



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOCÊNCIAS**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CLASTOGÊNICO DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA
INFANTUM* EM CÃES**

ROBERTA TOGNARELI RUIZ

Foz do Iguaçu
2020

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CLASTOGÊNICO DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA
INFANTUM* EM CÃES**

ROBERTA TOGNARELI RUIZ

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz
Co-orientador: Profa. Dra. Thatiana Correa de Melo

Financiamento: Vetqualis Diagnóstico Veterinário e Banco de Sangue

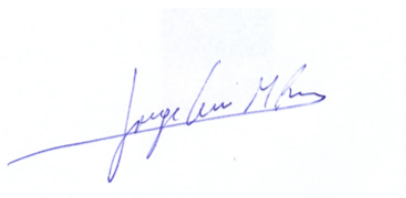
Foz do Iguaçu
2020

ROBERTA TOGNARELI RUIZ

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CLASTOGÊNICO DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA*
INFANTUM EM CÃES**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

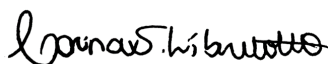
BANCA EXAMINADORA



Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz
UNILA



Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana
UNILA



Profa. Dra. Carina Sperotto Librelotto
UNIOESTE

Foz do Iguaçu, 20 de novembro de 2020.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

R934a

Ruiz, Roberta Tognareli.

Avaliação do efeito clastogênico da infecção por leishmania infantum em cães / Roberta Tognareli Ruiz. - Foz do Iguaçu, 2020.

70 f.: il.

Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Centro interdisciplinar de Ciências da vida, Programa de pós-graduação em Biociências.

Orientador: Jorge Luis Maria Ruiz.

1. Leishmaniose - Cães. 2. Leishmaniose visceral. 3. Infecção - clastogênese. I. Ruiz, Jorge Luis Maria, Orient. II. Título.

CDU: 616.9:636.7

Dedico este trabalho aos animais, nossos
irmãos menores...

AGRADECIMENTOS

À minha família, aos meus pais, que com esforço me conduziram até aqui, meus irmãos e meu companheiro que estão sempre ao meu lado em todos os momentos. Ao meu orientador Prof. Dr. Jorge Ruiz, que com paciência e empenho me ensinou e me estendeu as mãos sempre que precisei nesta trajetória. À minha coorientadora Profa. Dra. Thatiana Correa de Melo e ao Professor Dr. Rodrigo Pinheiro Araldi, que me ensinaram e apoiaram. À Olivia Soares, Camila Neri Barra e Rosane Braun, minhas companheiras de jornada laboratorial diária. À Aline Cechinel Assing Batista, minha companheira de curso que durante este período de estudo se tornou uma grande amiga. À todos os animais, nossos irmãos, que como nós são seres em evolução.

"... os animais, como nós, são também filhos de Deus, portanto são nossos irmãos. Irmãos menores, porque ainda sem a inteligência contínua, mas irmãos. Delineia-se ao nosso entendimento que tudo aquilo que é criado por Deus, e todos os seres o são, tem o divino impulso evolutivo. A evolução, assim, para tudo e para todos é inexorável, por lei Divina. Vemos como se processa o aperfeiçoamento espiritual dos seres, desde sua criação, palmilhando os reinos naturais, do irracional ao hominal, tudo em sequência, obedecendo à escala progressiva e perfeita. Deixo aqui um convite para o despertar frente a maravilha da criação de Deus, pois todos nós, bem como os animais e a natureza são criações do Divino Mestre. Se a nós, por mérito, é dispensado o dom da inteligência, os animais estão em seu caminho para disso se beneficiar, tanto quanto os Anjos, igualmente por mérito, têm a Pureza e a Luz, que estão sempre repassando à Humanidade. Eis porquê os animais, nossos irmãos na escala biológica, mas herdeiros semelhantes a nós das benesses divinas, têm os mesmos direitos que requeremos do mundo: a vida digna, a liberdade, o respeito e o Amor! ”

Eurípedes Kühl, 1995

Ruiz, Roberta Tognareli. **Avaliação do efeito clastogênico da infecção por *Leishmania infantum* em cães**. 78 páginas. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biociências – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

RESUMO

A *Leishmania infantum* é um parasita causador da leishmaniose canina, doença considerada zoonose, conhecida como leishmaniose visceral e que pode infectar humanos e animais. Nenhum tratamento até agora é realmente eficaz e muitos animais após sofrerem dos sintomas acabam morrendo em decorrência da doença e suas consequências. Os sinais clínicos são muito variados e inespecíficos, entre os principais podemos citar, anemia e trombocitopenia graves, emagrecimento, esplenomegalia, linfadenomegalia, doença hepática, insuficiência renal, lesões cutâneas, entre outros. Diante desse estado inflamatório crônico, podemos dizer que se cria um ambiente oxidativo que pode culminar em lesão celular e dano ao material genético dos cães infectados. Para investigar esses danos, foram aplicados o teste do micronúcleo e o ensaio do cometa, bem como a medição dos níveis séricos de LDH. Nossos resultados mostram que cães infectados com sintomas apresentam níveis mais elevados de LDH sérica ($517,5 \pm 164,3$ U / L, n = 17) quando comparados a cães oligossintomáticos ($433,4 \pm 223,6$ U / L, n = 7), sintomáticos ($398,3 \pm 238,3$ U / L, n = 12) ou cães saudáveis ($142,38 \pm 37,94$ U / L, n = 5). O maior nível de dano ao DNA foi encontrado em cães com infecção sintomatológica, conforme demonstrado pelo teste do micronúcleo e pelo teste do cometa. Foram encontradas diferenças estatísticas entre os animais oligossintomáticos e sintomáticos em comparação com cães saudáveis. Esses resultados mostram que a infecção por *Leishmania infantum* pode causar eventos clastogênicos que sugerem que esse processo tem grande potencial a ser estudado, visto que *Leishmania infantum* mostrou-se como um possível agente biológico mutagênico.

Palavras-chave: Infecção, Leishmania, Cães, DNA, Clastogênese

Ruiz, Roberta Tognareli. **Evaluation of the clastogenic effect of *Leishmania infantum* in dogs**. 78 páginas. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biociências – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

ABSTRACT

Leishmania infantum is a parasite that causes canine leishmaniasis which is a disease considered zoonosis known as visceral leishmaniasis and can infect humans and animals. No treatment so far is really effective and many animals after suffering from the symptoms end up dying as a result of the disease and its consequences. The clinical signs are very varied and non-specific, among the main ones we can mention, severe anemia and thrombocytopenia, weight loss, splenomegaly, linfadenomegaly, liver disease, kidney failure, skin lesions, among others. In view of this chronic inflammatory status, we can say that an oxidative environment is created and it can culminate in cell injury and damage to the infected genetic material of infected dogs. To investigate these damages, micronucleus test and comet assay were applied, as well as measurement of serum LDH levels. Our results show that symptomatic infected dogs have highest levels of serum LDH (517.5 ± 164.3 U/L, n=17) when compared to oligosymptomatic (433.4 ± 223.6 U/L, n=7), asymptomatic (398.3 ± 238.3 U/L, n=12) or healthy dogs (142.38 ± 37.94 u/L, n=5). Contrarily, highest DNA damage was found in symptomatic infected as demonstrated by the micronucleus test and comet assay. Was found statistical differences between oligosymptomatic and Symptomatic compared with healthy dogs. These results show that *Leishmania infantum* infection can cause clastogenic events that suggest this process has great potential to be studied, considering that *Leishmania infantum* can possibly be a biological mutagenic agent.

Key words: Infection, Leishmania, Dogs, DNA, Clastogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	26
Figura 2 – Interação entre tipos de reposta imune Th1 e Th2.	31
Figura 3 – Esquema da relação de diversos fatores que influenciam no desenvolvimento da inflamação e seus desfechos	35
Figura 4 – Relação entre inflamação crônica e câncer	37
Figura 5 – Esquematisação dos eventos responsáveis pela formação de micronúcleos e outros defeitos da citocinese	42
Figura 6 – Esquema da formação de micronúcleos e ponte anafásica durante o bloqueio da citocinese pela citocalasina B no ensaio de micronúcleo.	42
Figura 7 – Exemplo de núcleos intactos (cometa classe 0), com degradação (cometa classe 1) e com intensa degradação (cometa classe 2)	44
Figura 8 – Relação de aumento ou inibição pela LDH em diversos processos celulares associados à carcinogênese.....	46
Figura 9 – Fotografias representativas dos micronúcleos observados. Em A e B podem ser observados linfócitos binucleados. Em C linfócitos monocleados. Em D, E e G podem ser observados pontes anafásicas. Em E, F e G podem ser observados micronúcleos (assinalados pela seta preta).....	54
Figura 10 – Cometas encontrados em amostras de cães infectados com leishmania. Em A cometa com dano 1, em B e D cometas sem danos, em C cometa com dano 2....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequência de formação de micronúcleo para cada paciente e controles.	55
Tabela 2 – Comparação entre grupos no teste de Dunn.	56
Tabela 3 – Dados dos escore de cometas calculados para grupo com leishmaniose e grupo saudável.	57
Tabela 4 – comparação entre grupos no teste de Dunn dos dados do ensaio cometa.	58
Tabela 5 – Valores da enzima lactato desidrogenase sérica (LDH) expressada em U/L	59
Tabela 6 – Valores do teste de Bonferroni para múltiplas comparações.	60

LISTA DE QUADROS E GRAFICOS

Quadro 1 – Classificação das mutações no DNA	33
Gráfico 1 – Frequência de micronúcleos em animais com leishmaniose (Leish+), animais saudáveis (Leish -) e controle + tratado com ciclofosfamida.	55
Gráfico 2 – Escore dos cometas encontrados	58
Gráfico 3 – Análise estatística comparando os valores de LDH sérica.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPV	Vírus do papiloma bovino
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EBV	Vírus Epstein-Barr
Felv	Vírus da leucemia felina
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HPV	Vírus do papiloma humano
IARC	Agência Internacional de Pesquisa do Câncer
LDH	Lactato deshidrogenase
LMA	Low melting agarose
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NMA	Normal melting agarose
PBS	Phosphate-buffered saline
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute -1640
TAR	Antioxidante reativo total
TNF	Fator de necrose tumoral
UNILA	Universidade Federal da Integração Latino-Americana

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 Referencial teórico	24
1.1.1 Leishmaniose	24
1.1.2 Sinais clínicos da leishmaniose	27
1.1.3 Resposta imune na leishmaniose e inflamação crônica	28
1.1.4 Diagnóstico da leishmaniose canina	31
1.2 Inflamação e dano ao DNA	32
1.2.1 Dano ao DNA, mutagênese e clastogênese	33
1.3 Doenças infecciosas como potenciais causadoras de neoplasias (relação entre doenças infecciosas e desenvolvimento de neoplasias)	36
1.4 Detecção de danos ao DNA	40
1.5 Determinação de injúria celular	45
1.5.1 Lactato desidrogenase (LDH)	45
1.6 Justificativa	46
2. OBJETIVOS	47
2.1 Objetivo geral	47
2.2 Objetivos específicos	47
3. MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 Pacientes	48
3.2 Coleta do material	49
3.3 Ensaio de micronúcleo	49
3.4 Ensaio cometa	50
3.5 Determinação de LDH sérico	41
3.6 Análise estatística	52
3.6.1 Teste de micronúcleo	52
3.6.2 Ensaio cometa	52
3.6.3 Lactato desidrogenase	53

4. RESULTADOS.....	54
4.1 Micronúcleo.....	54
4.2 Ensaio cometa.....	56
4.3 LDH.....	59
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
7. REFERÊNCIAS.....	71
8. ANEXOS.....	78
8.1 Anexo 1.....	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Referencial teórico

1.1.1 Leishmaniose

A leishmaniose na América do Sul é causada pela *Leishmania infantum* atualmente sinônimo da *Leishmania chagasi*, um parasita do tipo protozoário transmitido pela picada de um flebótomo. As espécies de leishmania são membros da família Trypanosomatidae e são caracterizadas pela presença de DNA mitocondrial, o kinetoplasto (PALTRINIERI *et al.*, 2016). Especialmente no Brasil, a *Leishmania infantum* causa a doença chamada leishmaniose visceral em humanos e cães, também conhecida como calazar, representando uma zoonose. Esta encontra-se presente em todos os 5 continentes sendo endêmica em 76 países e, no continente americano, descrita em pelo menos 12. Dos casos registrados na América Latina, 90% ocorrem no Brasil. Estima-se que haja mais de 12 milhões de casos e que 360 milhões de pessoas estejam expostas à doença no mundo (ALVAR *et al.*, 2006) com dois milhões de novos casos a cada ano, sendo que na sua forma visceral, a doença é fatal em aproximadamente 59.000 pessoas anualmente (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009).

