

UNIVERSIDADE PARANAENSE – UNIPAR
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL COM ÊNFASE EM
PRODUTOS BIOATIVOS

JESSICA SUEMI ALMEIDA KIKUTI

**CARACTERIZAÇÃO HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE EQUINOS
ASSINTOMÁTICOS SORORREAGENTES PARA *LEISHMANIA* SPP.
PREVIAMENTE AVALIADOS POR ELISA E QPCR**

Umuarama
2026

JESSICA SUEMI ALMEIDA KIKUTI

**CARACTERIZAÇÃO HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE EQUINOS
ASSINTOMÁTICOS SORORREAGENTES PARA *LEISHMANIA* SPP.
PREVIAMENTE AVALIADOS POR ELISA E QPCR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos da Universidade Paranaense como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal com área de concentração em Saúde Única.

Orientação: Dra. Ana Maria Quessada

Umuarama
2026

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Paranaense.**

Ficha Catalográfica

K47c Kikuti, Jéssica Suemi Almeida.

Caracterização hematológica e bioquímica de equinos
assintomáticos sororreagentes para *Leishmania* spp. previamente
avaliados por ELISA e qPCR / Jéssica Suemi Almeida Kikuti. –
Umuarama : Universidade Paranaense – UNIPAR, 2026.
60 f.

Orientadora: Dr^a. Ana Maria Quessada.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Paranaense –
UNIPAR.

1. Leishmaniose equina. 2. Hematologia. 3. Bioquímica
sérica. 4. qPCR. 5. Epidemiologia. I. Universidade Paranaense –
UNIPAR. II. Título.

(21 ed.) CDD: 636.1

Bibliotecária Responsável Regiane Luiza Campaneli CRB 9/2194

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos da Universidade Paranaense e na *Unidade de Umuarama da Universidade Paranaense* como requisito para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos – Área de Concentração Saúde Única, sob orientação da Dra. Ana Maria Quessada.

**CARACTERIZAÇÃO HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE EQUINOS
ASSINTOMÁTICOS SORORREAGENTES PARA *LEISHMANIA* SPP.
PREVIAMENTE AVALIADOS POR ELISA E QPCR**

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa abaixo relacionadas:

(Colocar somente as agências de fomento que financiaram o projeto de pesquisa)

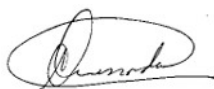
1 CAPES: Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior

2 CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

JESSICA SUEMI ALMEIDA KIKUTI

**CARACTERIZAÇÃO HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE EQUINOS
ASSINTOMÁTICOS SORORREAGENTES PARA *LEISHMANIA* SPP.
PREVIAMENTE AVALIADOS POR ELISA E QPCR**

Trabalho de conclusão do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos aprovado como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos pela Universidade Paranaense – UNIPAR, pela seguinte banca examinadora:



Dra. Ana Maria Quessada
Doutora em Medicina Veterinária Unesp Botucatu
Docente da Universidade Paranaense – UNIPAR (orientadora)

Dr. Max Gimenez Ribeiro
Doutor em Clínica Cirúrgica Veterinária Universidade de São Paulo
Docente da Universidade Estadual de Maringá – UEM

Dr. André Giarola Boscarato
Doutor em Ciência Animal Universidade Paranaense
Docente da Universidade Paranaense – UNIPAR

Umuarama, 29 de junho de 2026.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio incondicional e por serem o alicerce de todos os meus sonhos. Sem o incentivo de vocês, essa trajetória até aqui não teria sido possível e nem faria sentido.

À minha orientadora, Dra. Ana Maria Quessada, pela paciência, generosidade no compartilhamento de conhecimento e pela orientação científica e humana em todas as etapas desta pesquisa. Ela foi um pilar substancial para que esse trabalho pudesse ser concluído, que me incentivou a vencer os obstáculos e me lembrou constantemente do que eu era capaz quando eu não mais podia ver isso. Agradeço por acreditar neste projeto.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pelos valiosos ensinamentos, orientações e contribuições acadêmicas, que foram fundamentais para a construção do meu pensamento crítico e científico. Cada aprendizado ao longo dessa trajetória reforçou em mim a certeza de que o conhecimento é um processo contínuo, despertando o desejo constante de aprender e evoluir.

Aos amigos, pelo apoio, pelas trocas de experiências e pelos momentos compartilhados ao longo dessa jornada.

Aos cavalos que fizeram parte deste estudo, razão deste trabalho. Que esta pesquisa possa contribuir para uma melhor compreensão da leishmaniose e, consequentemente, para o bem-estar de sua espécie e para a saúde única.

Ao meu pai, que infelizmente não pôde estar presente para acompanhar a conclusão desta etapa. Guardo com carinho sua lembrança e acredito que ele estaria imensamente feliz com esta conquista. Sua força, ensinamentos e seu amor permanecem vivos em mim todos os dias. Serei eternamente sua maior fã.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigada.

"Toda cientista sonha em fazer algo que possa ajudar o mundo."

(Tu Youyou, 2015)

KIKUTI, Jessica Suemi Almeida. **Caracterização hematológica e bioquímica de equinos assintomáticos sororreagentes para *leishmania* spp. Previamente avaliados por elisa e Qpcr.** Orientador: Ana Maria Quessada. Ano. 2026 f.55. Dissertação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos) - Universidade Paranaense, Umuarama, 2026.

RESUMO

A leishmaniose é uma zoonose de ampla distribuição geográfica e relevância para a saúde pública e veterinária, cuja participação dos equinos na epidemiologia da doença ainda não está completamente esclarecida. O presente estudo teve como objetivo caracterizar o perfil hematológico e bioquímico de equinos assintomáticos expostos à *Leishmania* spp., contribuindo para a compreensão da infecção subclínica nessa espécie. Foram avaliados 112 equinos clinicamente saudáveis, machos e fêmeas, provenientes de uma sociedade rural localizada na região Centro-Norte do Estado do Paraná. Os animais foram submetidos à avaliação clínica, incluindo frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal, avaliação das mucosas, tempo de preenchimento capilar e presença de edema. O diagnóstico sorológico foi realizado por meio do ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), utilizando antígenos de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis*. Das 112 amostras analisadas, 31 (27,67%; 31/112) apresentaram sororreatividade para pelo menos um dos antígenos testados. As amostras reagentes foram submetidas à reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR), utilizando *primers* direcionados ao DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* spp., sendo detectado DNA do parasito em 21 (67,74%; 21/31) dos animais soropositivos. A avaliação hematológica e bioquímica foi realizada nos 31 equinos reagentes ao ELISA, incluindo hemograma completo e análises séricas de ureia, creatinina, bilirrubina total, bilirrubina direta, bilirrubina indireta e enzimas hepáticas. Os animais não apresentaram alterações clínicas sugestivas de leishmaniose, mantendo os parâmetros físicos dentro dos limites fisiológicos para a espécie. Os parâmetros hematológicos permaneceram, em sua maioria, dentro dos intervalos de referência, embora alguns animais tenham apresentado valores eritrocitários próximos ao limite inferior. Da mesma forma, os parâmetros bioquímicos avaliados não demonstraram alterações significativas compatíveis com comprometimento hepático ou renal associado à infecção. A análise integrada dos achados clínicos, hematológicos, bioquímicos e diagnósticos indicou ausência de repercussões sistêmicas compatíveis com a forma clínica da doença. Os resultados demonstram a exposição de equinos à infecção por *Leishmania* spp. evidenciando a circulação do parasito na região estudada e destacando a importância da inclusão dessa espécie em investigações epidemiológicas da leishmaniose. Além disso, reforçam a

necessidade de estudos adicionais para esclarecer o papel dos equinos na manutenção do ciclo epidemiológico da infecção.

Palavras-chave: leishmaniose equina; hematologia; bioquímica sérica; qPCR; epidemiologia.

KIKUTI, Jessica Suemi Almeida. Hematological and Biochemical Characterization of Asymptomatic Horses Seroreactive for *Leishmania* spp. Previously Evaluated by ELISA and qPCR. Advisor: Ana Maria Quessada. 2026. 55 p. Dissertation (Master's degree) in Animal Science with Emphasis on Bioactive Products – Universidade Paranaense, Umuarama, 2026.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a zoonotic disease with wide geographic distribution and significant relevance to both public and veterinary health. However, the role of equids in the epidemiology of the disease remains poorly understood. This study aimed to characterize the hematological and biochemical profile of asymptomatic horses exposed to *Leishmania* spp., contributing to the understanding of subclinical infection in this species. A total of 112 clinically healthy male and female horses from a rural society located in the North-Central region of the State of Paraná, Brazil, were evaluated. Animals underwent clinical examination, including assessment of heart rate, respiratory rate, rectal temperature, mucous membrane status, capillary refill time, and the presence of edema. Serological diagnosis was performed using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with antigens of *Leishmania amazonensis*, *Leishmania infantum*, and *Leishmania braziliensis*. Of the 112 samples analyzed, 31 (27.67%; 31/112) were seroreactive to at least one of the tested antigens. Reactive samples were further analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) using primers targeting the kinetoplast DNA (kDNA) of *Leishmania* spp., and parasite DNA was detected in 21 (67.74%; 21/31) seropositive animals. Hematological and biochemical evaluations were performed on the 31 ELISA-reactive horses and included a complete blood count, serum urea, creatinine, total bilirubin, direct bilirubin, indirect bilirubin, and liver enzyme analyses. The animals showed no clinical signs suggestive of leishmaniasis, and physical examination parameters remained within normal physiological ranges for the species. Most hematological parameters were within reference intervals, although some horses presented erythrocyte values close to the lower reference limit. Similarly, the biochemical parameters evaluated did not reveal significant alterations indicative of hepatic or renal impairment associated with infection. The integrated analysis of clinical, hematological, biochemical, and diagnostic findings indicated the absence of systemic manifestations compatible with the clinical form of the disease. These results demonstrate the exposure of horses to *Leishmania* spp., evidencing parasite circulation in the studied region and highlighting the importance of including this species in epidemiological investigations of leishmaniasis. Furthermore, the findings reinforce the need for additional studies to clarify the role of horses in the maintenance of the epidemiological cycle of the infection.

