08/2024.

FERREIRA, E. C.; CRUZ, I.; CAÑAVATE, C.; MELO, L. A.; PEREIRA, A. A. S.; MADEIRA, F. A. M.; VALÉRIO, S. A. N.; CUNHA, H. M.; PAGLIA, A. P.; GONTIJO, C. M. F. Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. **BMC Veterinary Research** v. 11, n. 71, p.1-7. 2015.

FERREIRA E. C. *et al.* *Leishmania* (V.) *braziliensis* infecting bats from Pantanal wetland, Brazil: First records for *Platyrrhinus lineatus* and *Artibeus planirostris*. **Acta Tropica**. v. 172, p. 217 – 222, 2017.

FLORES E. F.; WEIBLEN R. O vírus do Nilo Ocidental. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.2, p.604-612, mar-abr, 2009.

FIALOVÁ, M.; SANTOLÍKOVÁ, A.; BROTKOVÁ, A.; BRZOŇOVÁ, J.; SVOBODOVÁ, M. Complete life cycle of *Trypanosoma thomasbancrofti*, an avian

trypanosome transmitted by culicine mosquitoes. *Microorganisms*, v. 9, n. 10, p. 2101, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102101>. Acesso em: 26 ago. 2024.

FRANCHIN, A. G. JÚNIOR, O. M. A riqueza da avifauna no Parque Municipal do Sabiá, zona urbana de Uberlândia (MG). **Biotemas**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 179-202, 2004.

FURLAN, M. B. G. Epidemia de leishmaniose visceral no Município de Campo Grande-MS, 2002 a 2006. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 16-25, mar. 2010.

G1. Conheça os psitacídeos: família dos periquitos, tuins, araras e maritacas. **G1**, Campinas, 04/12/2019. Disponível em: <<https://g1.globo.com/sp/campinas-regiao/terra-da-gente/noticia/2019/12/04/conheca-os-psitacideos-familia-dos-periquitos-tuins-araras-e-maritacas.ghtml>>. Acesso em: 11/08/2024.

GALATI E. A. B. 2023. **Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Classificação e identificação de táxons das Américas. Vol I. Apostila da Disciplina Bioecologia e Identificação de Phlebotominae do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública.** Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.134p.

GILL, P.; WHITAKER, J.; FLAXMAN, C. An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. **Forensic Science International**, v. 112, p. 17–40, 2000.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRAÇA, G. C. et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 107(5): 664-674, August 2012.

GUEDES, N. M. R.; SEIXAS, G. H. F. Métodos para estudos de reprodução de psitacídeos. In: GALETTI, M.; PIZO, M. A. **Ecologia e conservação de psitacídeos no Brasil**. Belo Horizonte: Melopsittacus Publicações Científicas, 2002. p. 123-139.

GUEDES, N. M. R. Araras da Cidade. In: QUEVEDO, T. L. **Araras da cidade – Músicas do Mato**. Campo Grande: Editora Alvorada, 2012. p. 45-140.

GUEDES, N. M. R.; VICENTE, E. Biodiversidade e perda de habitats no Pantanal. In: ALVES, G. L.; MERCANTE, M. A.; FAVERO, S. **Pantanal Sul- Mato-Grossense – Ameaças e Propostas**. Campinas: Autores Associados, 2012. p. 143-162.

GUIMARÃES F. N.; VENANCIO I.; GRZYMBERG N. REFRATARIEDADE DAS GALINHAS AO “TRYPANOSOMA CRUZI” III DISSOCIAÇÃO DO FENÔMENO DE REFRATARIEDADE E DA LISE DOS EPIMASTIGOTAS PELO SORO DAS AVES. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 72. 1974.

GWYNNE, J. A.; RIDGELY, R. S.; TUDOR, G.; ARGEL, M. **Aves do Brasil – Pantanal & Cerrado**. São Paulo: Editora Horizonte, 2010. 322p.

HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. Urbanparasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**. v. 27, n. 9, p. 403-409. 2011.

HASHIMOTO M. M. Estudo de Estabilidade do kit de Leishmaniose Visceral Canina de Ensaio Imunocromatográfico de Duplo Percurso de Bio-Manguinhos. **Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, 2014.

International Union for Conservation of Nature (IUCN). **The IUCN red list of threatened species**. Versão 2022–2. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/search/grid?taxonomies=22672853&searchType=species>>. Acessa em 11 de agosto 2024.