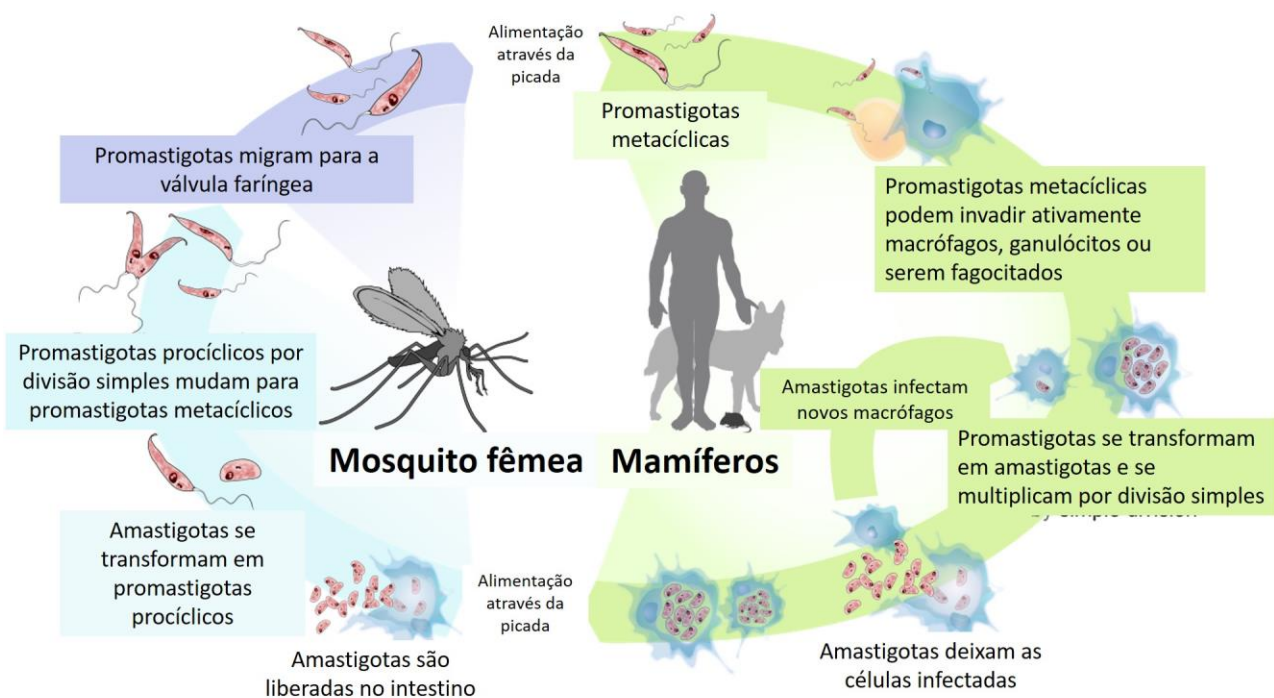
O gênero *Leishmania* engloba varias espécies, sendo que a região oeste do Paraná (Brasil) ganha especial atenção a *Leishmania infantum* dada sua prevalência na região, existem outras espécies de igual importância como a *L. amazonenses* e a *L. brasilienses* por exemplo que causam a leishmaniose cutânea, embora não seja o foco deste trabalho por não ser a prevalência na cidade e por ser considerada rara. Em áreas endêmicas, como no Brasil, a infecção por *Leishmania infantum*, causadora da leishmaniose visceral, se dá através da disponibilidade de um hospedeiro suscetível como os cães e a presença do mosquito transmissor como a *Lutzomyia longepalpis* (DORVAL *et al.*, 2009), que é o principal vetor da doença (SILVEIRA *et al.*, 2009).

No sul do Brasil, a doença está presente desde o ano 2000 no Rio Grande do Sul, no oeste do Paraná e em países como Argentina e Paraguai (SOUZA *et al.*, 2009). Em Foz do Iguaçu, a doença só teve seu primeiro caso registrado em humano por PINA TRENCH FJ (2016), nesse mesmo ano, sendo que a presença do mosquito transmissor foi registrada em 2012 (SANTOS *et al.*, 2012). Segundo THOMAZ SOCCOL *et al.*

(2017), desde então a doença vem se propagando de forma intensa e atualmente estima-se um número de aproximadamente 23% de cães infectados. Por sua vez, o mosquito já tem sido encontrado em área de floresta e áreas de preservação com fauna abundante.

O principal reservatório do parasita é o cão doméstico. O número de cães infectados na América do Sul é estimado em milhões, e em países como Venezuela e Brasil existem altas taxas da infecção em cães associadas com alto risco da doença em humanos (BANETH *et al.*, 2008). Ele é considerado o elo mais importante na transmissão pelo flebotomíneo, visto que, a doença é mais prevalente nesta espécie, e também a doença é transmitida entre cães sintomáticos ou não, ele apresenta grande importância no ciclo do parasita e representa o principal reservatório doméstico da doença, fazendo com que a infecção humana esteja altamente associada a Leishmaniose visceral canina (SANTOS-GOMES *et al.*, 2003).

Os cães são infectados por promastigotas de leishmania depositados na pele durante as picadas de vetores como os mosquitos *Lutzomya longepalpis* fêmeas infectadas. As formas promastigotas invadem as células hospedeiras, principalmente macrófagos, e se replicam como amastigotas intracelulares (SILVEIRA *et al.*, 2009). Essas formas são capazes de se espalhar pelas células mononucleares do sistema reticuloendotelial encontradas no baço, fígado e medula óssea e, assim, causar uma doença crônica, grave e muitas vezes fatal (PINELLI *et al.*, 1994). O ciclo biológico da leishmania é apresentado na figura 1.

Figura1: Ciclo de vida da *Leishmania sp.*

Fonte: Adaptado de www.fiocruz.com.br

A leishmaniose é um parasita difásico que completa seu ciclo de vida em dois hospedeiros, um vetor flebotomíneo e um mamífero, onde a forma amastigota intracelular se desenvolve (KILLICK-KENDRICK, 1999). O flebotomíneo se alimenta do sangue de cães, principalmente em áreas de pele com pouco pêlo, como cabeça, ponta da orelha, focinho, e áreas inguinais e perianais. Uma vez que o parasita ganha a derme do hospedeiro vertebrado, segue a fagocitose pelos macrófagos. O macrófago envolve o parasita em um vacúolo de fagossomo e tenta eliminá-lo através de uma cascata oxidativa de metabolitos, como óxido nítrico e fusão com lisossomos, onde existem grande variedades de enzimas hidrolíticas e oxidativas. Os macrófagos dérmicos fagocitam ativamente os promastigotas, que posteriormente perdem o flagelo e adquirem um formato arredondado (amastigotas). As formas amastigotas também são fagocitadas ativamente por macrófagos, em grande quantidade levam à destruição da célula fagocítica e assim seguem infectando progressivamente mais fagócitos. Formas flageladas (promastigotas) se multiplicam no intestino da flebotomina fêmea sugadora de sangue (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). Depois de concluída a digestão do sangue, os parasitas migram para o intestino, se transformam

em promastigotas infecciosos (processo de metaciclogênese), e são depositados na derme do hospedeiro através da picada subsequente do inseto. Apesar das defesas do organismo, a leishmania consegue escapar das defesas celulares para sobreviver e se multiplicar no interior do macrófago. Ao tudo, o progresso da infecção depende da eficiência da resposta imune do hospedeiro (ALVAR *et al.*, 2004).

1.1.2 Sinais clínicos da leishmaniose

O protozoário responsável da leishmaniose pode causar uma variabilidade de formas da doença, desde uma doença local cutânea até a forma visceral disseminada, constituindo a forma mais grave e geralmente fatal quando não tratada (RIBEIRO *et al.*, 2018).

O período de incubação da doença antes do aparecimento dos sinais clínicos pode durar meses a anos, durante os quais o parasita se dissemina no organismo. Alguns cães desenvolvem doença clínica, enquanto outros permanecem portadores assintomáticos que são fontes de infecção para flebotomíneos e que podem, assim, transmitir a doença para outros cães ou seres humanos. Os sinais clínicos da leishmaniose canina são variáveis (OLIVA *et al.*, 2006).

A *Leishmania infantum* apresenta três características patogênicas gerais. Primeira, a célula alvo do parasita é o macrófago, que é inibida em termos de atividade antimicrobiana e converte-se no local para a replicação dos parasitas. Segunda, é a determinante da infecção e evolução da doença, seu sucesso depende das respostas imunológicas do hospedeiro. Terceira, uma vez estabelecida, a infecção geralmente persiste, ela tende a se localizar em todos os tecidos nos quais células monocíticas macrofágicas existem em grandes números (RIBEIRO *et al.*, 2018).

Os principais achados clínicos encontrados no exame físico incluem lesões cutâneas, linfadenomegalia generalizada, perda progressiva de peso, atrofia muscular, intolerância ao exercício, diminuição do apetite, letargia, esplenomegalia, poliúria e polidipsia, lesões oculares, epistaxe, onicogribose, claudicação, vômitos e diarreia. A variedade e a não especificidade dos sinais clínicos fazem a lista de diagnóstico diferencial ser amplamente extenso (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009).