Keywords: equine leishmaniasis; hematology; serum biochemistry; qPCR; epidemiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo 1 - Caracterização hematológica e bioquímica de equinos assintomáticos sororreagentes para *Leishmania* spp. previamente avaliados por ELISA e qPCR

Figura 1. Relação entre contagem de hemácias e níveis de bilirrubina total em equinos assintomáticos positivos (n=31) para *Leishmania* spp 45

Figura 2. Relação entre concentração de hemoglobina e níveis de bilirrubina total em equinos assintomáticos positivos (n=31) para *Leishmania* spp.....45

LISTA DE TABELAS

Artigo 1 - Caracterização hematológica e bioquímica de equinos assintomáticos sororreagentes para *Leishmania* spp. previamente avaliados por ELISA e qPCR

Tabela 1 – Resultados do ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) utilizando antígenos de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*, e da PCR quantitativa em tempo real (qPCR) realizada em amostras de soro de equinos atletas provenientes da região Norte-Central do Estado do Paraná, Brasil (n=112).....37

Tabela 2 – Parâmetros eritrocitários de equinos assintomáticos positivos para *Leishmania* spp. (n = 31), expressos em média $\pm$ desvio padrão, valores de referência e frequência de animais fora dos intervalos de referência.....39

Tabela 3 – Leucograma e contagem plaquetária de equinos assintomáticos positivos para *Leishmania* spp. (n = 31).....40

Tabela 4 – Perfil bioquímico sérico de equinos assintomáticos positivos para *Leishmania* spp. (n = 31).42

Tabela 5 – Valores de bilirrubina em cavalos portadores de *Leishmania* spp. (n=31)43

Tabela 6 – Valores médios ($\pm$ desvio padrão) e comparação dos parâmetros laboratoriais de equinos positivos para *Leishmania* spp. (n = 31) com os valores de referência da espécie equina.46

LISTA DE SIGLAS

CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

COPG Coordenadoria de Pós-Graduação

UNIPAR Universidade Paranaense

AST Aspartato Aminotransferase

BD Bilirrubina Direta

BI Bilirrubina Indireta

BT Bilirrubina Total

CEPEEA Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal

CK Creatina Quinase

DNA Ácido Desoxirribonucleico

EDTA Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

ELISA *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

GGT Gama-Glutamil Transferase

IFN- γ Interferon Gama

IL Interleucina

LCV Leishmaniose Visceral Canina

OMS Organização Mundial da Saúde

Qpcr Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
$\pm$	Mais ou menos (desvio padrão)
Γ	Gama
μL	Microlitro
mg/Dl	Miligramas por decilitro
N	Número amostral
P	Nível de significância estatística
R	Coefficiente de correlação de Pearson
U/L	Unidades por litro
$\times 10^6/\mu\text{L}$	Milhões de células por microlitro

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 – LEISHMANIOSE EM EQUINOS: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E LABORATORIAIS.....	15
1.1	Introdução	16
1.2	Revisão da Literatura	18
1.3	Referências	25
1.4	Objetivo	28
	CAPÍTULO 2 – ARTIGO	29
2.1	ARTIGO 1 - CARACTERIZAÇÃO HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE EQUINOS ASSINTOMÁTICOS SORORREAGENTES PARA <i>LEISHMANIA</i> SPP. PREVIAMENTE AVALIADOS POR ELISA E QPCR.....	30
	RESUMO.....	31
	ABSTRACT.....	32
	Introdução	32
	Material e Métodos	34
	Animais e local do estudo.....	34
	Exame clínico	35
	Diagnóstico sorológico para <i>Leishmania</i> spp.....	35
	Diagnóstico molecular para <i>Leishmania</i> spp.....	35
	Avaliação hematológica e bioquímica	35
	Resultados e discussão.....	36
	Referências	48
3	CONCLUSÃO	50
4	APÊNDICES	51
5	ANEXOS	53

ANEXO 1 - Normas do periódico Vector borne and zoonotic diseases.....	53
ANEXO 2 - Declaração de uso de inteligência artificial generativa e integridade de referências	55

CAPÍTULO 1

REVISÃO DA LITERATURA

1 **LEISHMANIOSE EM EQUINOS: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E**
2 **LABORATORIAIS**

3 O capítulo 1 foi editado de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas
4 Técnicas - ABNT.

5

6

1.1 Introdução

A leishmaniose constitui um complexo de doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos principalmente por insetos flebotomíneos. Considerada uma importante zoonose e classificada pela Organização Mundial da Saúde como uma Doença Tropical Negligenciada (DTN), apresenta ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais, afetando humanos e diferentes espécies animais (WHO, 2025; Akhoundi et al., 2016). Em equinos, a infecção por *Leishmania* spp. tem sido descrita em diferentes países, incluindo o Brasil, com relatos envolvendo principalmente infecções assintomáticas ou manifestações cutâneas localizadas (Fernández-Bellon et al., 2006; Mhadhbi; Sassi, 2020). Estudos desenvolvidos em equídeos demonstram a ocorrência da infecção em cavalos, burros, mulas e pôneis, sugerindo a exposição frequente desses animais ao parasito em áreas endêmicas (Benassi et al., 2018; Nascimento et al., 2024; Soares et al. 2013; Truppel et al., 2014).

Apesar do crescente número de relatos, a participação epidemiológica dos equídeos na dinâmica de transmissão da leishmaniose ainda permanece pouco esclarecida. A ausência de sinais clínicos evidentes na maioria dos animais dificulta o diagnóstico rotineiro e favorece a subnotificação da infecção (Limeira et al., 2019; Mhadhbi e Sassi 2020). No estado do Paraná, esse cenário ganha relevância visto que a leishmaniose tegumentar americana apresenta caráter endêmico, constituindo um importante problema de saúde pública. A doença encontra-se amplamente distribuída no território paranaense, com maior concentração de casos nas regiões Norte, Noroeste e Centro-Norte do estado, áreas que reúnem condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento dos flebotomíneos vetores, incluindo fragmentos florestais, elevada umidade e intensa interface entre ambientes rurais e urbanos (Monteiro et al., 2009; Sesa-PR, 2025). Conforme os dados epidemiológicos persiste a circulação ativa do parasito no estado, tendo sido registrados 7.849 casos de leishmaniose tegumentar americana e 36 casos de leishmaniose visceral humana no período analisado entre 2001 e 2022 (Ferreira, 2024).

Nesse contexto de transmissão ativa, a identificação de diferentes espécies animais naturalmente expostas ao parasito torna-se fundamental para a compreensão da dinâmica epidemiológica da doença e para o desenvolvimento de estratégias de vigilância em áreas endêmicas. Para tanto, a utilização de métodos laboratoriais e complementares torna-se

38 indispensável para a identificação correta desses portadores assintomáticos. Diante disso, a
39 presente revisão teve como objetivo realizar uma revisão narrativa da literatura sobre a
40 leishmaniose em equinos, sintetizando os principais aspectos epidemiológicos, como
41 distribuição geográfica e fatores de risco e laboratoriais, incluindo métodos diagnósticos
42 diretos e sorológicos, a fim de compilar o conhecimento disponível, identificar lacunas
43 científicas e contribuir para a vigilância sanitária e clínica desses animais.

44

1.2 Revisão da Literatura

1.2.1 Etiologia e Epidemiologia Geral da Leishmaniose

A leishmaniose constitui um complexo de doenças infecciosas causadas por protozoários digenéticos do gênero *Leishmania*, sendo considerada uma das zoonoses parasitárias de maior impacto mundial. A enfermidade está presente em mais de 100 países distribuídos pelas regiões tropicais, subtropicais e mediterrâneas, afetando milhões de pessoas e animais. Segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que entre 700 mil e um milhão de novos casos ocorram anualmente, configurando-se como uma das principais doenças tropicais negligenciadas devido à sua ampla distribuição geográfica, elevada carga de morbidade e forte associação com condições socioeconômicas desfavoráveis, como pobreza, urbanização desordenada, desmatamento e deficiência de saneamento básico (Alvar et al., 2012; WHO, 2025).

Do ponto de vista etiológico, o gênero *Leishmania* compreende mais de 50 espécies descritas, das quais pelo menos 21 apresentam potencial patogênico para humanos e diferentes espécies animais. Esses protozoários possuem ciclo biológico heteroxênico, desenvolvendo-se na forma promastigota no trato digestório de flebotomíneos vetores e na forma amastigota intracelular em células do sistema fagocitário mononuclear dos hospedeiros vertebrados. Nas Américas, as espécies de maior importância epidemiológica incluem a *Leishmania infantum*, que atua como o principal agente da leishmaniose visceral zoonótica, e a *Leishmania braziliensis*, associada classicamente à leishmaniose tegumentar americana (Akhoundi et al., 2016).

A ocorrência e a distribuição dessas espécies influenciam diretamente os padrões clínicos da doença e a dinâmica de transmissão entre vetores, hospedeiros e reservatórios (Burza et al., 2018). Essa complexa interação define o papel biológico de cada espécie. Os cães são reconhecidos como os principais reservatórios domésticos da *L. infantum*, enquanto diversas outras espécies animais atuam apenas como hospedeiros incidentes ou acidentais, tornando-se infectadas sem necessariamente desempenhar papel relevante na manutenção do ciclo de transmissão (Dostálová e Volf, 2012).

1.2.2 O Desafio da Infecção Assintomática

Embora a leishmaniose seja endêmica em quase uma centena de países, os dados oficiais subestimam drasticamente a real magnitude da doença. Esta discrepância deve-se, em grande parte, a falhas no diagnóstico e, sobretudo, à vasta população de indivíduos humanos e animais assintomáticos não diagnosticados (Michel et al., 2011; Singh et al., 2014). Apesar de a população assintomática representar a maior proporção de indivíduos infectados, não existe um consenso absoluto na comunidade científica quanto à definição exata desta condição, nem sobre os meios mais acurados para detectar um portador silencioso da infecção (Hasker et al., 2013). Alguns autores definem o portador assintomático como um indivíduo clinicamente saudável, residente em área endêmica, que apresenta positividade em pelo menos um teste molecular, sorológico ou celular, ao passo que outros investigadores exigem a combinação de múltiplos testes para confirmar este estado de infecção latente (Torrellas et al., 2014; Owen et al., 2021).

O reconhecimento e a monitorização da população assintomática são de vital importância para a saúde pública e veterinária por duas razões centrais. Primeiramente, estes indivíduos, incluindo potenciais reservatórios animais, podem atuar como fontes silenciosas do parasito, mantendo o risco contínuo de transmissão para o vetor flebotomíneo (Stauch et al., 2011; Michel et al., 2011; Singh et al., 2014). Em segundo lugar, a compreensão aprofundada dos múltiplos fatores imunológicos e fisiológicos que impedem o desenvolvimento clínico da doença pode fornecer subsídios cruciais para reduzir a taxa de transmissão a partir deste reservatório oculto. Esse entendimento auxilia diretamente no estabelecimento de critérios diagnósticos padronizados e metodicamente rigorosos para o controle da enfermidade (Hasker et al., 2013; Owen et al., 2021; Torrellas et al., 2014).

1.2.3 Cenário Epidemiológico no Estado do Paraná

O Estado do Paraná é historicamente considerado uma área endêmica para a leishmaniose tegumentar americana, apresentando transmissão persistente em diversas regiões, particularmente naquelas associadas a fragmentos florestais e atividades agropecuárias (Bassotto, 2020). A doença encontra-se amplamente distribuída no território paranaense, com maior concentração de casos nas regiões Norte, Noroeste e Centro-Norte, áreas que reúnem condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento dos flebotomíneos

vetores, como elevada umidade e intensa interface entre ambientes rurais e urbanos (Monteiro et al., 2009; Sesa-PR, 2025).