KASZAK, I.; PLANELLAS, M.; DWORECKA-KASZAK, B. Canine leishmaniosis – an emerging diases. **Polish Parasitological Society**, v. 61(2), p. 69-76, 2015.

KELLY, P. H.; BAHR, S. M.; SERAFIM, T. D.; AJAMI, N. J.; PETROSINO, J. F.; MENESES, C.; KIRBY, J. R.; VALENZUELA, J. G.; KAMHAWI, S.; WILSON, M. E. (2017). The Gut Microbiome of the Vector *Lutzomyia longipalpis* Is Essential for Survival of *Leishmania infantum*. **mBio**, 8(1), e 01121-16.

KILLICK-KENDRICK, R. The Microecology of *Leishmania* in the Gut and Proboscis of the Sandfly. In: CHANG, K. P.; SNARY, D. (eds) Host-Parasite Cellular and Molecular Interactions in Protozoal Infections. **NATO ASI Series (Series H: Cell Biology)**, v. 11. Springer, Berlin, Heidelberg, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. The leishmaniasis in biology and medicine. *London: Academic Press*. v. 1, p. 1-120, 1987.

LANE, V. **Análise epidemiológica da leishmaniose visceral humana no Brasil: contribuição às políticas de controle**. 158p. Tese de doutorado (Doutorado em ciências médicas) pela Universidade de Brasília, Brasília-DF. 2016.

LEMOS, M.; SOUSA, O., SILVA, Z. Perfil da leishmaniose visceral no Brasil: uma revisão bibliográfica. **Journal of Business and Technical Communication**, v. 9, n. 1, p. 93-114, 2019.

LONGLEY, P. A.; GOODCHILD, M. F.; MAGUIRE, D. J.; RHIND, D. W. *Geographical Information Systems and Science*. 3. ed. Chichester: Wiley, 2015.

LOPES, E. G.; *et al.* Performance of conventional PCRs based on primers directed to nuclear and mitochondrial genes for the detection and identification of *Leishmania* spp. **Instituto de Medicina Tropical**. São Paulo, v. 58:41, p. 1-7, 2016.

MACHRI, P. G. F.; MASCARENHAS, L. A.; LAGO, N. C. M. R. Levantamento sorológico de leishmaniose visceral canina no município de Barra do Garças/MT. **Revista Eletrônica da Univar**, v. 2, n. 10, p. 67-70, ago., 2013.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; *et al.* Exploring spatial and temporal distribution of cutaneous leishmaniasis in the Americas 2001-2011. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, p. 1-14, nov., 2016.

MARQUES, N. T. A., GONÇALVES, V. M. N., de ALMEIDA, C. B., FRANCO, M.L., GALHARDO, J. A. (2017). GEOPROCESSAMENTO APLICADO À EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL. **Hygeia**, 13 (26),156-165.

MARQUES, C. P. **Psitacídeos (Aves: Psitaciformes) em praças de Uberlândia, MG: um estudo sobre a exploração de recursos no ambiente urbano**. 2012. 61f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

MENDONÇA, I. L.; *et al.* The performance of serological tests for *Leishmania infantum* infection screening in dogs depends on the prevalence of the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59:e39, p. 1-10, fev., 2019.

MISSAWA, N.A.; BORBA, J. F.; Leishmaniose visceral no município de Várzea Grande, Estado de Mato Grosso, no período de 1998 a 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 42, v. 5, p. 496-502, set-out, 2009

MISSAWA, N.A.; LIMA, G.B.M. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.4, p.337-340, 2006.

MONTALVO A, FRAGA J, MONZOTE L, MONTANO I, De DONCKER S, DUJARDIN J, AUWERA G 2010. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. **Parasitology** 137: 1159-1168.

MONTAÑO, A.; SABINO, J.; GUEDES, N. M. R. Alimentação da arara-canindé (*Ara ararauna* - Psittacidae) em ambiente urbano, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. In: ENCONTRO ANUAL DE ETOLOGIA E I SIMPÓSIO LATINO-17 AMERICANO DE ETOLOGIA, 27, 2009, Bonito. **Anais...** Bonito: Centro de Eventos de Bonito, 2009.

MORADI-ASL, E. *et al.* Situational analysis of visceral leishmaniasis in the most important endemic area of the diases in Iran. **Journal of Arthropod-Born Diases**, v. 11(4), p. 482-496, dec., 2017.