Baseado em estudos em cães com leishmaniose e com sintomatologia variada (assintomáticos, oligosintomáticos e polisintomáticos), ficou demonstrado que cães

assintomáticos podem ser fonte de infecção para os flebotomíneos (GUARGA *et al.*, 2000; MOLINA *et al.*, 1994)

A variabilidade dos sinais clínicos depende do estado imunológico do hospedeiro e da genética do parasita. Alguns cães podem ficar infectados por anos sem apresentar sintomas enquanto outros podem ter sintomas graves e eventualmente ir a óbito se não tratados. Esses sintomas clínicos e alterações laboratoriais são muito variáveis se apresentando como lesões de pele discretas ou importantes, ou com envolvimento sistêmico, podendo causar anemia, insuficiência renal, trombocitopenias, distúrbios de coagulação importantes, hepatopatias e inflamação crônica generalizada (LANA *et al.*, 2018). Dentro desse espectro, a doença clínica pode variar de uma dermatite associada à imunidade celular específica e baixas respostas humorais a uma severa doença caracterizada por dano renal com glomerulonefrite, devido à deposição de imunocomplexos, associada a resposta humoral maciça e alta carga parasitária (ORDEIX *et al.*, 2005).

Embora as manifestações clínicas da leishmaniose visceral apresentem um amplo espectro de sinais clínicos que não são específicos, uma alta proporção de animais não progride na doença, controlam os parasitas e vivem por anos ou a vida inteira sem sinais clínicos. A presença desses cães na endemia contribui para a manutenção dos parasitas, uma vez que eles podem transmitir o parasita (FOGLIA *et al.*, 2008).

1.1.3 Resposta imune na leishmaniose e inflamação crônica

Como sinalado anteriormente, a resposta imune desempenha um papel central no processo de infecção, sendo que os linfócitos T-helper (Th ou TCD4+), que podem induzir a imunidade humoral (Th2) ou mediado por resposta celular (Th1). Esses cães infectados, apresentam linhas de resposta com correlação clínica. Cães saudáveis, com resposta Th2 leve ou inexistente, e presença de resposta específica Th1 e cães gravemente doentes, caracterizados por uma exagerada resposta Th2 e resposta Th1 ausente ou leve (PINELLI *et al.*, 1994; ROSSI *et al.*, 2018). A resistência a doenças, em cães, parece estar associada com uma resposta imune do tipo misto Th1-Th2, com predominância de citocinas Th1. Enquanto a sensibilidade à doença parece estar relacionada à redução produção de citocinas, principalmente do tipo Th2.

Nessas situações, a estimulação antigênica contínua e produção excessiva de anticorpos resulta em formação e deposição de imunocomplexos que podem causar glomerulonefrite, vasculite, poliartrite, uveíte e meningite, além da produção de autoanticorpos contra plaquetas e hemácias resultando em anemia hemolítica ou trombocitopenia imunomediada, pode ainda acontecer esses dois processos concomitantes, o que caracteriza uma síndrome chama síndrome de Evans (PINELLI *et al.*, 1994; ROSSI *et al.*, 2018).

A leishmaniose é reconhecidamente uma doença causadora de inflamação crônica e elevada produção de citocinas como INF – gamma e IL-2, gerando uma resposta imune importante do hospedeiro frente ao parasita (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2016). No cão o espectro clínico é caracterizado por: imunidade protetora mediada por células T CD4 que liberam interferon gamma, IL-2 e TNF-alfa induzindo a atividade anti-leishmania dos macrófagos, e susceptibilidade à doença: associada à produção de uma resposta imune humoral não protetora marcada pela resposta celular reduzida ou deprimida com resposta mista de citocinas Th1 e Th2 (ALVAR *et al.*, 2004; BANETH *et al.*, 2008).

Quando se fala em imunidade deve se lembrar que quando células T (Th0) encontram um antígeno nos tecidos linfóides secundários, elas são capazes de se diferenciar em células inflamatórias Th1 ou em células auxiliares Th2, que podem ser distinguidas pelas citocinas que elas produzem. Se uma célula Th0 se torna uma Th1 ou uma Th2 depende das citocinas no meio, onde são influenciadas pelo antígeno. Células Th1 e Th2 afetam células diferentes e influenciam o tipo da resposta imune. Citocinas produzidas pelas células Th1 ativam macrófagos e participam na geração de células T citotóxicas (Tc), resultando em uma resposta imune mediada por células. Contrariamente, citocinas produzidas pelas células Th2 ajudam a ativar células B, resultando na produção de anticorpos. Além disso, citocinas Th2 também ativam granulócitos. Assim como as citocinas atuam na ativação da resposta imune celular, também podem exercer influências inibitórias uma em relação à outra, demonstrando a complexa resposta a cada tipo de antígeno. De esta forma, a resposta imune é dirigida para o tipo de resposta necessária para enfrentar o patógeno encontrado (respostas mediadas por células para patógenos intracelulares ou resposta humoral contra patógenos extracelulares) (DELVES *et al.*, 2013).

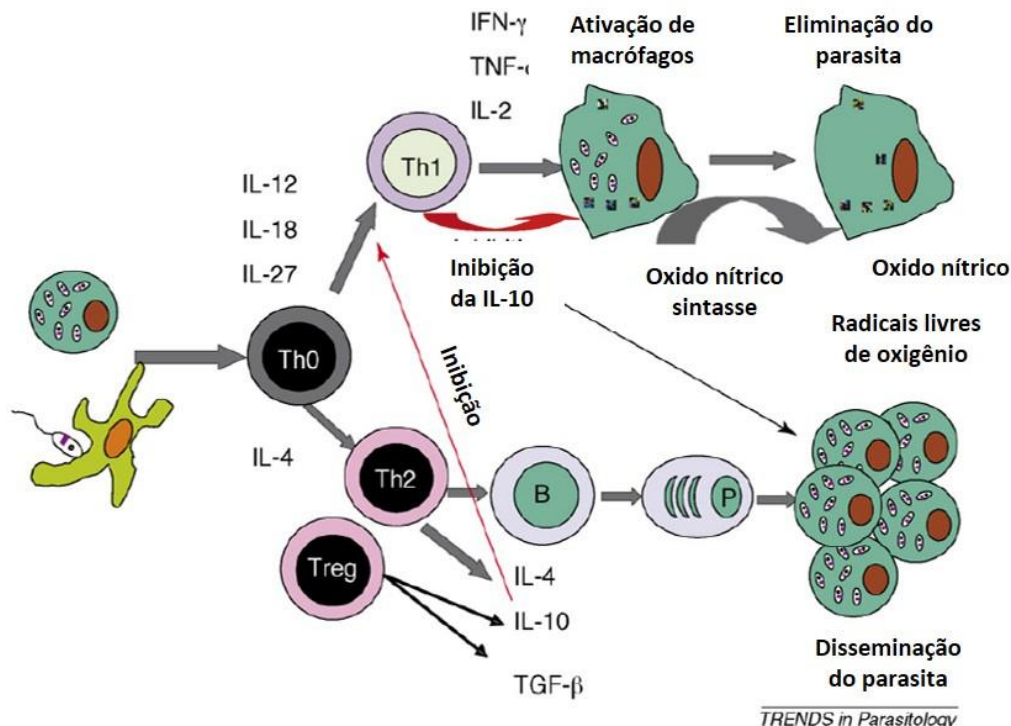
No caso da leishmaniose, a resistência ou susceptibilidade à doença está diretamente correlacionada com a indução de uma resposta Th1 caracterizada por

IFN- γ , IL-2 e produção de TNF- α , ou uma resposta Th2 com a produção de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e TGF- β , respectivamente. Considera-se que o tipo e nível de ativação de resposta imune influencia diretamente a gravidade da doença (BARBOSA *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2010).

Uma redução na carga de *Leishmania sp.* mostrou-se relacionada à expressão elevada de IFN- γ e TNF- α , enquanto que o aumento da expressão de IL-10, da proteína reguladora de ferro e um aumento dos níveis plasmáticos de proteína foram associados a uma maior carga parasitária (DO NASCIMENTO *et al.*, 2013).

A exaustão das células T resultante da leishmaniose sintomática pode afetar a resposta à vacinação e a eficácia dos tratamentos utilizados no controle da doença (ESCH *et al.*, 2013). Diferentes relatos na literatura associaram a carga parasitária em diferentes tecidos com a resposta imune do hospedeiro, avaliando os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias. Existe um consenso de que uma resposta mista Th1 / Th2 é observada no momento da detecção de uma infecção por *Leishmania sp.*, apesar da prevalência de um perfil Th2. Mais tarde na infecção, quando a carga do parasita diminui, por exemplo como resultado do tratamento, o perfil Th1 se torna predominante. Assim um espectro de respostas imunes inatas e adquiridas a infecção é montada pelo hospedeiro canino. Os dois pólos extremos opostos desse espectro são pro-imunidade mediada por células T e suscetibilidade doença associada a uma resposta imune humoral não protetora e depressão de células relacionadas com a imunidade. Baseado em testes *in vitro* e *in vivo*, é amplamente aceito que os macrófagos desempenham um papel central no controle da infecção por *Leishmania infantum*. Citocinas como interferon-gamma (IFN- γ), IL-2 e fator de necrose tumoral (TNF- α) secretado por células T induzem atividade anti-leishmania de macrófagos. Esta atividade é mediada pela ação do óxido nítrico (NO), que é considerada a principal molécula efetora produzido por macrófagos, e induz a morte intracelular das formas amastigotas por apoptose. As células do baço de cães infectados mostraram expressão predominante de IL-10, que foi positivamente correlacionado com carga parasitária e gravidade do quadro clínico. A IL-10 é considerada um regulador da atividade Th1 que mantém o equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 e inibe a atividade microbicida dos macrófagos infectados (BANETH *et al.*, 2008). Um esquema sobre a cascata da imunidade pode ser observado na Figura 2:

Figura 2: Interação entre tipos de reposta imune Th1 e Th2.



Fonte: modificado de BANETH *et al.* (2008).

1.1.4. Diagnóstico da leishmaniose canina

Os métodos diagnósticos incluem a detecção de formas amastigotas em esfregaços citológicos de aspirados de lesões cutâneas, linfonodos, medula óssea e baço (ALVAR *et al.*, 2004). Menos comumente a citologia é realizada em outros tecidos (AGUT *et al.*, 2003). Os parasitas de *Leishmania infantum* também podem ser vistos na biópsia histopatológica de secções da pele ou outros órgãos infectados (MOREIRA *et al.*, 2007). As abordagens diagnósticas mais úteis para investigação de infecção em cães infectados, doentes e clinicamente saudáveis, incluem: detecção de anticorpos específico anti-leishmania por técnicas sorológicas e demonstração da presença do DNA do parasita em tecidos pela aplicação de técnicas moleculares (ORDEIX *et al.*, 2005; OSAKWE *et al.*, 2013).

A estimulação do sistema imune, a produção de citocinas, mais a presença do parasita, criam um ambiente altamente danoso para as células em geral, e principalmente ao material genético delas (KOPTERIDES *et al.*, 2007; MORRISON, 2012).