Por outro lado, a leishmaniose visceral, anteriormente considerada ausente no estado, passou a ser registrada a partir da última década. Os primeiros registros ocorreram na região de Foz do Iguaçu, onde foram identificados o vetor *Lutzomyia longipalpis*, casos caninos autóctones e, posteriormente, casos humanos da doença (Chiyo, 2022; Thomaz-Soccol et al., 2018). Dados epidemiológicos consolidados demonstram a persistência da circulação parasitária no estado, tendo sido registrados 7.849 casos de leishmaniose tegumentar americana e 36 casos de leishmaniose visceral humana no período entre 2001 e 2022 (Ferreira, 2024).

Neste contexto, a identificação de diferentes espécies animais naturalmente expostas ao parasito torna-se relevante para a vigilância epidemiológica. Para os equinos, a epidemiologia no Paraná merece destaque devido à crescente evidência da circulação de *Leishmania* spp. em diferentes regiões do estado. Embora os cavalos não sejam considerados reservatórios primários, investigações estruturadas têm demonstrado a ocorrência de animais soropositivos e positivos em testes moleculares (Benassi et al., 2018; Truppel et al., 2014). Esses achados reforçam a importância dos equinos como sentinelas epidemiológicas, especialmente em ambientes rurais e periurbanos onde há estrita interação entre vetores, animais domésticos e seres humanos (Vedovello Filho et al., 2021).

1.2.4 Leishmaniose em Equinos e Espécies de *Leishmania* Associadas

A leishmaniose equina é considerada uma enfermidade emergente e ainda pouco compreendida quando comparada à doença em cães e seres humanos. A susceptibilidade à infecção por *Leishmania* spp. varia consideravelmente entre as espécies hospedeiras; enquanto os cães frequentemente desenvolvem infecção sistêmica grave, os equinos tendem a apresentar infecção predominantemente assintomática ou restrita a manifestações cutâneas localizadas (Benassi et al., 2018; Limeira et al., 2019). Quando presentes, as lesões são caracterizadas por nódulos, pápulas e úlceras solitárias, localizadas principalmente na cabeça, membros e regiões com menor cobertura pilosa (Limeira et al., 2019; Martínez-Sáez et al., 2023).

Historicamente, *Leishmania (Viannia) braziliensis* tem sido a espécie mais associada à infecção equina no Brasil, sobretudo em casos de leishmaniose cutânea (Limeira et al., 2019). Entretanto, investigações recentes têm demonstrado a ocorrência de infecção natural por *Leishmania infantum* em equinos assintomáticos residentes em áreas endêmicas para leishmaniose visceral, sugerindo que a infecção pode ocorrer de forma silenciosa e persistente (Benassi et al., 2018; Escobar et al., 2019).

Adicionalmente, a detecção de anticorpos contra *Leishmania amazonensis* em equinos tem sido relatada em triagens sorológicas, embora o papel específico dessa espécie na infecção equina permaneça pouco esclarecido. A utilização simultânea de antígenos de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* em painéis de diagnóstico permite uma avaliação mais abrangente da exposição em áreas onde diferentes agentes etiológicos coexistem (Limeira et al., 2019). Confirmando essa premissa no cenário regional, foi observada no Paraná uma frequência de reatividade sorológica de 22,32% para *L. amazonensis*, seguida por 15,18% para *L. braziliensis* e *L. infantum*, evidenciando a exposição concomitante dos equinos a múltiplos determinantes etiológicos (Lopes et al., 2021). Embora os equinos não sejam atualmente reconhecidos como reservatórios comprovados, a constante detecção de anticorpos e DNA parasitário em animais clinicamente saudáveis (Escobar et al., 2019; Pala et al., 2024) destaca a necessidade de compreender melhor o papel epidemiológico da espécie sob a perspectiva da Saúde Única.

1.2.5 Patogenia e Resposta Imunológica: Equinos versus Cães

A manifestação da leishmaniose varia drasticamente entre as espécies de mamíferos, sendo o cão (*Canis familiaris*) e o equino (*Equus caballus*) exemplos contrastantes de patogenia e competência imunológica. A resistência ou susceptibilidade ao parasito é determinada primariamente pelo direcionamento da resposta imune do hospedeiro. O controle do parasito depende da ativação de uma resposta imune celular do tipo Th1, caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como o Interferon-gama (IFN- γ), que ativa macrófagos para a destruição intracelular das amastigotas (Reis et al., 2006).

Nos equinos, a capacidade de manter a infecção sob um caráter predominantemente subclínico é atribuída a uma resposta celular robusta e eficiente, com marcante participação dos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos no controle da carga parasitária. Enquanto os linfócitos T CD4⁺ coordenam a resposta imune, as células CD8⁺ atuam diretamente na eliminação de

células infectadas e na secreção de citocinas leishmanicidas (Pinelli et al., 1995; Miller et al., 2006). Esse mecanismo impede a disseminação sistêmica acentuada do protozoário, limitando-o a tecidos periféricos ou a níveis tão reduzidos que impossibilitam a ocorrência de danos orgânicos determináveis (Fernández-Bellon et al., 2006).

Ao confrontar os aspectos patogênicos e imunológicos dessas duas espécies, evidencia-se um nítido contraste em seus modelos biológicos. O modelo canino caracteriza-se por um perfil clínico predominantemente visceral, sistêmico e severo, gerado por um desvio humoral associado à exaustão celular. Esse quadro resulta em uma elevada carga parasitária e disseminação multiorgânica crônica, com intenso acometimento de órgãos internos vitais como a medula óssea, baço, fígado e rins (Reis et al., 2006; Freitas et al., 2012).

Por outro lado, o modelo equino expressa-se de maneira inversa, destacando-se pelo perfil subclínico, assintomático ou cutâneo localizado. Essa condição é mediada por uma resposta celular robusta com ativação expressiva de linfócitos T CD8+, o que propicia uma carga parasitária reduzida e controlada de forma periférica. Essa adaptação evolutiva e imunológica impede a ocorrência de danos internos e favorece o estado de portador assintomático, garantindo a manutenção da homeostase orgânica. Dessa forma, a ausência de alterações laboratoriais marcantes nesses animais não indica a ausência do parasito, mas sim uma contenção eficiente da infecção (Benassi et al., 2018; Limeira et al., 2019; Mhadhbi e Sassi, 2020).

1.2.6 Alterações Hematológicas e Bioquímicas na Leishmaniose

Os exames hematológicos e bioquímicos séricos constituem importantes ferramentas auxiliares na avaliação do comprometimento sistêmico causado pela infecção por *Leishmania* spp. Embora não sejam específicos para a confirmação etiológica, tais exames auxiliam na determinação do prognóstico, na investigação de diagnósticos diferenciais e no monitoramento orgânico (Solano-Gallego et al., 2009). No que tange ao perfil hematológico, as alterações variam drasticamente conforme a espécie hospedeira. Em cães com leishmaniose visceral, são frequentemente descritas anemia normocítica normocrômica não regenerativa, decorrente de inflamação crônica e supressão medular, além de trombocitopenia e leucocitose ou leucopenia, dependendo do grau de envolvimento da medula óssea (Paltrinieri et al., 2010).

Em contrapartida, na espécie equina, a maioria dos estudos relata ausência de alterações hematológicas significativas, especialmente em animais assintomáticos. Foi observado que equinos soropositivos mantêm valores de hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos e plaquetas estritamente dentro dos intervalos de referência para a espécie, reforçando a hipótese de que a infecção subclínica cursa sem repercussões sistêmicas importantes (Benassi et al., 2018; Limeira et al., 2019).

Sob a perspectiva do perfil bioquímico renal e hepático, a ureia e a creatinina são os marcadores padrão para a avaliação da função renal. Na leishmaniose canina, o aumento dessas variáveis devido à glomerulonefrite mediada por imunocomplexos constitui uma das principais causas de óbito (Paltrinieri et al., 2010), ao passo que nos equinos, o comprometimento renal associado à infecção por *Leishmania* spp. é uma condição raramente descrita (Solano-Gallego et al., 2009; Benassi et al., 2018). Quanto à integridade hepática e muscular, as enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) auxiliam na detecção de lesão hepatocelular ou colestase induzida pelo parasito no modelo canino (Koutinas, 2014). Para os equinos, a AST e a creatina quinase (CK) são preferencialmente utilizadas para avaliar a integridade hepática e muscular, respectivamente. Em cavalos clinicamente saudáveis, variações discretas dessas enzimas são comumente associadas ao exercício físico, manejo ou contenção, sem necessariamente indicar processos patológicos infecciosos (Thrall et al., 2012).

Ademais, as particularidades do metabolismo da bilirrubina nos equinos apresentam características fisiológicas singulares que exigem cautela na interpretação do perfil bioquímico, diferenciando-se de outras espécies domésticas. A bilirrubina é o produto final do catabolismo da fração heme da hemoglobina, resultante da destruição fisiológica ou patológica de eritrócitos senescentes pelo sistema fagocitário mononuclear (Kaneko et al., 2008). Nos cavalos, a maior parte da bilirrubina total circulante em condições de normalidade é composta pela fração não conjugada ou indireta. A captação hepática da bilirrubina indireta para posterior conjugação com o ácido glicurônico é um processo fisiológico que compete diretamente com o transporte de ácidos graxos livres. Qualquer estado de privação alimentar, jejum transitório, anorexia ou estresse acentuado pode resultar em uma elevação rápida e significativa dos níveis de bilirrubina sérica, fenômeno denominado hiperbilirrubinemia de jejum (Divers e Reed, 2018; Thrall et al., 2022). Portanto, nesta espécie, a icterícia ou o aumento isolado da bilirrubina total às custas da fração indireta não mimetizam

necessariamente processos hemolíticos ou colestase grave como ocorre em cães e gatos; variações discretas a moderadas refletem frequentemente apenas flutuações na ingestão calórica ou estresse metabólico (Stockham; Scott, 2021). Para a confirmação fidedigna de quadros hemolíticos em cavalos, torna-se indispensável correlacionar os níveis de bilirrubinemia com os índices eritrocitários globais, incluindo a contagem global de hemácias, o hematócrito e a dosagem de hemoglobina.

230

231

232

Referências

- AKHOUNDI, M. *et al.* A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 3, e0004349, 2016. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004349.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 5, e35671, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0035671.
- BASSOTTO, Dayane *et al.* **Perfil epidemiológico da Leishmaniose no estado do Paraná – 2001 a 2017**. [S. l.], 2020.
- BENASSI, J. C. *et al.* Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in horses from an endemic area for canine visceral leishmaniasis in southeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 6, p. 1058-1063, 2018.
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, London, v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2.
- CHIYO, Luciana. **Análise espacial e epidemiológica dos casos de Leishmaniose Visceral Canina e Humana em Foz do Iguaçu, entre os anos de 2015 e 2020**. [S. l.], 2022.
- DIVERS, T. J.; REED, S. M. **Equine internal medicine**. 4. ed. St. Louis: Elsevier, 2018.
- DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions revisited. **Trends in Parasitology**, Cambridge, v. 28, n. 11, p. 486-494, 2012. DOI: 10.1016/j.pt.2012.06.010.
- ESCOBAR, Taiane Acunha *et al.* Assessment of *Leishmania infantum* infection in equine populations in a canine visceral leishmaniosis transmission area. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 381, 2019.
- FERNÁNDEZ-BELLON, H. *et al.* Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 181-185, 2006.
- FERREIRA, Bárbara Freire. **Distribuição espacial e temporal de leishmaniose visceral e tegumentar no estado do Paraná dos anos de 2001 a 2022**. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2024. Disponível em: <https://dspace.unila.edu.br/items/60625a54-1599-4706-b82b-33632c07b98e>. Acesso em: 18 jun. 2026.
- FILHO, D. Vedovello *et al.* American cutaneous leishmaniasis in horses from endemic areas in the north-central mesoregion of Paraná state, Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, n. 3, p. 149-155, 2008.
- FREITAS, J. C. C. *et al.* Hematological and biochemical alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 45, n. 1, p. 24-29, 2012.