MORALES, D. V.; PAREDES, M.; MORALES-BUTLER, E. J.; CRUZ-APONTE, M.; ARRIOLA, L.; CEVALLOS, V.; PONCE, P.; MUBAYI, A. (2019). Data scarcity and ecological complexity: The cutaneous leishmaniasis dynamics in Ecuador. **Journal of the Royal Society Interface**, 16(157). <https://doi.org/10.1098/rsif.2019.0141>

NARDI, S. M. T. *et al.* Geoprocessamento em saúde pública: fundamentos e aplicações. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 72(3), p. 185-191, 2013.

NUZUM, E.; WHITE F.; THAKUR, C.; DIETZE, R.; WAGES, J.; Grogl, M.; BERMAN, J. (1994). Diagnosis of symptomatic visceral leishmaniasis by use of polymerase chain reaction on patient blood. **Journal of Infectious Diseases**, 171, 751-754.

OPAS, O.P.A.S. **Tópicos leishmaniose**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>>. Último acesso em Ago. 2024.

OLIVEIRA, A. G.; FALCÃO A. L.; BRAZIL R. P. Primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) na área urbana de Campo Grande, MS. **Revista de Saúde Pública** 2000;34:654-655.

OSHAGHI, M.A.; CHAVSHIN, A.R.; VATANDOOST, H.; YAAGHOobi, F.; MOHTARAMI, F.; NOORJAH, N. Effects of post-ingestion and physical conditions on PCR amplification of host blood meal DNA in mosquitoes. **Experimental Parasitology**. v. 112, n. 4, p. 232-236. 2006.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD - OPAS. *Manual de Procedimientos para Vigilancia y Control de las Leishmaniasis en las Américas*. Washington, D.C. OPS, 2019.b

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE – OPAS, 2019. Leishmaniose – Informe Epidemiológico das Américas, 2019. Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?ua=1>>. Último acesso em ago. 2019.a

OTRANTO, D.; TESTINI, G.; BUONAVOGLIA, C.; PARISI, A.; BRANDONISIO, O.; CIRCELLA, E.; CAMARDA, A. Experimental and field investigation on the role of birds as hosts of *Leishmania infantum*, with emphasis on the domestic chicken. **Acta Tropica**, v. 113, n.1, p. 080-83, 2010.

PEREIRA, G. A.; MONTEIRO, C. S.; CAMPELO, M. A.; MEDEIROS, C. O uso de espécies vegetais, como instrumento de biodiversidade da avifauna silvestre, na arborização pública: o caso do Recife. **Atualidades Ornitológicas**, Ivaiporã, n. 125, p. 10, mai/jun. 2005. Disponível em: < <https://www.semanticscholar.org> >. Acesso em: 24 jan. 2024.

PEREIRA, E. D. L.; BARBOSA, L. T.; RABENHORST, K. C.; GUEDES, N. M. R.; **Biologia Reprodutiva da Arara-canindé (*Ara ararauna*, Aves: PSITTACIDAE) em Área Urbana de Campo Grande, Mato Grosso do Sul**. 2012. 25 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Anhanguera-Uniderp, Campo Grande.

PESTANA, L. T. C.; ALVES, F. M.; SARTORI, A. L. B. ESPÉCIES ARBÓREAS DA ARBORIZAÇÃO URBANA DO CENTRO DO MUNICÍPIO DE CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL. **REVSBAU**, Piracicaba – SP, v.6, n.3, p.01-21, 2011.

REIS, L. L. *et al.* Leishmaniose visceral e sua relação com fatores climáticos e ambientais no estado do Tocantins, Brasil, 2007 a 2014. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 35(1), p. 1-14, out. 2018.

RIBEIRO, M. A. *et al.* Georreferenciamento: ferramenta de análise do sistema de saúde de Sobral-Ceará. **Sanare**, v. 13, n. 2, p. 63-69, jun/dez., 2014.

RICKLEFS, R. E.; MEDEIROS, M.; ELLIS, V.A.; SVENSSON-COELHO, M.; BLAKE, J. G.; LOISELLE, B. A.; LATTA, S. C. (2017). Avian migration and the distribution of malaria parasites in New World passerine birds. **Journal of biogeography**, 44 (5), 1113 -1123.

ROLIM, F. *et al.* Leishmaniose visceral canina: detecção de DNA em soro por PCR em tempo real. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, n. 14, p. 36-46, 2016.

ROQUE, A.; JANSEN, A. Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.3, n.3, p.251-262, 2014.