1.2 Inflamação e dano ao DNA

Evidências epidemiológicas sugerem que aproximadamente 25% de todo o câncer humano em todo o mundo está associado com inflamação crônica, infecção crônica ou ambos. A inflamação local como um antecede um evento importante para o desenvolvimento do câncer tem sido reconhecido em pacientes com câncer. Mais de 150 anos atrás, Rudolph Virchow especulou sobre uma ligação entre a inflamação e câncer com base em suas observações de encontrar leucócitos em carcinomas mamários humanos (MORRISON, 2012). Ele sugeriu que o "infiltrado linforeticular" refletiu a origem de câncer em locais de inflamação crônica. Desde a observação de Virchow, um grande e crescente corpo de evidências factuais, epidemiológicas e circunstanciais definindo a ampla gama de agentes inflamatórios e infecciosos, condições que predis põem as células suscetíveis à mudanças genéticas. Inflamação crônica sozinha é suficiente para causar oncogênese. Frequentemente, no entanto, a infecção é o evento primário e crônico, o resultado é inflamação. É provável que os mecanismos de inflamação crônica local com ou sem infecção que induz câncer em humanos e animais de laboratório e aqueles que induzem câncer em pacientes na medicina veterinária são semelhantes. Esta hipótese é baseada em uma grande e crescente biblioteca de literatura que documentou genética semelhante ou idêntica expressão, infiltrados de células inflamatórias, citocinas e expressão de quimiocinas e outros biomarcadores em humanos e muitos mamíferos domésticos com cânceres equivalentes (MORRISON, 2012).

O ácido dextroribonucleico (DNA) é a fonte da informação genética de toda célula, e é resguardado de ataques físicos, químicos e biológicos por sistemas de reparo altamente eficientes. Porém, num meio ambiente inflamatório e oxidativo, os constantes ataques podem induzir alterações que se perpetuam ou induzem a morte celular. Estas alterações são chamadas de mutações e surgem por vários mecanismos, desde modificações mínimas na sequência do DNA até grandes rearranjos produtos de quebras na fita do DNA (SAITO *et al.*, 2015)

1.2.1 Dano ao DNA, mutagênese e clatogênese

As mutações que causam rearranjos cromossômicos visíveis ou detectáveis no microscópio óptico comum podem ser definidos como efeitos clastogênicos. Estes induzem a quebra de cromossomos levando à perda, adição ou reorganização do material genético (WINKLER *et al.*, 2005).

Uma classificação simplificada das mutações é apresentada no quadro 1.

Quadro 1: Classificação das mutações no DNA.

Mutação	Efeito
Substituição	Uma base é trocada por uma das outras bases do DNA
Deleção	Blocos de uma ou mais bases de DNA se perdem
Inserção	Blocos de uma ou mais bases de DNA são adicionadas
Inversão	Rotação de 180º de um bloco de DNA
Translocação recíproca	Mudança de posição de parte de cromossomos não homólogos
Rearranjos cromossômicos	Mudança de posição de vários genes juntos

Fonte: modificado de ABEYSINGHE *et al.* (2003)

As células acometidas por estas mutações podem ter diversos desfechos. Quando a mutação acontece numa região não utilizada do DNA ou a alteração é corretamente reparada, a célula continua sua vida de forma normal. Mas quando a mutação causa uma alteração significativa, e a célula não consegue reparar eficientemente o dano, a célula pode iniciar o de morte celular (OHSHIMA *et al.*, 2003).

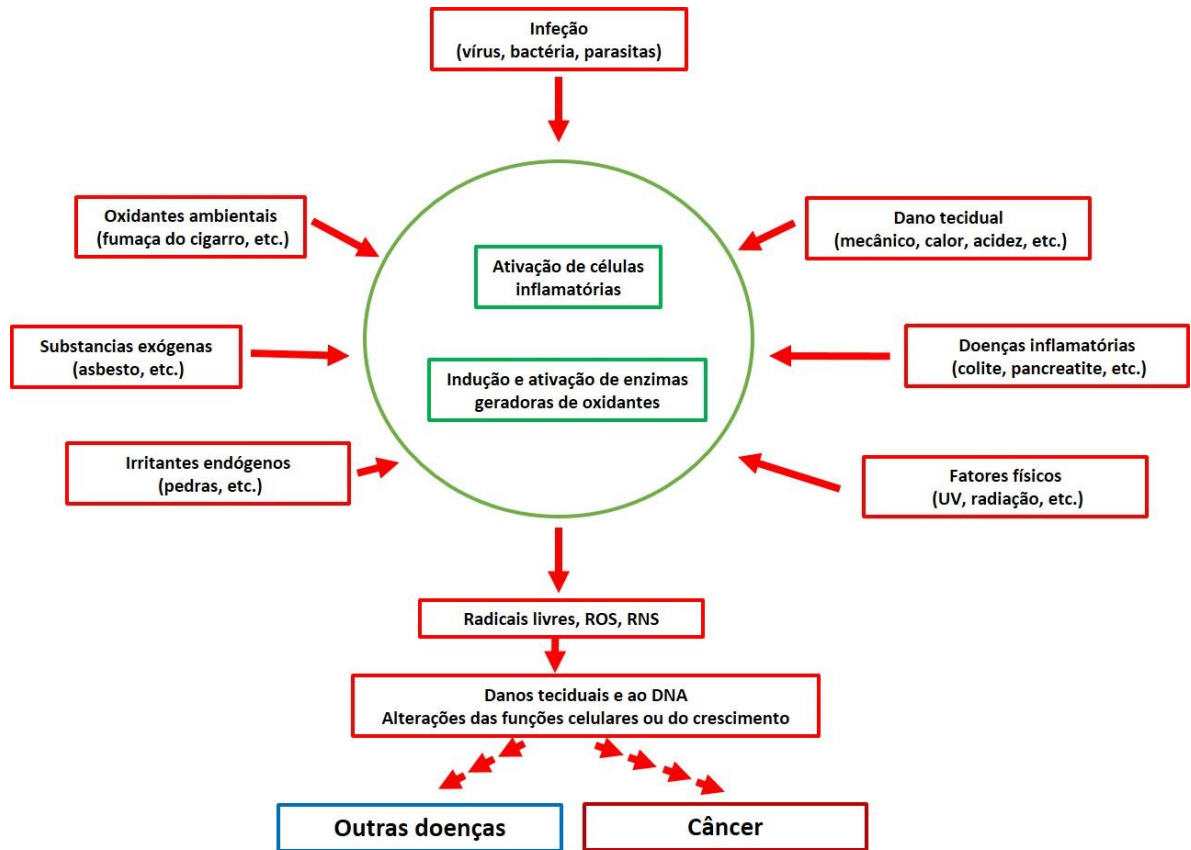
Quando as alterações são benéficas, como ser ativação de oncogenes ou inibição de genes supressores de tumores, ou quando os mecanismos de correção permitem a perpetuação da vida, a célula pode sobreviver as mutações. Estas por sua vez deixam a célula susceptível a acumular mais mutações ou a se diferenciar num tipo de célula sem controle, chamada de célula tumoral que dará origem ao câncer. Uma fração significativa do número de pessoas e animais acometidos pelo câncer, é atribuído a estados de infecção a inflamação crônica mas, ainda, os mecanismos da carcinogênese causada por estes fatores não estão bem esclarecidos (OHSHIMA *et al.*, 2003).

Os estudos mais recentes propõem três mecanismos principais responsáveis da associação da inflamação e a carcinogênese. Estes são: 1- alterações do DNA do hospedeiro, que podem ser induzidas pelo agente agressor (exemplos destas são: inserção, deleção, translocação e amplificação); 2- o estresse oxidativo contínuo e 3 - a inflamação crônica, estes dois últimos se sustentam mutuamente, levando à neoplasia e promovendo a progressão do tumor. A inflamação foi associada ao desenvolvimento de câncer, e a presença de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e eicosanóides, que se mostraram capazes de estimular a proliferação de células tumorais e não transforma-las (OHSHIMA *et al.*, 2003).

A literatura sugere que a infecção por parasitas pode gerar uma depleção do sistema imune em algum momento, quando o tempo de infecção é prolongado. A ativação de células inflamatórias e o envolvimento de fatores genéticos ou outros fatores do hospedeiro podem cooperar para induzir carcinogênese em alguns casos. Dentro do contexto infecções parasitárias, a peroxidase eosinofílica (EPO) é ativada e gera ácido hipobromoso (HOBr) a partir de H_2O_2 e íon brometo. Peroxidases como MPO e EPO também podem gerar dióxido de nitrogênio (NO_2) a partir de H_2O_2 e nitrito como substratos. A indução e ativação dessas enzimas nas células inflamatórias também são reguladas por citocinas pró-inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interleucinas (IL) como a IL-6 e outras, e interferon. Polimorfismos de genes que codificam citocinas foram associados a um risco aumentado ou formação de certos tipos de câncer, como por exemplo, o polimorfismo de TNF- α associado ao linfoma não-Hodgkin. A produção aumentada dessas citocinas pode aumentar risco de câncer induzindo ou ativando enzimas envolvidas na produção de oxidantes inflamatórios (OHSHIMA *et al.*, 2003).

A relação de agressores ambientais e suas possíveis consequências estão resumidas na figura 3.

Figura 3: Esquema da relação de diversos fatores que influenciam no desenvolvimento da inflamação e seus desfechos.



Fonte: modificado de OHSHIMA; TATEMICHII e SAWA (2003).

Essas enzimas ativadas nas células inflamatórias incluem NADPH oxidase e xantina oxidase, que produzem ânion superóxido (O_2^-), óxido nítrico sintase indutível (iNOS), que produz óxido nítrico (NO) da L-arginina e mieloperoxidase (MPO), que gera ácido hipocloroso (HOCl) a partir de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ion cloreto (Cl^-) como substratos. Essas espécies reativas são produzidas para atacar microorganismos invasores, como mecanismos de nitração, oxidação e cloração. Contudo, quantidades excessivas de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS) podem causar injúrias às células hospedeiras e também induzir quebras na fita de DNA. O acúmulo de danos no DNA, com o tempo, pode levar a modificações genéticas em células que podem causar processos mutagênicos ou carcinogênicos (KOCYIGIT *et al.*, 2005).

Ambas as vias extrínsecas e intrínsecas na inflamação relacionada ativa fatores de transcrição (principalmente NF- κ B, HIF-1 α , STAT3), que são a chave indutores de mediadores inflamatórios (por exemplo, citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e óxido nítrico) (MANTOVANI *et al.*, 2008). Na mudança para “latente”, a inflamação contribui para o desenvolvimento do tumor através de diferentes mecanismos, incluindo a indução de instabilidade genômica, alteração em eventos epigenéticos e subsequente expressão genética inadequada, aumentada proliferação e resistência à apoptose de células (PORTA *et al.*, 2009).

Essas agressões ao material genético, são rapidamente corrigidas por um eficiente sistema de reparo. Quando este sistema falha, acontecem mutações simples, algumas delas sem relevância clínica como as mutações silenciosas, em que é alterada a sequência do DNA, mas a sequência da proteína é preservada ou quando as mutações acontecem em regiões não codificantes ou silenciadas. Em alguns casos, estas mutações podem criar “*hot spots*” ou sítios frágeis, os quais podem dar origem a mutações maiores, como quebras de dupla fita do DNA que podem resultar em modificações da sequência ou até perdas de parte dos cromossomos. Estas mutações são principalmente relevantes em células que mantêm a sua capacidade replicativa e podem ser detectados por várias metodologias citogenéticas e moleculares (WINKLER *et al.*, 2005).