- HASKER, E. *et al.* Latent infection with *Leishmania donovani* in highly endemic villages in Bihar, India. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 2, e2053, 2013. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002053.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008.
- KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*/chagasi. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 527-538, 2014.
- LIMEIRA, C. H. *et al.* *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in horses from a visceral leishmaniasis-endemic area. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 28, n. 4, p. 724-730, 2019. DOI: 10.1590/S1984-29612019067.
- MARTINEZ-SÁENZ, M. *et al.* Seroprevalence and molecular detection of *Leishmania infantum* in apparently healthy horses from Spain. **Animals**, v. 13, n. 3, p. 1-12, 2023. DOI: 10.3390/ani13030424.
- MHADHBI, M.; SASSI, A. Equine leishmaniasis: a review of a neglected disease. **Veterinary Medicine and Science**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 301-310, 2020. DOI: 10.1002/vms3.229.
- MICHEL, G. *et al.* Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (L. chagasi) in human. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 119, n. 2-3, p. 69-75, 2011. DOI: 10.1016/j.actatropica.2011.05.012.
- MONTEIRO, W. M. *et al.* Pólos de produção de leishmaniose tegumentar americana no Norte do Estado do Paraná, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 5, p. 1083-1092, 2009.
- MÜLLER, Norbert *et al.* Occurrence of *Leishmania* sp. in cutaneous lesions of horses in Central Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 3-4, p. 346-351, 2009.
- OWEN, Sophie I. *et al.* Detection of asymptomatic *Leishmania* infection in Bangladesh by antibody and antigen diagnostic tools shows an association with post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) patients. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 111, 2021.
- PALA, Samuele *et al.* Prevalence and factors associated with *Leishmania* spp. and *Toxoplasma gondii* infections in apparently healthy horses in Eastern Spain. **Research in Veterinary Science**, v. 171, p. 105236, 2024.
- PALTRINIERI, Saverio *et al.* Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1184-1191, 2010.
- PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde (SESA). **Leishmanioses**. Curitiba: SESA-PR, 2025. Disponível em: <https://www.saude.pr.gov.br>. Acesso em: 18 jun. 2026.

- PINELLI, Elena *et al.* Leishmania infantum-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 6, p. 1594-1600, 1995.
- REIS, A. B. *et al.* Hematological and biochemical changes in dogs naturally infected by Leishmania infantum with different clinical forms. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 138, n. 3-4, p. 182-192, 2006. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.02.001.
- SINGH, O. P. *et al.* Asymptomatic Leishmania infection: a new challenge for Leishmania control. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 58, n. 10, p. 1424-1429, 2014. DOI: 10.1093/cid/ciu102.
- SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009.
- STAUCH, A. *et al.* Visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent: modelling epidemiology and control. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, n. 11, e1405, 2011. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001405.
- STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. 3. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2021.
- THOMAZ-SOCCOL, V. *et al.* Hidden danger: Unexpected scenario in the vector-parasite dynamics of leishmaniasis in the Brazil side of triple border (Argentina, Brazil and Paraguay). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, e0006336, 2018. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006336.
- THRALL, M. A. *et al.* **Veterinary hematology, clinical chemistry and cytology**. 3. ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2012.
- TORRELLAS, A. *et al.* Surveillance for Leishmania asymptomatic infection in endemic foci of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 108, n. 1, p. 1-7, 2014. DOI: 10.1093/trstmh/trt099.
- TRUPPEL, J. H. *et al.* Can Equids Be a Reservoir of Leishmania braziliensis in Endemic Areas? **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, e93731, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0093731.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**: fact sheet. Geneva: WHO, 2025. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 9 maio 2026.

1.4 Objetivo

O presente estudo teve como objetivo caracterizar o perfil hematológico e bioquímico de equinos assintomáticos expostos à *Leishmania* spp. na região Centro-Norte do Estado do Paraná. Para isso, buscou-se identificar a taxa de sororreatividade (ELISA) para diferentes espécies do parasito (*L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. braziliensis*), confirmar a presença do DNA parasitário por qPCR e correlacionar esses diagnósticos com as avaliações clínicas, hemograma e biomarcadores de função renal e hepática, contribuindo para o entendimento da infecção subclínica e do papel epidemiológico da espécie equina.

CAPÍTULO 2

ARTIGO

Caracterização hematológica e bioquímica de equinos assintomáticos sororreagentes para *Leishmania* spp. previamente avaliados por ELISA e qPCR.

Artigo formatado de acordo com as normas da revista Vector-Borne and Zoonotic Diseases.

**CARACTERIZAÇÃO HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE EQUINOS
ASSINTOMÁTICOS SORORREAGENTES PARA *LEISHMANIA* SPP.
PREVIAMENTE AVALIADOS POR ELISA E QPCR.**

KIKUTI, Jessica Suemi Almeida ¹

QUESSADA, Ana Maria ²

RESUMO

A leishmaniose é uma zoonose de ampla distribuição geográfica e relevância para a saúde pública e veterinária, cuja participação dos equinos na epidemiologia da doença ainda não está completamente esclarecida. O presente estudo teve como objetivo caracterizar o perfil hematológico e bioquímico de equinos assintomáticos expostos à *Leishmania* spp., contribuindo para a compreensão da infecção subclínica nessa espécie. Foram avaliados 112 equinos clinicamente saudáveis, machos e fêmeas, provenientes de uma sociedade rural localizada na região Centro-Norte do Estado do Paraná. Os animais foram submetidos à avaliação clínica, incluindo frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal, avaliação das mucosas, tempo de preenchimento capilar e presença de edema. O diagnóstico sorológico foi realizado por meio do ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), utilizando antígenos de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis*. Das 112 amostras analisadas, 31 (27,67%; 31/112) apresentaram sororreatividade para pelo menos um dos antígenos testados. As amostras reagentes foram submetidas à reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR), utilizando *primers* direcionados ao DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* spp., sendo detectado DNA do parasito em 21 (67,74%; 21/31) dos animais soropositivos. A avaliação hematológica e bioquímica foi realizada nos 31 equinos reagentes ao ELISA, incluindo hemograma completo e análises séricas de ureia, creatinina, bilirrubina total, bilirrubina direta, bilirrubina indireta e enzimas hepáticas. Os animais não apresentaram alterações clínicas sugestivas de leishmaniose, mantendo os parâmetros físicos dentro dos limites fisiológicos para a espécie. Os parâmetros hematológicos permaneceram, em sua maioria, dentro dos intervalos de referência, embora alguns animais tenham apresentado valores eritrocitários próximos ao limite inferior. Da mesma forma, os parâmetros bioquímicos avaliados não demonstraram alterações significativas compatíveis com comprometimento hepático ou renal associado à infecção. A análise integrada dos achados clínicos, hematológicos, bioquímicos e diagnósticos indicou ausência de repercussões sistêmicas compatíveis com a forma clínica da doença. Os resultados demonstram a exposição de equinos à infecção por *Leishmania* spp. evidenciando a circulação do parasito na região estudada e destacando a importância da inclusão dessa espécie em investigações epidemiológicas da leishmaniose. Além disso, reforçam a necessidade de estudos adicionais para esclarecer o papel dos equinos na manutenção do ciclo epidemiológico da infecção.

Palavras-chave: leishmaniose equina; hematologia; bioquímica sérica; qPCR; epidemiologia.

¹ Médica Veterinária, Mestranda em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos da Universidade Paranaense - UNIPAR. E-mail: j.kikuti@edu.unipar.br

² Médica Veterinária, Doutora, Professora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Paranaense – UNIPAR. E-mail: mariaquessada@prof.unipar.br

ABSTRACT

Leishmaniasis is a geographically widespread zoonosis with significant relevance to public and veterinary health, although the involvement of equines in the epidemiology of the disease remains not fully understood. This study aimed to characterize the hematological and biochemical profiles of asymptomatic horses exposed to *Leishmania* spp., contributing to the understanding of subclinical infection in this species. A total of 112 clinically healthy horses, both male and female, from a rural society located in the North-Central region of the state of Paraná, Brazil, were evaluated. The animals underwent clinical evaluation, including heart rate, respiratory rate, rectal temperature, mucous membrane assessment, capillary refill time, and presence of edema. Serological diagnosis was performed using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with antigens from *Leishmania amazonensis*, *Leishmania infantum*, and *Leishmania braziliensis*. Out of the 112 samples analyzed, 31 (27.67%; 31/112) showed seroreactivity to at least one of the tested antigens. The reactive samples were subjected to quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) targeting the kinetoplast DNA (kDNA) of *Leishmania* spp., and parasite DNA was detected in 21 (67.74%; 21/31) of the seropositive animals. Hematological and biochemical assessments were carried out on the 31 ELISA-reactive horses, including a complete blood count and serum analyses of urea, creatinine, total bilirubin, direct bilirubin, indirect bilirubin, and liver enzymes. The animals did not exhibit clinical changes suggestive of leishmaniasis, maintaining their physical parameters within the physiological limits for the species. Hematological parameters remained largely within reference intervals, although some animals presented erythrocytic values close to the lower limit. Similarly, the biochemical parameters evaluated showed no significant alterations compatible with hepatic or renal impairment associated with the infection. Integrated analysis of clinical, hematological, biochemical, and diagnostic findings indicated an absence of systemic repercussions compatible with the clinical form of the disease. The results demonstrate the exposure of equines to *Leishmania* spp. infection, highlighting the circulation of the parasite in the studied region and emphasizing the importance of including this species in epidemiological investigations of leishmaniasis. Furthermore, they reinforce the need for additional studies to clarify the role of equines in maintaining the epidemiological cycle of the infection.

Keywords: equine leishmaniasis; hematology; serum biochemistry; qPCR; epidemiology.

Introdução

A leishmaniose compreende um complexo de doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos primordialmente por insetos flebotomíneos. Considerada uma importante zoonose e classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma Doença Tropical Negligenciada (DTN), a enfermidade apresenta ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais, afetando significativamente tanto a população humana quanto diferentes espécies de animais silvestres e domésticos (Who, 2025; Akhoundi et al., 2016).

Em equinos, a infecção por *Leishmania* spp. tem sido descrita em diversos países, incluindo o Brasil, com relatos que mimetizam principalmente infecções assintomáticas ou manifestações cutâneas localizadas (Fernández-Bellon et al., 2006; Mhadhbi; Sassi, 2020). Estudos recentes corroboram a ocorrência da infecção em cavalos, burros, mulas e pôneis, o que sugere uma exposição frequente desses animais ao parasito em áreas endêmicas (Soares et al., 2013; Truppel et al., 2014; Benassi et al., 2018; Nascimento et al., 2024).