SANTOS, G. G. C.; MATUELLA, G. A.; CORAIOLA, A. M.; SILVA, L. C.S.; LANGE, R. R.; SANTIN, E. Doenças de aves selvagens diagnosticadas na Universidade Federal do Paraná (2003-2007). **Pesq. Vet. Bras.** 28 (11) • Nov 2008.

SATRAGNO, D. *et al.* Autochthonous outbreak and expansion of canine visceral leishmaniasis, Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 536-538, mar., 2017.

SEMADUR – Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Desenvolvimento Urbano. **Plano Diretor de Arborização Urbana**. Campo Grande, 2010.

SERENO, D. Leishmania (Mundinia) spp.: from description to emergence as new human and animal Leishmania pathogens. **New Microbes and New Infect.** v. 30, p. 1-3. 2019.

SILVA, E. S. *et al.* Visceral leishmaniasis in the crab-eating fox. **Veterinary Record**, v. 147, p. 422, 2000.

SILVA, D.V.A. *et al.* Georreferenciamento dos Casos de Doenças Tropicais Negligenciadas em Municípios do Norte de Minas Gerais. Fórum de Ensino Pesquisa e Extensão da Universidade Estadual de Montes Claros, 2016. Revista Multidisciplinar do Nordeste Mineiro, v.2 2019/02 Disponível em: <https://revista.unipacto.com.br/index.php/multidisciplinar/article/view/696> Acessado em: 25 de ago. 2024.

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; HONER, M. R. Behavior of Lutzomyia longipalpis, the main vector of American visceral leishmaniasis, in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, p. 420-425, 2007. Disponível em:

<http://https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/VGc9n7mNbcJVgJZpQwbnQ7d/?lang=pt>.
Acessado em: 25 ago. 2024.

SILVA E. S.; OLIVEIRA A. G.; CARVALHO F. G.; SILVA E. A.; FRIOZI E.; FARIAS R. Primeiro relato de leishmaniose visceral canina em área urbana do município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Resumos do 36º Congresso Brasileiro de Medicina Tropical; 2000 Feb. 20-24; São Luís, MA. Brasília; 2000.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO – SINAN. *Informe Epidemiológico da Leishmaniose Visceral*, 2016. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinanet/cnv/leishvms.def>>. Último acesso em jun. 2019.

TATTO M. Detecção de anticorpos anti-Leishmania spp. em aves domésticas de Santa Maria-RS, sul do Brasil. XXf. Dissertação **Manancial repositório UFMS**. 2022.

TINOCO L.; CALDERAN A.; APPEL S.; VICENTE E.; GUEDES N. Mortalidade das grandes araras por eletrocussão em área urbana, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Ambiente & Sociedade**. São Paulo. Vol. 25, 2022.

TUBELIS, D.P. Feeding ecology of Ara ararauna (Aves, Psitacídeos) at firebreaks in western cerrado, Brazil. **Biotemas**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 105-115, 2009.

VARELLA, A. C. Abordagem de sistemas na Agricultura. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/visao-defuturo/integracao-de-conhecimentos-e-detecnologias/sinal-e-tendencia/abordagem-desaude-unica-na-pesquisa>> Acesso em: 30 mai. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. *Leishmaniasis*, 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Último acesso em ago. 2019.

WHO, W.H.O. **Health topics Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>>. Último acesso em Abr. 2024

World Health Organization (WHO). (2021). **Origins of the SARS-CoV-2 virus: Joint WHO-China Study Report**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus/origins-of-the-virus>. Acessado em: 23 de Ago. de 2024.

ZETUN C. B.; LUCHEIS S. B.; TRONCARELLI M. Z.; LANGONI H. (2014). Infecção por trypanosomacruzi em animais silvestres procedentes de zoológicos do estado de são paulo. **Veterinária e Zootecnia**, 139-145.

ZHOU, P. et al. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, 579(7798), 270-273. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2012-7> Acessado em: 23 de Ago. 2024.

ANEXO I



COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS – CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Análise de aves como possíveis hospedeiros de *Leishmania* spp. em Mato Grosso do Sul”, registrada com o nº 3147/2023, sob a responsabilidade do pesquisador Eduardo de Castro Ferreira - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrada, para fins de ensino, pesquisa e/ou desenvolvimento de recursos didáticos – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Anhanguera-Uniderp, em reunião de 17/04/2023.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/05/2023 a 25/10/2023
Espécie/Linhagem/Raça	Psitacídeos
Nº de animais	200
Peso/idade	Adultos
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Instituto Arara Azul e Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS/MS)

Campo Grande - MS, 17 de abril de 2023.