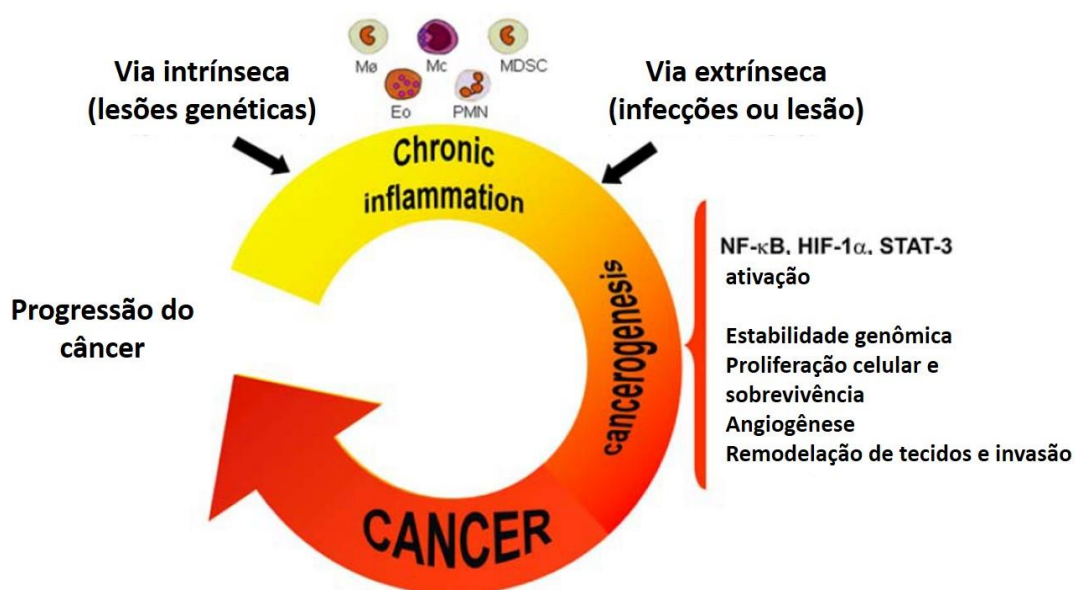
1.3 Doenças infecciosas como potenciais causadoras de neoplasias (relação entre doenças infecciosas e desenvolvimento de neoplasias)

Entre os agentes que tem relação com a iniciação, promoção e progressão da carcinogênese encontram-se agentes químicos, físicos e biológicos. Neste último grupo é onde encontra-se a maior dificuldade em demonstrar a relação direta entre o agente e a carcinogênese, devido principalmente à lentidão do processo. Há muitos anos é discutida a possibilidade de certos tipos de câncer tenham como causa de base agentes infecciosos (GRANER *et al.*, 2000).

Em 1845 foi descrita a transmissão de verrugas por instrumentos cirúrgico, embora a associação entre agentes infecciosos e o câncer somente foi proposta na segunda metade do século XIX por Rudolf Maier (GRANER *et al.*, 2000; ZUR HAUSEN, 2009).

Nas últimas quatro décadas, o envolvimento dos agentes infecciosos com o câncer tem despertado grande atenção (DAMANIA, 2016). Estudos epidemiológicos dão base no conceito de que a inflamação crônica causada por determinadas doenças é frequentemente associada com aumento do risco para desenvolvimento do câncer, essa relação vem da aferição de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio gerados pelas células inflamatórias que foram recrutadas, causando mutagênese e resultando na iniação (figura 4) (PORTA *et al.*, 2009).

Figura 4: Relação entre inflamação crônica e câncer.



Fonte: modificado de PORTA *et al.* (2009).

Segundo a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC), alguns desses agentes são o vírus da hepatite B (HBV) e C (HCV), o vírus *Epstein-Barr* (EBV), o vírus do papiloma humano (HPV), o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), a bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) e a bactéria *Streptococcus bovis* (*S. bovis*). Geralmente, as infecções estão ligadas a 10% dos tipos de câncer. A prevalência desses agentes infecciosos é menor nos países desenvolvidos e maior nos países em desenvolvimento. Os agentes infecciosos podem aumentar o risco de câncer humano por diferentes mecanismos, sendo que vírus, como HPV, HBV e EBV, atuam como agentes carcinogênicos diretos via a expressão de oncogenes que pode inibir a apoptose e aumentar a proliferação célula ou imortalizar as células (MASROUR-ROUDSARI & EBRAHIMPOUR, 2017).. Em outras palavras, já é aceito que esses

agentes são eficazes indutores de instabilidade do genoma das células e podem causar a proliferação exacerbada das células normais mediante transformação. *H. pylori* e HCV podem causar inflamação a longo prazo, assim, podem levar a alterações nos mecanismos imunológicos e produzir mediadores inflamatórios, que finalmente podem promover o câncer (MASROUR-ROUDSARI E EBRAHIMPOUR, 2017).

Ainda não existem provas diretas de que agentes parasitários, como o caso da leishmaniasis, tenham relação com o desenvolvimento do câncer. Mas entre os poucos trabalhos na literatura, encontra-se o relato da coexistência, em humanos e animais, da infecção por leishmaniasis e neoplasias, principalmente linfoma (FOGLIA *et al.*, 2018; KOPTERIDES *et al.*, 2007). Em 2013, Ferro e col. relataram um caso de sarcoma com presença de formas amastigotas dentro do tumor diagnosticado por histopatologia e imunohistoquímica (FERRO *et al.*, 2013).

Ainda, fatores imunossupressores podem auxiliar aos parasitas na capacidade carcinogênica. Neste sentido, a imunossupressão devido à infecção pelo HIV-1 pode regular negativamente a resposta imune que normalmente ajuda a proteger o organismo de certos tipos de câncer. Vários estudos foram realizados relatando algumas outras bactérias consideradas como fator de risco para câncer como *Salmonella enterica* serovar typhimurium (*S. typhimurium*) e câncer de vesícula biliar (GBC). *Bacilotropheryma whipplei* está associada ao linfoma e *Borrelia vincentii* associada ao carcinoma espinocelular (MASROUR-ROUDSARI E EBRAHIMPOUR, 2017).

O papiloma vírus de *Bos taurus* também conhecido como papiloma vírus bovino (BPV) acomete os animais em todo o mundo (BOCANETI *et al.*, 2016). E de acordo com STOCCO DOS SANTOS *et al.* (1998) o papiloma vírus pode agir no material genético do hospedeiro causando alterações citogénéticas como ploidias, *gaps*, quebra da fita de DNA. Essa relação entre o BPV e o hospedeiro foi demonstrada por Araldi em sua tese de doutorado no ano de 2017, através de vários testes citogenéticos, histopatologia e imunohistoquímica (ARALDI, 2017).

Outro exemplo a ser citado, onde um agente infeccioso pode interagir com o material genético do hospedeiro e induzir o surgimento de neoplasia, é o vírus da leucemia felina em felinos (Felv). O linfoma é um câncer objeto de estudo de vários trabalhos que associam a infecção pelo Felv com o seu desenvolvimento, este retrovírus é considerado com alto potencial oncogênico (WEISS *et al.*, 2010).

Há, um conjunto de evidências de uma possível relação entre imunomodulação de células T, atribuída a infecções, e o desenvolvimento de linfomas. Além disso, no homem, o linfoma primário cardíaco já foi observado, especialmente, em pacientes imunossuprimidos (PEIXOTO *et al.*, 2017).

A disfunção do sistema imunológico, em humanos portadores de HIV, vem sendo considerada fator predisponente ao desenvolvimento de diversas infecções oportunistas e neoplasias (PAREDES *et al.*, 2003). De fato, já se verificou que, em áreas endêmicas, até 10% de pacientes HIV-positivos são coinfectados com *Leishmania sp.* (BOUTROS *et al.*, 2006). A coexistência de infecção oportunista e neoplasia não é um achado incomum ou inesperado em humanos portadores do vírus, havendo diversas descrições da observação simultânea de leishmaniose e processo neoplásico, nas mesmas amostras de tecido de pacientes HIV-positivos (ABAJO *et al.*, 1997; BOUTROS *et al.*, 2006; GALLEGU *et al.*, 1996; PERRIN E YERLY, 1995). Traduzindo a condição para o cão, podemos hipotetizar que a disfunção do sistema imunológico causada pela infecção por *Leishmania sp.* (PINELLI *et al.*, 1994; REIS *et al.*, 2010) pode torná-lo mais susceptíveis a expressar um quadro patológico neoplásico raro (HAMMER *et al.*, 2001).

Como ressaltaram FOGLIA MANZILLO *et al.* (2008), ao descreverem um caso de linfoma extranodal em cão com leishmaniose, os linfócitos T gama-delta podem estar envolvidos na resposta imune do hospedeiro contra *Leishmania infantum*. Além disso, a estimulação antigênica prolongada e a imunossupressão crônica, típicas da leishmaniose, podem desempenhar algum papel na etiopatogenia do linfoma de células T. Estudos recentes demonstraram que a leishmaniose interfere negativamente com a ativação e a função de macrófagos e células dendríticas (BRANDONISIO *et al.*, 2004). Nessas circunstâncias, a subsequente disfunção imunológica poderia comprometer a eficiência da imunovigilância contra proliferação de clones de células neoplásicas (KOPTERIDES *et al.*, 2007).

Uma associação entre a leishmaniose cutânea e carcinoma, em especial o carcinoma de células escamosas e carcinoma de células basais foi encontrada por KOCYIGIT *et al.* (2005), onde ele relata que os mecanismos ainda precisam ser melhor esclarecidos mas que as células produzem substâncias tóxicas e oxidantes no intuito de cessar a replicação do parasita e essas substâncias podem predispor a carcinogênese.

O fator de necrose tumoral (TNF) é o principal mediador da inflamação, com ações dirigidas à destruição e recuperação do tecido. Ao induzir a morte de células doentes no local de inflamação, o TNF estimula o crescimento de fibroblastos. Pode destruir os vasos sanguíneos, mas também induzem fatores angiogênicos. Da mesma forma, na doença maligna, TNF local em alta dose destrói seletivamente os vasos sanguíneos do tumor, mas quando produzida cronicamente, esta citocina pode atuar como um promotor de tumor, contribuindo para a remodelação e desenvolvimento estromal necessários para o crescimento e propagação do tumor (BALKWILL E MANTOVANI, 2001).

Todos os fatores expostos anteriormente sugerem que a infecção por *Leishmania infantum* gera um microambiente onde existe desregulação do sistema imune em forma crônica capaz de propiciar estresse celular e, sendo assim, aumento das células normais que acumulam mutações. A gravidade destas mutações ou seu acúmulo podem levar ao desenvolvimento de outras doenças como neoplasias, por exemplo o linfoma (OSAKWE *et al.*, 2013).

1.4 Detecção de danos ao DNA

Existem vários métodos citogenéticos que permitem a detecção do dano ao DNA, ou a determinação do reparo recente no DNA. (WINKLER *et al.*, 2005)

Dentre os testes de genotoxicidade descritos na literatura, o ensaio cometa e o ensaio de micronúcleos são reconhecidos por serem ensaios robustos, de boa sensibilidade e alto poder estatístico para avaliar quebras de DNA. Desde 1959, a presença de micronúcleos em células tem sido proposta como um marcador de danos citogenéticos. Além disso, a associação das técnicas de ensaio de micronúcleo e o ensaio cometa é considerada a combinação padrão ouro para avaliar o potencial mutagênico de diversas substâncias, uma vez que ambos os ensaios são altamente sensíveis e permitem detectar quebras nos níveis cromossômico e cromático, respectivamente (ARALDI *et al.*, 2015).