No cenário nacional, o estado do Paraná destaca-se pela endemicidade da leishmaniose tegumentar americana (LTA), configurando um relevante problema de saúde pública. A doença encontra-se amplamente disseminada no território paranaense, exibindo maior concentração de casos nas regiões Norte, Noroeste e Centro-Norte áreas caracterizadas por condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento dos vetores, tais como a presença de fragmentos florestais, elevada umidade e uma intensa interface entre os ambientes rural e urbano (Monteiro et al., 2009; Sesa-PR, 2025). Dados epidemiológicos históricos evidenciam a persistência da circulação do parasito no estado, tendo sido registrados 7.849 casos de LTA e 36 casos de leishmaniose visceral (LV) humana no período entre 2001 e 2022 (Ferreira, 2024).

Apesar do crescente número de relatos sobre a infecção em animais de grande porte nessa e em outras regiões, a exata participação epidemiológica dos equídeos na dinâmica de transmissão das leishmanioses permanece pouco esclarecida. A prevalência de cursos subclínicos e a ausência de sinais clínicos evidentes na maioria dos animais infectados não apenas dificultam o diagnóstico de rotina, mas também favorecem a subnotificação da infecção nessas espécies (Limeira et al., 2019; Mhadhbi; Sassi, 2020). Desse modo, a identificação e caracterização de diferentes espécies animais naturalmente expostas ao

parasito tornam-se fulcrais para a compreensão da dinâmica epidemiológica local e para o desenvolvimento de estratégias eficientes de vigilância em saúde.

Diante desse panorama e da necessidade de aplicar métodos laboratoriais sensíveis para a identificação de infecções inaparentes, o presente estudo teve como objetivo caracterizar o perfil clínico, hematológico e bioquímico de equinos assintomáticos expostos à *Leishmania* spp. na região Centro-Norte do Estado do Paraná, diagnosticados por meio da associação de métodos sorológicos e moleculares (qPCR).

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2 Animais e local do estudo

O presente estudo caracteriza-se como um estudo retrospectivo observacional, desenvolvido a partir da análise secundária de dados obtidos por Lopes et al. (2021), provenientes de um estudo previamente conduzido com equinos da região Centro-Norte do Estado do Paraná. Foram utilizados os dados clínicos, epidemiológicos, sorológicos e moleculares gerados pelos autores, bem como as amostras biológicas armazenadas, para a realização da avaliação hematológica e bioquímica proposta nesta dissertação.

O estudo original de Lopes et al. (2021) incluiu 112 equinos clinicamente saudáveis provenientes de uma sociedade rural localizada na área urbana de um município da região Centro-Norte do Estado do Paraná, considerada área endêmica para leishmaniose. Os animais permaneceram alojados em baias de aproximadamente 9 m², com alimentação, água e suplementação mineral fornecidas conforme manejo rotineiro da propriedade.

A população foi composta por 112 equinos, sendo 84 machos e 28 fêmeas, pertencentes às raças Quarto de Milha (n = 98), sem raça definida (n = 9), Paint Horse (n = 3) e Crioula (n = 2), conforme descrito por Lopes et al. (2021).

2.3 Exame clínico

Todos os dados referentes ao exame clínico foram obtidos do estudo previamente publicado por Lopes et al. (2021). Antes da coleta das amostras biológicas, os animais foram submetidos à avaliação clínica geral, incluindo frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura

retal, coloração das mucosas, tempo de preenchimento capilar e presença de edema. Conforme descrito pelos autores, nenhum animal apresentou sinais clínicos compatíveis com leishmaniose ou outra enfermidade sistêmica.

2.4 Diagnóstico sorológico para *Leishmania* spp.

O diagnóstico sorológico utilizado nesta dissertação foi previamente realizado por Lopes et al. (2021), por meio do ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), empregando antígenos de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis*, conforme metodologia descrita pelos autores. As amostras foram processadas em duplicata, sendo o ponto de corte determinado por curva ROC (Receiver Operating Characteristic).

Dos 112 equinos avaliados, 31 apresentaram sororreatividade para pelo menos um dos antígenos testados. Esses animais constituíram a população utilizada para as análises hematológicas e bioquímicas desenvolvidas no presente estudo.

2.5 Diagnóstico molecular para *Leishmania* spp.

As amostras sororreagentes foram previamente submetidas à reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR), conforme protocolo descrito por Lopes et al. (2021). A extração do DNA foi realizada utilizando o kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®), seguida da amplificação do DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* spp. empregando os primers descritos por Reis et al. (2013).

Entre os 31 equinos soropositivos, 21 apresentaram amplificação positiva para DNA de *Leishmania* spp., confirmando a infecção molecularmente.

As amostras soropositivas foram submetidas à reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR), conforme protocolo descrito por Lopes et al. (2021). O DNA foi extraído a partir de amostras de soro utilizando o kit QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen®, Alemanha). Foram consideradas positivas as amostras com valor de Ct $\leq$ 37. Entre os 31 animais soropositivos, 21 (67,34%) apresentaram amplificação positiva para DNA de *Leishmania* spp.

2.6 Avaliação hematológica e bioquímica

A etapa experimental do presente trabalho consistiu na caracterização do perfil hematológico e bioquímico dos equinos sororreagentes para *Leishmania spp.*. Para essa finalidade, foram selecionados exclusivamente os 31 animais positivos no ELISA identificados por Lopes et al. (2021), sendo realizadas as análises hematológicas e bioquímicas das respectivas amostras biológicas. A avaliação hematológica e bioquímica constituiu a etapa experimental do presente estudo e foi realizada exclusivamente nos 31 equinos reagentes ao ELISA para *Leishmania spp.*

Foram selecionados para as análises laboratoriais apenas os animais soropositivos, uma vez que o objetivo do estudo foi caracterizar o perfil hematológico e bioquímico de equinos assintomáticos expostos à infecção.

As análises hematológicas foram realizadas em analisador hematológico veterinário automatizado da marca Mindray®, sendo avaliados o número de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, índices hematimétricos, contagem total e diferencial de leucócitos e número de plaquetas. A contagem diferencial leucocitária foi confirmada por avaliação microscópica de esfregaços sanguíneos corados.

As análises bioquímicas séricas foram realizadas em analisador bioquímico semiautomático Contec BC300® (Contec Medical Systems, China), utilizando métodos enzimáticos e colorimétricos para determinação das concentrações séricas de ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), creatina quinase (CK), bilirrubina total, bilirrubina direta e bilirrubina indireta. Os resultados obtidos foram interpretados com base nos intervalos de referência descritos por Thrall et al. (2012) para a espécie equina.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Frequência de positividade para *Leishmania spp.*

Entre os 112 equinos avaliados, 31 (27,7%; 31/112) apresentaram sororreatividade para *Leishmania spp.* pelo ELISA. Dentre estes, 21 (67,7%; 21/31) também foram positivos na qPCR, confirmando a presença de DNA do parasito (Tabela 1). A frequência observada demonstra exposição significativa dos equinos ao agente em uma área endêmica do Norte-central do Paraná.

Resultados semelhantes foram descritos por Martinez-Sáenz et al. (2023), que observaram soropositividade de 27,5% em cavalos clinicamente saudáveis na Espanha. Estudos realizados no Brasil também demonstram que equinos frequentemente apresentam infecção assintomática, com detecção sorológica e molecular do parasito na ausência de manifestações clínicas evidentes (Cerqueira et al., 2003; Feitosa et al., 2012; Benassi et al., 2018). A positividade observada reforça a hipótese de que equinos possam participar da epidemiologia da leishmaniose como hospedeiros expostos ao parasito, embora seu papel como reservatório ainda não esteja completamente esclarecido.

Tabela 1. Resultados do ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) utilizando antígenos de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*, e da PCR quantitativa em tempo real (qPCR) realizada em amostras de soro de equinos atletas provenientes da região Norte-Central do Estado do Paraná, Brasil (n=112).

Amostra	* <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. infantum</i>	qPCR
1	+	+	+	
8	+	+	+	+
9	+	+	+	+
13	+			
15	+	+	+	+
16	+			+
20	+			+
22		+	+	
24	+	+	+	+
33	+			+
45	+	+	+	+
47	+			
48	+			
50		+	+	+
51	+			
54	+	+		+
56	+			+
61	+			
64	+			+
65	+			+
72		+	+	+
76			+	+
78			+	+
81	+	+	+	+
86	+			+

89		+		+
91	+			
94	+			+
105		+	+	+
115	+		+	+
124		+		+
Total (%)	25 (22,32%)	17 (15,18%)	17 (15,18%)	21 (67,34%)

Legenda: (+) indica amostras reagentes ao ELISA e/ou positivas na qPCR.

Abreviaturas: ELISA = ensaio imunoenzimático indireto (*enzyme-linked immunosorbent assay*); qPCR = reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (*quantitative polymerase chain reaction*)

Fonte: Adaptado de Lopes et al. (2021)

3.2 Sororreatividade aos diferentes antígenos de *Leishmania* spp.

A utilização de antígenos de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* permitiu identificar reatividade sorológica frente a diferentes espécies de importância epidemiológica no Brasil. A maior frequência de reação foi observada para *L. amazonensis* (22,3%), seguida por *L. braziliensis* (15,2%) e *L. infantum* (15,2%). A detecção de anticorpos contra diferentes espécies deve ser interpretada com cautela, uma vez que reações cruzadas entre antígenos de *Leishmania* spp. são frequentemente descritas em ensaios sorológicos. Entretanto, esses resultados evidenciam exposição dos animais a ambientes favoráveis à circulação do parasito.

Entre as espécies avaliadas, *Leishmania braziliensis* é historicamente a mais frequentemente associada à leishmaniose equina no Brasil, sobretudo em casos de manifestações cutâneas (Yoshida et al., 1990; Limeira et al., 2019). Por outro lado, a detecção de *L. infantum* em equinos tem despertado crescente interesse devido à sua importância na epidemiologia da leishmaniose visceral zoonótica e à demonstração de infecção natural em animais assintomáticos residentes em áreas endêmicas (Escobar et al., 2019). Em contraste, a participação de *L. amazonensis* na infecção de equinos permanece pouco elucidada, uma vez que existem poucos estudos avaliando especificamente essa espécie nessa população (Limeira et al., 2019; Akhoundi et al., 2016). Dessa forma, a identificação de sororreatividade para diferentes espécies de *Leishmania* reforça a necessidade de estudos adicionais para esclarecer a susceptibilidade dos equinos, a dinâmica da infecção e sua possível participação na manutenção do parasito em áreas endêmicas (Martins et al., 2025).