O ensaio cometa em condições alcalina *in vivo* é especialmente importante para avaliar o efeito genotóxico: a resposta reflete as condições tais como absorção, distribuição, metabolismo e excreção *in vivo* dos produtos químicos genotóxicos, e também a capacidade das células em reparar o DNA. Esses fatores, é claro, variam

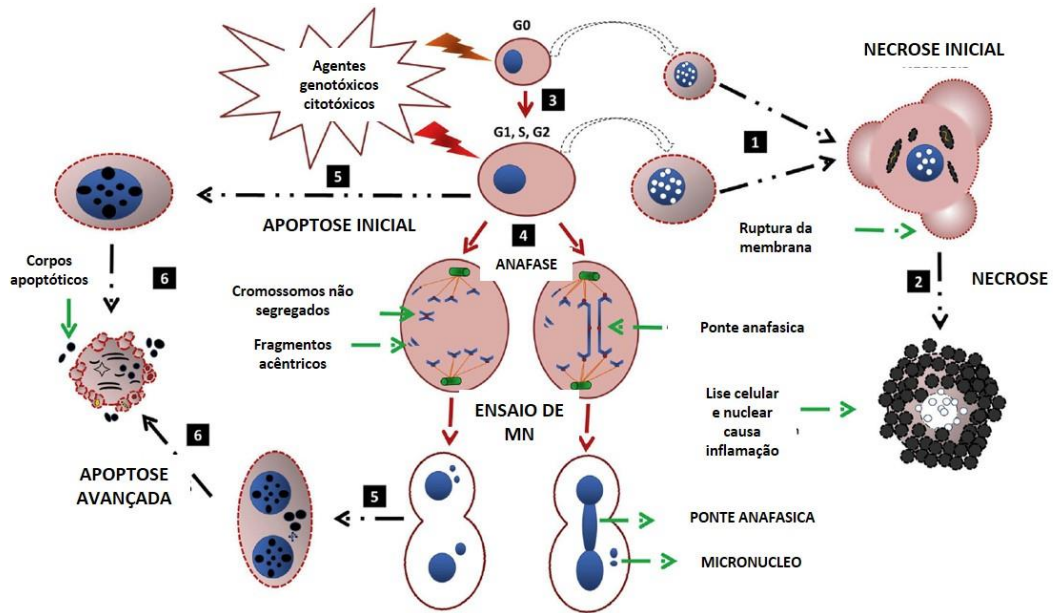
entre as espécies e tecidos e dependem dos tipos de danos ao DNA. Atualmente, é o ensaio mais utilizado em avaliações *in vitro* e ficando em segundo lugar apenas para o ensaio de micronúcleo. A versão *in vivo* do ensaio é uma ferramenta muito útil, pois pode detectar danos ao DNA induzidos por mecanismos secundários, como o estresse oxidativo resultante da inflamação (KOPPEN *et al.*, 2017).

Micronúcleos consistem em fragmentos cromossômicos ou em cromossomos que foram separados dos núcleos principais durante a mitose e isolados dentro de sua própria membrana nuclear. Eles podem surgir espontaneamente devido a erros no reparo do DNA, desregulação cromossômica causada por agentes tóxicos, alterações genéticas no metabolismo do DNA ou podem ser induzidos por agentes químicos, biológicos e físicos em consequência das suas propriedades mutagênicas (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2018).

O ensaio de micronúcleo detecta a perda de fragmentos relativamente grandes de DNA, que após a citocinese se posicionam adjacentes ao núcleo da célula, por meio de corantes de DNA. Em sucessivas divisões celulares, estes fragmentos de DNA podem ser perdidos, levando a instabilidade genética da célula. Durante o ensaio de micronúcleos utiliza-se citocalasina B, que bloqueia a citocinese gerando uma célula binucleada e micronúcleos quando existirem fragmentos de DNA livre (CRISTALDI *et al.*, 2004).

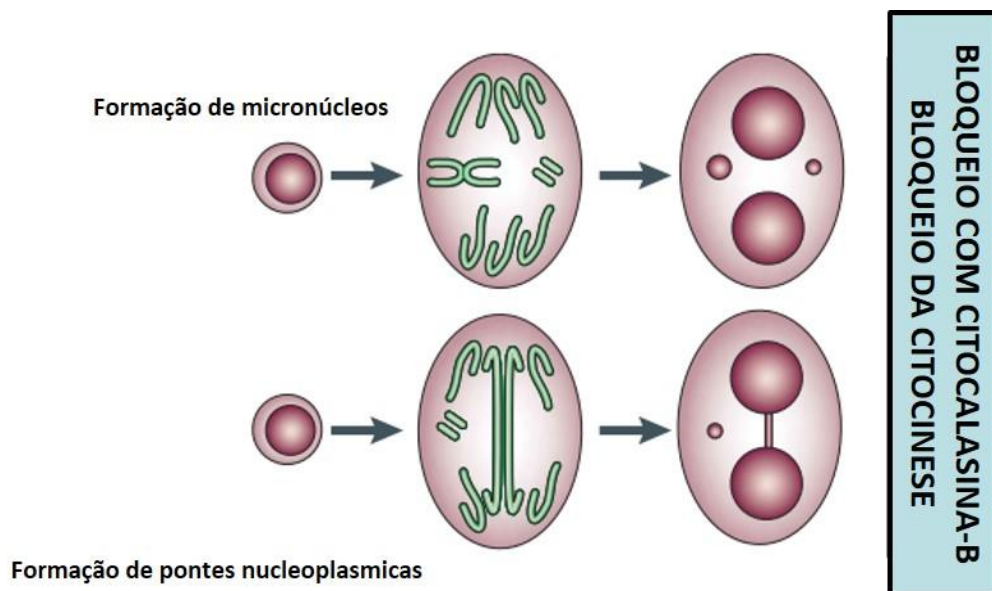
Uma demonstração da formação de micronúcleo pode ser observada nas figuras 5 e 6.

Figura 5: Esquematisação dos eventos responsáveis pela formação de micronúcleos e outros defeitos da citocinese.



Fonte: modificado de ARALDI *et al.*, 2015

Figura 6: Esquema da formação de micronúcleos e ponte anafásica durante o bloqueio da citocinese pela citocalasina B no ensaio de micronúcleo.



Fonte: modificado de Fenech, 2007

O teste de micronúcleo é um importante biomarcador *in vivo* e *in vitro*, amplamente utilizado na epidemiologia molecular e na avaliação de danos citogenéticos em populações expostas a agentes genotóxicos. O termo micronúcleo, também conhecido como corpúsculos de Howell Jolly, se refere a fragmentos acêntricos expelidos do núcleo principal nos estágios finais da anáfase. Os micronúcleos podem ser formados através de dois mecanismos: rupturas de cromossomo (clastogênese) ou interrupção do aparelho mitótico (aneugênese). No entanto, os micronúcleos não apenas representam perdas cromossômicas, mas também o resultado da amplificação do DNA. Amplificação de DNA é comumente observado no processo oncogênico, resultando em cromossomos double minute, que são removidos da célula principal (ARALDI *et al.*, 2015).

Agentes químicos, físicos e biológicos podem ser clastogênicos ou aneugênicos e causar fragmentação ou perda cromossômica quando na divisão celular, e que não são integrados na célula filha, resultando em micronúcleos, estes são envoltos por membrana nuclear durante a telófase e podem ser visualizados no citoplasma da célula. Uma grande quantidade de linfócitos com presença de micronúcleo está relacionado com dano ao material genético (KIRSCH-VOLDERS, 1997).

Um ensaio com sensibilidade maior é o ensaio cometa, complementar ao de micronúcleo, permite quantificar o dano ao DNA. Esse ensaio foi introduzido primeiramente por OSTLING e JOHANSON (1984) e mais tarde modificado por SINGH *et al.*, (1988).

O ensaio cometa permite detectar quebras na molécula de DNA, resultando no aumento do movimento de segmentos livres de DNA durante a eletroforese de célula individual, sendo visualizados imagens semelhantes a cometas, originando assim o nome do ensaio (MARLIN *et al.*, 2004).

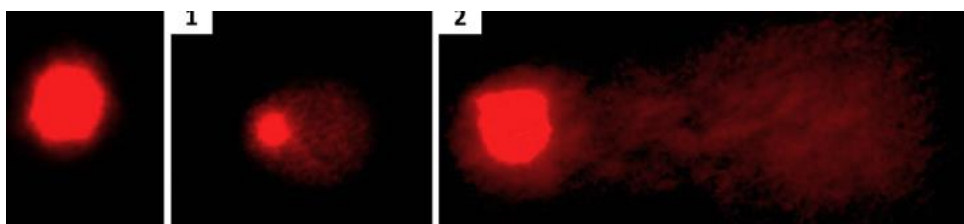
Em relação a cauda do cometa proveniente de quebra de DNA pode se dizer que quanto maior o dano que o DNA sofreu e consequentemente a existência de maior número de fragmentos, maior é a cauda do cometa. Este tamanho permite classificar o dano e gerar um índice para comparação e estatística (HEATON *et al.*, 2002).

Algumas são as vantagens do ensaio de micronúcleo sobre o ensaio cometa, o micronúcleo fala sobre danos nas células mitóticas somente, enquanto que o ensaio cometa fala sobre danos no DNA num todo em células interfásicas e mitóticas. O

micronúcleo analisa mais de 1000 células, enquanto o ensaio cometa apenas 100 células. Mesmo com essa vantagem, a associação de micronúcleo e ensaio cometa é considerado padrão ouro entre os testes mutagênicos, por apresentar alta sensibilidade e poder estatístico. Apesar das diferenças, tanto o ensaio cometa quanto o ensaio de micronúcleo detectam fragmentação do DNA, detectam os eventos de fragmentação do DNA que não foram reparados por algum motivo e em decorrência da instabilidade genética não conseguem perpetuar e, se o fizerem, possivelmente se transformarão a célula, passando a serem consideradas células neoplásicas (ARALDI *et al.*, 2015).

Um exemplo da técnica de ensaio cometa pode ser observado na Figura 7 onde em 1 esta o dano moderado e em 2 dano intenso.

Figura 7: Exemplo de núcleos intactos (cometa classe 0), com degradação (cometa classe 1) e com intensa degradação (cometa classe 2).



Fonte: ARALDI *et al.* (2015).

Estes dois métodos são capazes de detectar danos ao material genético e dimensionar o quanto estas células foram instabilizadas quando na presença de um agente capaz de induzir toxicidade, como por exemplo a *Leishmania sp.* A presença destas alterações em células de animais infectados pode fornecer informação importante sobre outras possíveis complicações, como o desenvolvimento de tumores nesses animais devido ao estado inflamatório crônico (WINKLER *et al.*, 2005).

1.5 Determinação de injúria celular

1.5.1 Lactato deshidrogenase (LDH)

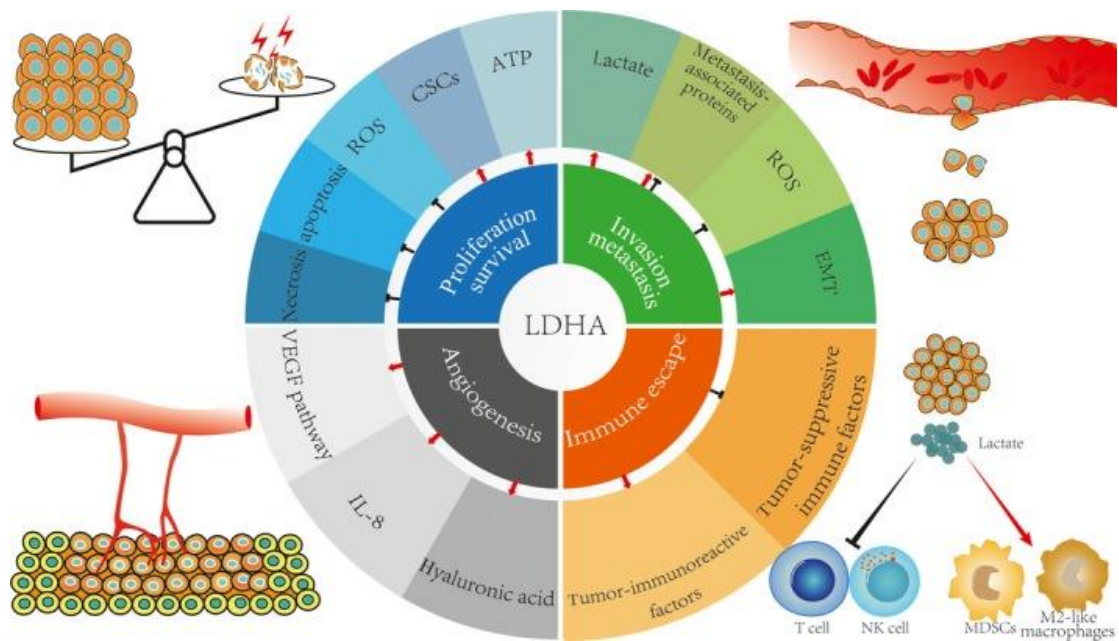
Fisiologicamente, a enzima lactato deshidrogenase (LDH) cataliza a oxidação de piruvato em lactato, sendo que sua atividade é encontrada elevada em diversos tecidos do organismo incluindo a musculatura esquelética, cardíaca, rins, tecido nervoso e fígado (CARDINET III, 1997). Em algumas enfermidades como neoplasias e infecções bacterianas há a utilização anaeróbica da glicose para a obtenção de energia e, desta forma, são esperadas altas concentrações desta enzima que participam de reações existentes nesta via metabólica (NESTOR *et al.*, 2004; OGILVIE, 2000).

A lactato deshidrogenase (LDH), é expressa em cinco isoenzimas, mas é uma enzima glicolítica onipresente que catalisa a etapa final do metabolismo glicolítico, convertendo lactato em piruvato, produzindo energia celular (MARCONATO *et al.*, 2009).

Cada órgão do corpo possui um perfil distinto de isoenzima LDH, com base em suas necessidades metabólicas. As alterações nos padrões de isoenzima tecidual e de fluido corporal podem ser indicativas de dano celular, pois a lesão celular está associada ao vazamento da LDH citoplasmática em espaços e fluidos extracelulares. Como resultado, a atividade sérica do LDH pode ser encontrada alterada em estágios de algumas doenças crônicas que causem injúria celular e pode estar associada a processos carcinogênicos (FENG *et al.*, 2018).

Um esquema da formação do LDH e suas consequências podem ser observados na figura 8.

Figura 8: Relação de aumento ou inibição pela LDH em diversos processos celulares associados à carcinogênese.



Fonte: FENG *et al.*, 2018.

1.6 Justificativa

A infecção por *Leishmania infantum* e suas consequências podem criar um ambiente propício a alterações genéticas em outras células que não as infectadas, propiciando o aumento da instabilidade genética e o desenvolvimento de neoplasias. A utilização de métodos de avaliação do dano ao DNA e injúria celular podem fornecer elementos que configurem causalidade entre a infecção, status inflamatório crônico e danos ao material genético com possível consequente surgimento de complicações do tipo neoplásicas nos animais infectados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar o grau de dano ao DNA em linfócitos de cães infectados por *Leishmania infantum*.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar capacidade mutagênica da *Leishmania infantum* através da técnica de micronúcleo de amostras de cães infectados.

Avaliar capacidade mutagênica da *Leishmania infantum* através da técnica de ensaio cometa de amostras de cães infectados

Determinar os níveis da enzima Lactato desidrogenase (LDH) em soro de cães infectados por *Leishmania infantum*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes

O projeto foi submetido à Comissão de ética (processo 001/2019) no uso de animais da UNILA e os tutores dos animais participantes do estudo assinaram um termo de consentimento. Os cães com diagnóstico de leishmaniose foram recrutados em clínicas veterinárias da cidade de Foz de Iguaçu desde fevereiro de 2019 até outubro de 2019. Foram incluídos no estudo animais com diagnóstico molecular (PCR) para determinar *Leishmania infantum* e imunológico por ensaio de imunoabsorção enzimática e imunofluorescência indireta (ELISA/RiFi) padronizado para *Leishmania infantum* ou ainda citológico de leishmaniose e negativo para outras doenças infecciosas comuns. Levando em consideração as manifestações clínicas da doença, os animais com leishmaniose foram agrupados em assintomáticos, oligosintomáticos e sintomáticos utilizando a classificação de Mancianti *et al.*, 1988. Cães com outras doenças concomitantes, com base em histórico médico completo e exame físico, foram excluídos do estudo. Somente foram incluídos no estudo animais que não foram previamente tratados. Foram coletadas amostras de 4,0 ml de sangue com EDTA para cultura de linfócitos e posterior realização da técnica de micronúcleo, e outra amostra de 0,5 ml de sangue com EDTA para realização do ensaio cometa. Outra alíquota foi utilizada para obter soro e determinar a lactatodesidrogenase (LDH).

Como controle foram recrutados cães clinicamente saudáveis, com idade e distribuição de raça predominante comparável à população de pacientes, a partir de cães de voluntários docentes, técnicos e alunos da UNILA, assim como de cães que compareceram às clínicas veterinárias parceiras para serem vacinados ou para consulta de rotina. Os cães controles foram considerados saudáveis com base na história médica completa e exame físico, e foram excluídos quando apresentaram alguma doença crônica em curso ou histórico de neoplasias. Amostras de sangue foram coletadas desses cães da mesma forma que a descrita para os cães doentes e foram utilizados como cães controle para determinar o grau basal de alterações.

3.2 Coleta de material

Para os experimentos, foram enrolados 36 cães doentes e 5 cães saudáveis controle. As amostras de sangue foram coletadas por meio de venopunção de jugular e imediatamente colocadas em tubo contendo heparina potássica para análise de micronúcleo e também em tubos com EDTA para a realização de ensaio cometa bem como em tubos secos para determinação do LDH. O sangue coletado foi transportado em caixa de transporte térmica para o Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal da Integração Latino Americana (UNILA) e para o laboratório Vetqualis Diagnóstico Veterinário em Foz do Iguaçu, evitando assim eventuais danos derivados do transporte no material genético que pudessem alterar os resultados.

3.3 Ensaio de micronúcleo

Para avaliar a fragmentação ou perda cromossômica em linfócitos foi aplicado o teste de micronúcleo. Para realização do mesmo foi utilizada a metodologia adaptada da proposta por (BACKER *et al.*, 2001; DONMEZ-ALTUNTAS *et al.*, 2006; FENECH, 2007).

As amostras de sangue foram incubadas em tubos de centrífuga de fundo cônico de 15 mL contendo: 4,5 mL de meio RPMI 1640 (Atena Biotecnologia, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 0,5 mL de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), 100 µL de fitohemaglutinina (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) e 200 µL de sangue total. O material foi incubado em estufa de cultura a 37 °C por oito horas. O grupo experimental e o controle negativo foram incubados sem adição de qualquer substância. Ao controle positivo para micronúcleos foi adicionado, após oito horas de incubação, um volume de 1,25 µL da solução de ciclofosfamida monoidrato, na concentração de 50µg/mL, diluída em PBS estéril. Após 44 horas do início do procedimento, as culturas foram tratadas com 6 µL de citocalasina B (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI), diluída em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI), na concentração de 6 µg/mL.

Após 72 horas, as culturas foram incubadas com 10 mL de solução hipotônica de KCl (0,075 M) durante 10 min, depois foram adicionados 0,5 mL do fixador Carnoy (metanol-ácido acético na proporção 3:1) por cinco minutos em temperatura ambiente.

Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 300xg. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado por inversão. O procedimento foi repetido por três vezes. Após a última centrifugação, o material foi aspirado e gotejado em lâminas limpas. As lâminas foram secas em temperatura ambiente, fixadas em metanol absoluto e coradas com corante Giemsa (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil) a 2% diluída em tampão PBS pH 6,8 por oito minutos. O material foi lavado três vezes em água destilada. As lâminas foram analisadas em microscópio binocular (Global Optics, Monte Alto, SP, Brasil) com aumento total de 1.000 X.

Um total de 1.000 células por lâmina foram analisadas, observando-se a frequência de linfócitos binucleados, bem como o número de linfócitos binucleados com micronúcleos e pontes anafásicas. (ARALDI *et al.*, 2015).

3.4 Ensaio cometa

Para semiquantificar o dano ao DNA devido a fragmentação foi realizado o ensaio cometa. Este foi conduzido em condições alcalinas, com pH>13. O protocolo utilizado baseou-se em SINGH *et al.*, (1988). As etapas do ensaio são descritas a seguir.

Pré-preparo das lâminas: Lâminas fosca de 26 X 76 mm foram imersas em bécker contendo solução de agarose de ponto normal de fusão (NMA -*normal melting agarose*, Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI) a 1,5%, diluída em tampão PBS a 60 °C, retiradas e limpas com papel toalha e permaneceram em temperatura ambiente para secagem por 24 h. A concentração de 1,5% de NMA foi estabelecida com base na literatura (ARALDI *et al.*, 2014; AZQUETA *et al.*, 2011; HARTMANN *et al.*, 2003). As amostras de sangue foram fracionadas em alíquotas de 200 µL e distribuídas em tubos de contendo 200µL de meio RPMI 1640. Após este período, os tubos foram centrifugados a 10.200 xg por um minuto e o sobrenadante (plasma) foi descartado. Um volume de 10 µL do material centrifugado foi transferido para tubos de 0,2 mL e acrescido de 75µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMA - *low melting agarose*, Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI) a 37°C. Um volume final de 85 µL da suspensão celular foi aspirada com auxílio de micropipeta e transferido para as lâminas pré-cobertas com NMA a 1,5% e coberto com lamínula. As lâminas foram levadas a geladeira a 4 °C por 20 minutos para a solidificação da agarose LMA. A lamínula foi cuidadosamente

removida e as lâminas foram inseridas em um *copy* contendo solução de lise (71,0 mL da solução estoque de 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI), 10 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI), acrescido de 0,8 mL de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI) e 8,0 mL de DMSO a 4 °C. O *copy* contendo as lâminas foi envolvido por papel alumínio para evitar a exposição a luz e, transferido para a geladeira por uma hora. A partir deste momento, as demais etapas foram realizadas com as luzes do laboratório apagadas para evitar eventuais danos no DNA.