3.3 Série vermelha

Os parâmetros da série vermelha permaneceram, em sua maioria, dentro dos intervalos de referência para a espécie equina. A contagem média de hemácias, a concentração de

hemoglobina e o hematócrito apresentaram valores compatíveis com a normalidade, sugerindo ausência de alterações eritrocitárias clinicamente relevantes nos animais avaliados (Tabela 2). Embora cinco equinos (16,1%) tenham apresentado contagem de hemácias abaixo do limite inferior de referência e um animal (3,2%) tenha apresentado hematócrito discretamente reduzido, os valores médios observados não caracterizaram quadro anêmico na população estudada (Tabela 2). Os índices hematimétricos VCM, HCM e CHCM permaneceram predominantemente dentro dos intervalos fisiológicos para a espécie, indicando manutenção das características morfológicas e da concentração de hemoglobina dos eritrócitos. Apenas dois animais (6,5%) apresentaram valores discretamente elevados de HCM e CHCM, sem significado clínico aparente.

Os resultados observados são semelhantes aos descritos por Benassi et al. (2018), Limeira et al. (2019) e Martinez-Sáenz et al. (2023), que relataram ausência de alterações eritrocitárias relevantes em equinos naturalmente infectados por *Leishmania* spp. Diferentemente do observado em cães com leishmaniose visceral, nos quais a anemia constitui uma das alterações hematológicas mais frequentes e está associada a mecanismos como inflamação crônica, hemólise imunomediada e alterações da medula óssea, a infecção em equinos parece apresentar repercussão hematológica limitada (Solano-Gallego et al., 2009; Paltrinieri et al., 2010; Solano-Gallego et al., 2020).

Tabela 2. Parâmetros eritrocitários de equinos assintomáticos positivos para *Leishmania* spp. (n = 31), expressos em média $\pm$ desvio padrão, valores de referência e frequência de animais fora dos intervalos de referência.

Parâmetro	Média $\pm$ DP	Referência (Thrall et al., 2022)	Abaixo da referência n (%)	Acima da referência n (%)
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7,60 $\pm$ 0,72	6,8 – 12,9	5 (16,1%)	0 (0%)
Hemoglobina (g/dL)	13,15 $\pm$ 1,16	11,0 – 19,0	0 (0%)	0 (0%)
Hematócrito (%)	36,36 $\pm$ 2,53	32 – 53	1 (3,2%)	0 (0%)
VCM (fL)	48,06 $\pm$ 3,01	37 – 58	0 (0%)	0 (0%)
HCM (pg)	17,35 $\pm$ 0,96	13 – 19	0 (0%)	2 (6,5%)
CHCM (g/dL)	36,15 $\pm$ 1,24	31 – 38	0 (0%)	2 (6,5%)

3.4 Leucograma e plaquetas

Os resultados do leucograma e da contagem plaquetária dos equinos assintomáticos positivos para *Leishmania* spp. encontram-se apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Leucograma e contagem plaquetária de equinos assintomáticos positivos para *Leishmania* spp. (n = 31)

Parâmetro	Média ± DP	Valores de referência*	Abaixo da referência n (%)	Acima da referência n (%)
Leucócitos totais (/μL)	9.354 ± 1.928	5.400–14.300	0 (0,0)	0 (0,0)
Neutrófilos bastonetes (/μL)	119 ± 108	0–100	ND**	ND**
Neutrófilos segmentados (/μL)	4.816 ± 1.164	2.260–8.580	0 (0,0)	0 (0,0)
Linfócitos (/μL)	3.700 ± 1.201	1.500–7.700	0 (0,0)	0 (0,0)
Monócitos (/μL)	475 ± 190	0–1.000	0 (0,0)	0 (0,0)
Eosinófilos (/μL)	219 ± 196	0–1.000	0 (0,0)	0 (0,0)
Basófilos (/μL)	24 ± 54	0–290	0 (0,0)	0 (0,0)
Plaquetas (/μL)	117.994 ± 40.087	100.000–350.000	0 (0,0)	0 (0,0)

Fonte: Dados da pesquisa.

Valores de referência segundo Thrall et al. (2022).

** ND = não determinado individualmente.

Os parâmetros leucocitários apresentaram valores compatíveis com os intervalos de referência descritos para a espécie equina. As médias de leucócitos totais, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos permaneceram dentro dos limites fisiológicos (Tabela 3), não evidenciando alterações hematológicas sugestivas de processo inflamatório sistêmico ou resposta infecciosa exacerbada (Thrall et al., 2022; Stockham; Scott, 2011). A contagem média de neutrófilos bastonetes apresentou valor discretamente acima do limite de referência. Entretanto, esse achado ocorreu na ausência de leucocitose e sem aumento concomitante dos demais parâmetros leucocitários, o que dificulta sua interpretação como indicativo de resposta inflamatória relevante (Thrall et al., 2022; Weiss; Wardrop, 2010). Os resultados observados são semelhantes aos descritos por Escobar et al. (2019), que avaliaram equinos naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e não identificaram alterações hematológicas relevantes associadas à infecção. De modo semelhante, outros estudos realizados em equinos naturalmente infectados por *Leishmania* spp. descrevem que a infecção geralmente ocorre de forma assintomática, com pouca ou

nenhuma repercussão sobre o leucograma (Benassi et al., 2018; Limeira et al., 2019; Martinez-Sáenz et al., 2023).

A contagem plaquetária também permaneceu dentro dos intervalos de referência para a espécie (Tabela 3), não sendo observadas evidências de trombocitopenia ou alterações compatíveis com distúrbios hemostáticos. Esses achados diferem do frequentemente descrito em cães com leishmaniose visceral, nos quais anemia, trombocitopenia e alterações leucocitárias são achados hematológicos comuns, atribuídos à inflamação crônica, deposição de imunocomplexos e alterações medulares (Solano-Gallego et al., 2009; Paltrinieri et al., 2010).

Em contrapartida, estudos realizados em equinos naturalmente infectados por *Leishmania* spp. descrevem, de modo geral, ausência de alterações hematológicas relevantes, sugerindo que a espécie apresenta capacidade de limitar as repercussões sistêmicas da infecção (Benassi et al., 2018; Escobar et al., 2019; Limeira et al., 2019). Os resultados obtidos também estão de acordo com a revisão sistemática realizada por Limeira et al. (2019), que descreveu a leishmaniose equina como uma enfermidade predominantemente benigna e frequentemente associada à ausência de alterações clínicas e laboratoriais relevantes.

Em relação ao perfil bioquímico (Tabela 4), as médias de AST (236,6 U/L), ALT (9,0 U/L), ureia (36,1 mg/dL), creatinina (1,6 mg/dL), CK (120,9 U/L) e bilirrubinas mantiveram-se compatíveis com os valores fisiológicos descritos para equinos hígidos (Kaneko et al., 2008; Stockham & Scott, 2011), sugerindo ausência de comprometimento sistêmico importante nos animais avaliados. Entretanto, alterações pontuais foram observadas em alguns indivíduos, incluindo aumento de AST, GGT, CK, ureia e bilirrubinas (Tabela 4). A elevação da AST foi observada em 19,3% dos animais (6/31), enquanto a GGT apresentou valores acima do intervalo de referência em 32,2% dos animais (10/31), incluindo um indivíduo com aumento acentuado da enzima (340 U/L). Em equinos, aumentos séricos de AST e GGT podem estar associados a alterações hepatocelulares, exercício físico intenso, lesão muscular, manejo frequente, estresse ou alterações metabólicas transitórias (Divers; Reed, 2018; Thrall et al., 2022). Entretanto, no presente estudo, não foi observada associação consistente entre essas alterações e aumentos concomitantes de outros marcadores hepáticos, como bilirrubinas dificultando atribuir tais achados exclusivamente à infecção por *Leishmania* spp.

Tabela 4. Perfil bioquímico sérico de equinos assintomáticos positivos para *Leishmania* spp. (n = 31).

Parâmetro	Média ± DP	Mín.– Máx.	Valores de referência*	Abaixo da referência n (%)	Acima da referência n (%)
AST (U/L)	236,6 ± 141,5	25–515	226–366	12 (38,7)	6 (19,3)
Ureia (mg/dL)	36,1 ± 15,2	15–107	21–51	2 (6,4)	2 (6,4)
Creatinina (mg/dL)	1,6 ± 0,4	0,7–2,6	1,2–1,9	3 (9,7)	5 (16,1)
GGT (U/L)	23,1 ± 59,6	3–340	4,3–13,4	2 (6,4)	10 (32,3)
CK (U/L)	120,9 ± 98,4	23–541	38–386	5 (16,1)	1 (3,2)
Bilirrubina total (mg/dL)	1,44 ± 0,33	0,88–2,18	0,5–2,0	0 (0,0)	2 (6,4)
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,51 ± 0,09	0,24–0,66	0,0–0,6	0 (0,0)	4 (12,9)
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,92 ± 0,35	0,43–1,88	0,2–1,4	0 (0,0)	3 (9,7)

Fonte: Dados da pesquisa.

DP: desvio padrão. AST: aspartato aminotransferase; GGT: gama-glutamil transferase; CK: creatina quinase.

*Valores de referência segundo Kaneko et al. (2008) e Thrall et al. (2012).

O animal que apresentou elevação marcante de GGT também não demonstrou alterações clínicas compatíveis com hepatopatia significativa ou aumento concomitante expressivo das demais enzimas hepáticas, impossibilitando determinar com precisão a origem da alteração. Dessa forma, não se pode descartar a influência de fatores individuais, alterações metabólicas transitórias ou até processos subclínicos não relacionados diretamente à leishmaniose. Elevações isoladas de GGT em equinos podem ocorrer sem manifestação clínica evidente, especialmente em situações de estresse metabólico ou alterações hepatobiliares discretas (Divers e Reed, 2018).

A creatina quinase (CK) apresentou aumento em apenas 3,2% dos animais (1/31), sendo observado valor expressivo (541 U/L) (Tabela 4). A CK é considerada marcador sensível de lesão muscular aguda em equinos, podendo elevar-se após exercício, contenção física, trauma muscular, transporte ou aplicação intramuscular de medicamentos (Thrall et al., 2012). Assim, o aumento isolado observado provavelmente esteve relacionado a injúria muscular pontual e não necessariamente ao processo infeccioso.

A ureia apresentou elevação em 6,4% dos animais (2/31) (Tabela 4), sem associação consistente com aumento da creatinina. Esse padrão sugere influência de fatores pré-renais,

como desidratação leve, dieta hiperproteica ou aumento do catabolismo proteico, não caracterizando comprometimento renal primário (Kaneko et al., 2008; Thrall et al., 2012). Além disso, não foram identificadas alterações laboratoriais compatíveis com insuficiência renal ou lesão renal significativa.

As concentrações de bilirrubina total, direta e indireta mantiveram-se, em sua maioria, dentro dos valores de referência (Tabela 5), reforçando a ausência de hemólise significativa ou disfunção hepática relevante (Divers; Reed, 2018; Thrall et al., 2012). Entretanto, variações individuais foram observadas, sendo que dois animais (6,4%) apresentaram elevação da bilirrubina total, quatro (12,9%) da fração direta e três (9,7%) da fração indireta (Tabela 5). Em equinos, elevações discretas da bilirrubina, principalmente da fração indireta, são relativamente comuns e nem sempre indicam doença hepática ou hemólise, podendo ocorrer em decorrência de jejum prolongado, estresse, exercício ou alterações de manejo (Divers; Reed, 2018).

Tabela 5. Valores de bilirrubina em cavalos portadores de *Leishmania* spp. (n=31)

Animal	Bilirrubina total (mg/dL)	Bilirrubina direta (mg/dL)	Bilirrubina indireta (mg/dL)
1	1,94	0,41	1,53*
2	0,91	0,48	0,43
3	1,05	0,43	0,62
4	1,12	0,53	0,59
5	0,88	0,40	0,48
6	2,12*	0,24	1,88*
7	1,63	0,56	1,07
8	1,43	0,63*	0,80
9	1,41	0,49	0,92
10	1,38	0,54	0,84
11	1,51	0,56	0,95
12	1,20	0,55	0,65
13	1,63	0,51	1,12
14	1,63	0,56	1,07
15	1,29	0,52	0,77
16	1,78	0,53	1,25
17	1,02	0,46	0,56
18	1,79	0,65*	1,14
19	1,33	0,59	0,74
20	0,96	0,44	0,52
21	1,68	0,37	1,31

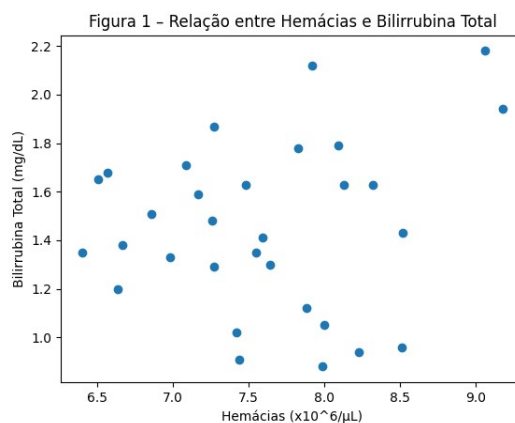
22	1,65	0,46	1,19
23	1,48	0,61*	0,87
24	1,87	0,66*	1,21
25	1,35	0,60	0,75
26	1,30	0,54	0,76
27	1,59	0,52	1,07
28	1,35	0,55	0,80
29	1,71	0,40	1,31
30	2,18*	0,46	1,72*
31	0,94	0,45	0,49
Média ± DP	1,44 ± 0,33	0,51 ± 0,09	0,92 ± 0,35
V.R.	0,5 – 2,0	0,0 – 0,6	0,2 – 1,4

* Valores acima do intervalo de referência para a espécie.

V.R.: Valores de referência segundo Kaneko et al. (2008) e Thrall et al. (2022).

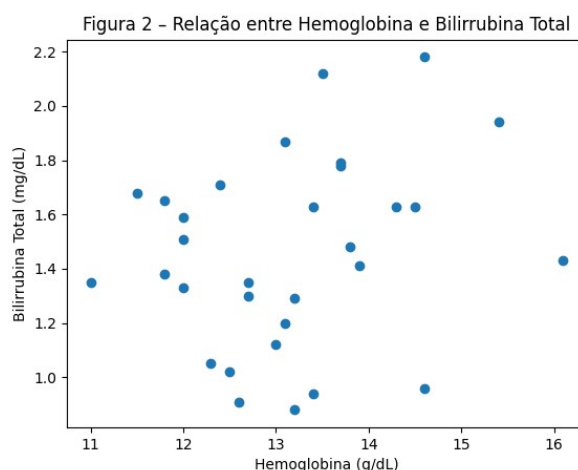
A análise de correlação fortalece a interpretação de que as alterações observadas não estiveram associadas diretamente à infecção por *Leishmania* spp. Foi encontrada associação fraca entre os parâmetros eritrocitários e a bilirrubina total, sendo $r = 0,15$ para hemácias e $r = 0,23$ para hemoglobina (Figura 1), demonstrando ausência de relação linear significativa entre redução eritrocitária e aumento das bilirrubinas. Dessa forma, as variações observadas provavelmente ocorreram de maneira independente da infecção, possivelmente relacionadas a fatores fisiológicos individuais inerentes à espécie equina. Em quadros de hemólise ativa, espera-se aumento mais expressivo das bilirrubinas, especialmente da fração indireta, associado à redução importante dos parâmetros eritrocitários, o que não foi observado no presente estudo (Divers; Reed, 2018; Thrall et al., 2012). Além disso, a ausência de alterações concomitantes importantes nas enzimas hepáticas e nos marcadores renais reforça a baixa probabilidade de lesão orgânica significativa nos animais avaliados.

Figura 1. Relação entre contagem de hemácias e níveis de bilirrubina total em equinos assintomáticos positivos (n=31) para *Leishmania* spp



Apesar das alterações pontuais descritas, não foi observado padrão consistente de comprometimento hepático, renal ou muscular entre os animais avaliados. A ausência de alterações clínicas associadas, somada à falta de correlação entre os diferentes marcadores bioquímicos, reduz a probabilidade de lesão orgânica significativa associada à infecção por *Leishmania* spp. Esses achados corroboram estudos recentes que descrevem equinos naturalmente infectados como hospedeiros frequentemente assintomáticos, apresentando infecção predominantemente subclínica e poucas alterações laboratoriais sistêmicas (Benassi et al., 2018; Martinez-Sáenz et al., 2023).

Figura 2. Relação entre concentração de hemoglobina e níveis de bilirrubina total em equinos assintomáticos positivos (n=31) para *Leishmania* spp.



Os demais parâmetros bioquímicos analisados também permaneceram, em sua maioria, dentro dos limites fisiológicos para a espécie equina (Tabela 4), corroborando estudos recentes que descrevem a infecção por *Leishmania* spp. em equinos como predominantemente subclínica, frequentemente associada à ausência de alterações laboratoriais sistêmicas relevantes (Benassi et al., 2018; Martinez-Sáenz et al., 2023). A leishmaniose equina é descrita principalmente como uma enfermidade de manifestações cutâneas localizadas e baixa ocorrência de envolvimento sistêmico, diferindo significativamente do quadro clínico frequentemente observado em cães naturalmente infectados (Limeira et al., 2019).

A análise descritiva dos parâmetros laboratoriais demonstrou baixa variabilidade entre os animais estudados, indicando relativa homogeneidade da população avaliada. A média da contagem de hemácias foi de $7,60 \pm 0,72 \times 10^6/\mu\text{L}$ e a de hemoglobina de $13,15 \pm 1,16 \text{ g/dL}$

(Tabela 6). Em relação ao perfil bioquímico, a bilirrubina total apresentou média de $1,46 \pm 0,35$ mg/dL, enquanto as frações direta e indireta corresponderam a $0,51 \pm 0,09$ mg/dL e $0,95 \pm 0,36$ mg/dL, respectivamente. A comparação desses achados com os valores de referência descritos por Kaneko et al. (2008), Thrall et al. (2022) e Divers e Reed (2018) demonstra que os parâmetros permaneceram dentro dos limites fisiológicos para a espécie equina.

A análise descritiva dos parâmetros hematológicos e bioquímicos revelou uma baixa variabilidade entre os animais avaliados, o que indica uma marcante homogeneidade fisiológica na população estudada. Conforme apresentado na **Tabela 6**, a contagem global de hemácias obteve média de $7,60 \pm 0,72 \times 10^6/\mu\text{L}$, enquanto a concentração de hemoglobina tendeu a $13,15 \pm 1,16$ g/dL. No perfil bioquímico, a bilirrubina total exibiu média de $1,46 \pm 0,35$ mg/dL, com as frações direta e indireta correspondendo a $0,51 \pm 0,09$ mg/dL e $0,95 \pm 0,36$ mg/dL, respectivamente. Diante desses achados com os intervalos de referência propostos por Kaneko et al. (2008), Thrall et al. (2012) e Divers e Reed (2018) confirma que a totalidade dos parâmetros biomédicos permaneceu estritamente dentro dos limites fisiológicos preestabelecidos para a espécie equina.

Tabela 6. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) e comparação dos parâmetros laboratoriais de equinos positivos para *Leishmania* spp. (n = 31) com os valores de referência da espécie equina.

PARÂMETRO	MÉDIA $\pm$ DP	VALORES DE REFERÊNCIA
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	$7,60 \pm 0,72$	6,0 – 12,0
Hemoglobina (g/dl)	$13,15 \pm 1,16$	11,0 – 17,0
Bilirrubina total (mg/dl)	$1,46 \pm 0,35$	0,5 – 2,0
Bilirrubina direta (mg/dl)	$0,51 \pm 0,09$	0,0 – 0,6
Bilirrubina indireta (mg/dl)	$0,95 \pm 0,36$	0,2 – 1,4

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: DP = desvio padrão.

Nota: Valores de referência para a espécie equina descritos por Kaneko et al. (2008), Thrall et al. (2012)

Essa homeostase laboratorial, mesmo diante da detecção de DNA parasitário em significativa amostragem, encontra-se um amparo na literatura sob a perspectiva imunológica. Sabe-se que a resposta imune celular desempenha um papel no controle adaptativo da infecção por *Leishmania* spp., mediada predominantemente pela ativação coordenada de linfócitos T e macrófagos. Esse direcionamento imunológico é responsável por conter a carga parasitária tecidual e, por conseguinte, sustentar o estado subclínico ou assintomático do hospedeiro (Reis et al., 2010; Solano-Gallego et al., 2020). Desse modo, a eficiência desse

mecanismo imunológico em equinos justifica a capacidade da espécie em tolerar o parasitismo sem apresentar disfunções orgânicas, repercussões hematológicas ou lesões parenquimatosas evidentes.

Sob a epidemiologia, a manutenção clínica e laboratorial qualifica os equinos como elementos complexos na dinâmica de transmissão regional. Devido ao manejo e habitação, esses animais encontram-se frequentemente expostos a vetores flebotômíneos, a exemplo do *Lutzomyia longipalpis*, que exibe um hábito alimentar reconhecidamente oportunista. Embora a elucidação do DNA do parasito por técnicas moleculares não seja suficiente para categorizar os equídeos como reservatórios primários ou mantenedores do ciclo, a higidez clínica observada sugere que eles atuem como hospedeiros incidentais de alta resistência ou como excelentes sentinelas epidemiológicas (Barata et al., 2005; Burza et al., 2021; Martinez-Sáenz et al., 2023). Portanto, o monitoramento dessa espécie revela-se um indicador precoce da circulação ativa do agente etiológico em áreas endêmicas, complementando as ações de vigilância em saúde pública.

Referências

- AKHOUNDI, M. *et al.* A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, e0004349, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>.
- BARATA, R. A. *et al.* Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotômíneos em área endêmica de leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 5, p. 421-425, 2005.
- BENASSI, J. C. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* DNA in equids from endemic areas of Brazil. **Parasitology Research**, Berlin, v. 117, n. 2, p. 647-652, 2018.
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, London, v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018.
- CERQUEIRA, E. J. L. *et al.* Seroepidemiological survey of *Leishmania* infection in horses from an endemic area in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, n. 1-2, p. 61-67, 2003.
- DIVERS, T. J.; REED, S. M. **Equine internal medicine**. 4. ed. St. Louis: Elsevier, 2018.

- 483 ESCOBAR, T. A. *et al.* Assessment of *Leishmania infantum* infection in equine populations
484 in a canine visceral leishmaniosis transmission area. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina,
485 v. 40, n. 6, p. 3441–3452, 2019.
- 486 FEITOSA, F. L. F. *et al.* Estudo sorológico de leishmaniose em equinos de área endêmica
487 para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**,
488 São Paulo, v. 49, n. 6, p. 500-505, 2012.
- 489 KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic**
490 **animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008.
- 491 LOPES, K. F. C.; DELAI, R. M.; FAZOLI, K. G. Z.; *et al.* **Urban horses as environmental**
492 **bioindicators for leishmaniasis**. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 21, n. 9, p. 691–
493 695, 2021.
- 494 LIMEIRA, C. H. *et al.* *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in horses from a
495 visceral leishmaniasis-endemic area. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**,
496 Jaboticabal, v. 28, n. 4, p. 724-730, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019067>.
- 497 MARTINEZ-SÁENZ, M. *et al.* Seroprevalence and molecular detection of *Leishmania*
498 *infantum* in apparently healthy horses from Spain. **Animals**, Basel, v. 13, n. 3, p. 1-12, 2023.
- 499 MARTINS, T. F. *et al.* Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*
500 in horses from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 331, e110300, 2025.
- 501 PALTRINIERI, S. *et al.* Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis
502 in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 236, n.
503 11, p. 1184–1191, 2010. DOI: <https://doi.org/10.2460/javma.236.11.1184>.
- 504 REIS, L. E. S. *et al.* Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative
505 study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum*
506 infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 197, n. 3-4, p. 498–503, 2013.
- 507 SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and
508 prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 165, n. 1-2, p.
509 1-18, 2020.
- 510 STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. 3. ed.
511 Ames: Wiley-Blackwell, 2021.
- 512 THRALL, M. A. *et al.* **Veterinary hematology, clinical chemistry and cytology**. 3. ed.
513 Hoboken: Wiley-Blackwell, 2012.
- 514 WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Ames: Wiley-
515 Blackwell, 2010.
- 516 YOSHIDA, E. L. A. *et al.* Human, canine and equine leishmaniasis due to *Leishmania*
517 *braziliensis* in the south-west region of São Paulo State, Brazil. **Memórias do Instituto**
518 **Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 2, p. 133–134, 1990.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que a infecção por *Leishmania* spp. nos equinos avaliados ocorreu predominantemente de forma subclínica. Apesar da confirmação da infecção por métodos sorológicos e moleculares, os animais não apresentaram alterações hematológicas ou bioquímicas consistentes que pudessem ser diretamente associadas à presença do parasito. Os parâmetros eritrocitários, leucocitários, plaquetários e bioquímicos permaneceram, em sua maioria, dentro dos intervalos de referência para a espécie, indicando ausência de comprometimento sistêmico relevante nos animais estudados.

As alterações laboratoriais observadas foram pontuais e não configuraram um padrão compatível com disfunção hepática, renal, muscular ou hematológica associada à infecção. Além disso, a fraca correlação observada entre os parâmetros eritrocitários e as concentrações de bilirrubina sugere ausência de evidências laboratoriais de hemólise relacionada à infecção por *Leishmania* spp. nessa população. Dessa forma, os achados reforçam que exames hematológicos e bioquímicos de rotina apresentam utilidade limitada para a identificação de equinos assintomáticos infectados, evidenciando a necessidade da utilização de métodos diagnósticos específicos, como testes sorológicos e moleculares, para a detecção e confirmação da infecção.

545 **4. APÊNDICES**

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

5 ANEXOS

ANEXO A – DIRETRIZES PARA AUTORES (VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES)

1. ESCOPO E POLÍTICA EDITORIAL

A revista *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* é um periódico internacional, revisado por pares, focado em doenças transmitidas por vetores e zoonoses que afetam a saúde humana e animal. A publicação aceita artigos originais de pesquisa, revisões, comunicações curtas e cartas ao editor que abordem fatores biológicos, ecológicos, epidemiológicos e clínicos relacionados a esses agentes.

2. TIPOS DE MANUSCRITOS

- **Original Research (Artigo Original):** Relatos de pesquisas experimentais ou observacionais completas e inéditas. Deve conter Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusões.
- **Short Communications (Comunicações Curtas):** Relatos concisos de resultados preliminares significativos ou estudos de escopo mais limitado, mantendo a mesma estrutura de um artigo completo, porém de forma condensada.
- **Review Articles (Artigos de Revisão):** Análises críticas e abrangentes sobre temas atuais de relevância dentro do escopo da revista. Geralmente solicitados por editores, mas submissões espontâneas são avaliadas.

3. PREPARAÇÃO E FORMATAÇÃO DO MANUSCRITO

Os arquivos devem ser enviados eletronicamente em formato Microsoft Word (.doc ou .docx), observando os seguintes critérios de layout:

- **Fonte:** Times New Roman ou Arial, tamanho 12.
- **Espaçamento:** Todo o texto (incluindo referências, tabelas e legendas) deve ter espaçamento duplo (2.0).
- **Margens:** Margens padrão de 2,5 cm (1 polegada) em todos os lados.
- **Numeração:** As páginas e as **linhas do texto** devem ser numeradas consecutivamente do início ao fim do arquivo para facilitar o processo de revisão por pares.

4. ESTRUTURA DO TEXTO

O manuscrito deve ser organizado na seguinte sequência:

4.1. Página de Título (Title Page)

- Título completo do artigo (conciso e informativo).

- Nome completo de todos os autores e suas respectivas afiliações institucionais.
- Nome, endereço postal completo, telefone e e-mail do autor correspondente (*Corresponding Author*).
- Título corrente (*Running Head*) com no máximo 50 caracteres.

4.2. Resumo (Abstract) e Palavras-chave (Keywords)

- **Abstract:** Deve ser estruturado ou de parágrafo único (conforme atualização da revista), contendo no máximo **250 palavras**. Deve resumir claramente os objetivos, métodos, resultados principais e conclusões do estudo.
- **Keywords:** De 3 a 6 palavras-chave que facilitem a indexação do artigo, evitando repetir termos já presentes no título.

4.3. Corpo do Texto (Main Text)

- **Introduction:** Breve contextualização, justificativa e o objetivo claro do estudo.
- **Materials and Methods:** Descrição detalhada dos procedimentos, aprovação em comitês de ética animal/humana e as análises estatísticas utilizadas.
- **Results:** Apresentação clara dos dados obtidos, apoiada por tabelas e figuras, evitando duplicar informações textualmente.
- **Discussion:** Interpretação dos resultados à luz da literatura científica, limitações do estudo e implicações epidemiológicas/clínicas.

4.4. Declarações Obrigatórias (Statements)

- **Acknowledgments (Agradecimentos):** Menção a auxílios técnicos e agências de fomento financeiro.
- **Author Disclosure Statement (Conflito de Interesses):** Declaração obrigatória sobre a existência ou não de conflitos de interesse comerciais, financeiros ou pessoais.

5. TABELAS E FIGURAS

- **Tabelas:** Devem ser inseridas ao final do texto (após as referências) ou em arquivos separados. Devem ser criadas utilizando a ferramenta de tabela do Word, numeradas em algarismos arábicos e acompanhadas de um título autoexplicativo no topo.
- **Figuras:** Gráficos, mapas e fotografias devem ser enviados em arquivos separados de alta resolução (mínimo de 300 DPI para fotos e 1200 DPI para artes de linha), nos formatos TIFF, EPS ou JPEG.

632 **Modelo de Declaração para Inclusão na Tese ou Dissertação**

633 **DECLARAÇÃO DE USO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL GENERATIVA E INTEGRIDADE DE REFERÊNCIAS**

634 **Título do Trabalho:** Caracterização hematológica e bioquímica de equinos assintomáticos
635 sororreagentes para *Leishmania spp.* Previamente avaliados por *Elisa* e *qPCR*.

636 **Autor(a):** Jessica Suemi Almeida Kikuti

637 **Orientador(a):** Ana Maria Quessada

638 **Programa de Pós-Graduação:** PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL COM ÊNFASE
639 EM PRODUTOS BIOATIVOS

640 **1. Declaração de Uso de Inteligência Artificial (IA) Generativa**

641 Declaro que:

642 • ☐ **NÃO** utilizei ferramentas de IA generativa em nenhuma etapa de concepção, redação,
643 análise de dados ou revisão deste trabalho.

644 • ☒ **UTILIZEI** ferramentas de IA generativa e detalho o uso no quadro abaixo:

Ferramenta e Versão (ex: ChatGPT 4o, Claude 3.5, Gemini 1.5)	Data de Acesso	Etapa do Trabalho em que foi utilizada (ex: revisão gramatical, tradução, insights de estruturação, código de análise)	Prompt (comando) principal utilizado ou descrição do direcionamento dado à IA
Exemplo: Consensus (Copilot mode) e Perplexity AI (Versão Pro)	12/03/2026	Revisão da Literatura / Busca de Fontes: Utilizada para mapear artigos científicos recentes sobre o impacto de microplásticos em ecossistemas costeiros e cruzar dados de citações.	"Quais são os 10 artigos mais citados entre 2022 e 2026 sobre a presença de microplásticos em estuários brasileiros? Forneça os DOIs." Os resultados foram usados como ponto de partida para a busca manual nas bases Scopus e PubMed.
Exemplo: ChatGPT v.4	15/04/2026	Revisão de estilo e clareza do texto do Capítulo 2.	"Revise o seguinte texto para torná-lo mais fluido e

			<i>acadêmico: [texto]"</i>
Claude 3.5 Sonnet	18/05/2026	Edição e Redução de Texto: Utilizada para reduzir a extensão do Resumo (Abstract) da tese ou dissertação para atender ao limite máximo exigido pelo programa de pós-graduação.	"Reduza o seguinte resumo para no máximo 500 palavras, mantendo o jargão técnico, os objetivos, a metodologia e os principais resultados intocados: [inserir texto original com x palavras]"

645 Obs: inserir mais de uma linha caso haja necessidade de especificar outros itens.

646 **Nota de Responsabilidade:** O(A) autor(a) reconhece que as ferramentas de IA generativa não
647 cumprem os requisitos para receberem autoria ou coautoria deste trabalho, sendo sua utilização de
648 total responsabilidade do(a) pesquisador(a) signatário(a).

649

650 2. Declaração de Integridade e Conferência de Referências

651 O(A) autor(a) declara, para os devidos fins de rigor acadêmico, que:

- 652 1. **Conferiu e validou individualmente todas as referências bibliográficas** citadas ao longo
653 deste trabalho, garantindo que as fontes existem, são autênticas e foram consultadas.
- 654 2. Certificou-se de que o uso de IA generativa (caso tenha ocorrido) **não gerou referências**
655 **falsas ou distorcidas** (alucinações), assumindo total responsabilidade pela precisão do
656 referencial teórico apresentado.

657

658 Por ser a expressão da verdade, firmo a presente declaração.

659 Umuarama, 22 de junho de 2026.



660

661

662 **Assinatura do(a) Aluno(a) (Autor/a)**

663



664

665

Assinatura do(a) Orientador(a)

667

668

669