No que se refere a eletroforese, as lâminas foram lavadas em PBS por cinco minutos. O material foi transferido para cuba de eletroforese horizontal, tendo sido adicionado o tampão de eletroforese (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH >13,0). O material permaneceu imerso no tampão por 40 minutos para a remoção das histonas. Após este período, iniciou-se a corrida eletroforética nas seguintes condições: 24 V (0,74 V/cm), 300 mA durante 30 minutos. A cuba eletroforética (Kasvi, São Jose do Pinhais, PR, Brasil) foi revestida por placas de gelo para garantir que o material permanecesse em baixa temperatura durante o processo e a LMA não disolvesse.

Após a eletroforese, o material foi neutralizado em solução neutralizadora (400 mM de Tris-HCl, pH 7,5) por cinco minutos. A neutralização é recomendada para evitar eventuais danos ao DNA (ARALDI *et al.*, 2014).

Análise do material: O material foi corado com 20 µL de iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI) na concentração de 4 µg/mL e analisado em microscópio de fluorescência Nikon 80i (Nikon Instrument Inc., Melville, NY, USA) no aumento total de 400 X. Foram analisados um total de 100 nucleóides por lâmina, os quais foram classificados em: 0 considerado sem danos, 1 com dano intermediário e 2 com dano intenso, conforme a figura 7.

3.5 Determinação de LDH sérico

A determinação da enzima LDH no soro foi determinada com um kit comercial (Labtest LDH liquiform, Vista Alegre, MG, Brasil) através analisador bioquímico semiautomático BIO200S (Bioplus, São Paulo, SP, Brasil) que faz medições espectrofotométricas de absorvância sob condições controladas. Todo o processamento foi feito no comprimento de onda de 340nm. Os resultados foram expressos em U / L (BERGMEYER E GRASSL, 1983).

3.6 Análise estatística

A análise dos dados consistiu na análise descritiva, a partir de tabelas e gráficos utilizando o programa Microsoft Excel® 2010 e *GraphPrism 8.0* (GraphPad Software, La Jolla, Ca. USA). Os testes estatísticos aplicados são descritos para cada ensaio a seguir.

3.6.1 Teste de micronúcleo:

Com base na frequência de linfócitos binucleados com MNs, foi calculada a frequência de formação de micronúcleos (MNR0), de acordo com a seguinte fórmula: $MNR0 = a/b$ onde: a (número de linfócitos binucleados com MN) e b (número total de linfócitos binucleados).

Para comparar a frequência de MNs entre os diferentes grupos, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn, para determinar diferenças significativas entre os grupos. Os testes foram realizados através do software *Graphpad prism 8*, com nível de significância de 5%.

3.6.2 Ensaio cometa:

Com base no número de nucleóides observados por classe, foi obtido o valor do escore por lâmina, conforme a fórmula:

$$\Sigma = [(NC0 \times 0) + (NC1 \times 1) + (NC2 \times 2)]$$

Onde: NC0 é o número de nucleóides observados na classe 0, NC1 é o número de nucleóides observados na classe 1 e NC2 sendo o número de nucleóides observados na classe 2. Com base nos valores de escores obtidos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn, para determinar diferenças significativas entre os grupos. Os testes foram realizados através do software *Graphpad prism 8*, com nível de significância de 5%. A apresentação gráfica foi apresentada por meio de *boxplot*.

3.6.3 Lactato desidrogenase:

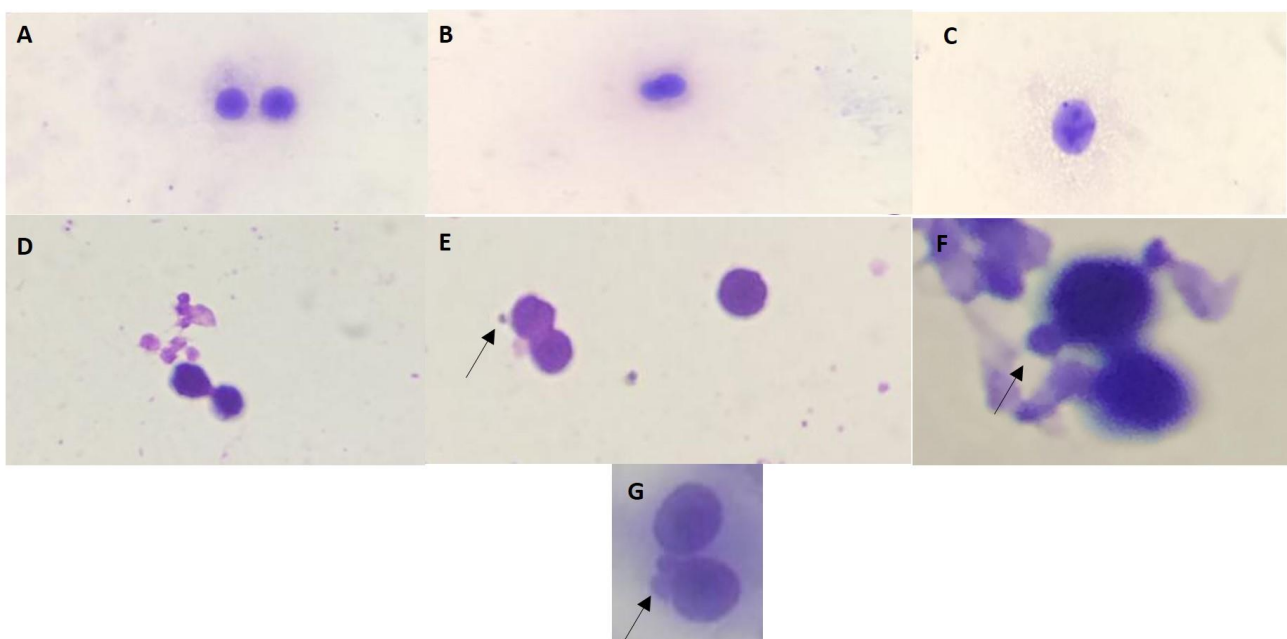
Os dados obtidos foram paramétricos e foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguida do teste pos-hoc de Bonferroni para múltiplas comparações. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Micronúcleo

Um total de 1.000 células foram analisadas por lâmina, observando-se a frequência de linfócitos binucleados, bem como o número de linfócitos binucleados com micronúcleos, e pontes anafásicas. Fotografias representativas das alterações observadas no teste são apresentadas na figura 9.

Figura 9: Fotografias representativas dos micronúcleos observados. Em A e B podem ser observados linfócitos binucleados. Em C linfócito monoclueado. Em D pode ser observada ponte anafásica. Em E, F e G podem ser observados micronúcleos em linfócitos binucleados (assinalados pela seta preta).



Na tabela 1 são apresentados os valores de micronúcleos contabilizados (MN) e sua frequência (MNR0), além das pontes anafásicas (PA) observadas para cada paciente.

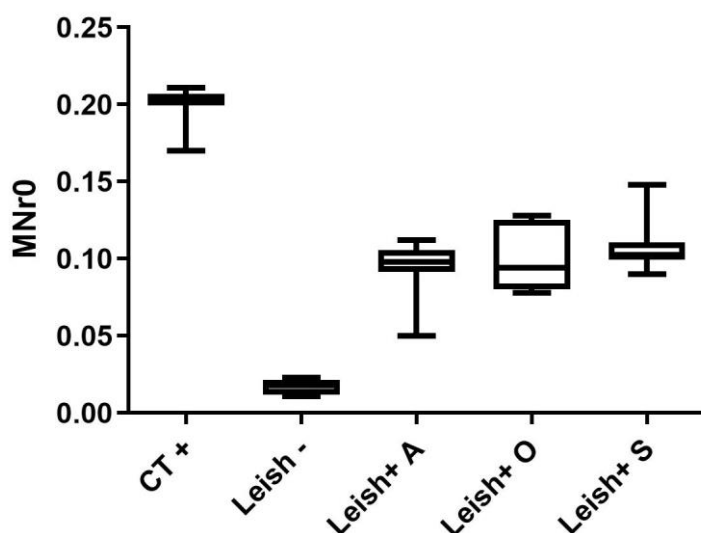
Tabela 1: Frequencia de formação de micronúcleo para cada grupo de pacientes e controles.

Paciente Leish + Asintomático	Linfócitos Binucleados	MN	PA	MNr0	Paciente Leish + Oligosintomático	Linfócitos Binucleados	MN	PA	MNr0	Controle Leish + Sintomáticos	Linfócitos Binucleados	MN	PA	MNr0	Controle Leish - Binucleados	Linfócitos Binucleados	MN	PA	MNr0	Controle + ciclofosfamida	Linfócitos Binucleados	MN	PA	MNr0
1	910	90	8	0,09	5	922	78	15	0,078	6	890	110	0	0,11	37	987	13	0	0,013	37 + CPM	824	174	12	0,211
2	902	98	4	0,098	18	875	125	10	0,125	8	900	100	9	0,1	38	980	20	1	0,02	38 + CPM	855	145	10	0,170
3	892	108	0	0,108	23	907	93	8	0,093	9	901	99	8	0,099	39	977	23	0	0,023	39 + CPM	831	169	15	0,203
4	888	112	5	0,112	26	920	80	8	0,08	10	894	106	9	0,106	40	989	11	0	0,011					
7	950	50	10	0,05	27	872	128	10	0,128	14	905	95	9	0,095	41	982	18	1	0,018					
11	890	110	6	0,11	28	900	100	12	0,1	16	900	100	15	0,1										
12	889	111	8	0,111	29	906	94	12	0,094	19	889	111	11	0,111										
13	903	97	8	0,097						21	910	90	5	0,09										
15	909	91	12	0,091						24	895	105	4	0,105										
17	901	99	13	0,099						30	870	130	11	0,13										
20	912	88	8	0,088						34	852	148	4	0,148										
22	908	92	5	0,092						35	900	100	5	0,1										
25	900	100	6	0,1																				
31	906	94	10	0,094																				
32	899	101	8	0,101																				
33	897	103	7	0,103																				
36	905	95	0	0,095																				

MN: micronúcleo; PA: ponte anafásica; MNr0: frequência de formação de MN

No gráfico 1 são apresentadas as frequências de micronúcleos dos animais com leishmaniose e os animais saudáveis. No teste de Kruskal-Wallis foi encontrada diferença estatisticamente significativa com $p < 0,0001$. No teste de múltiplas comparações de Dunn foram encontradas diferenças entre os grupos e estas, são apresentadas na tabela 2.

Gráfico 1: Frequência de micronúcleos em animais com leishmaniose (Leish+), animais saudáveis (Leish -) e controle + tratado com ciclofosfamida.



CT: animal Leish- tratado com ciclofosfamida; Leish- : animal controle com teste negativo para Leishmaniose; Leish + A: Animal com leishmaniose assintomático; Leish + O: Animal com leishmaniose oligoassintomático e Leish+ S: Animal com leishmaniose sintomático.

Tabela 2: comparação entre grupos no teste de Dunn.

Teste de Dunn	Significancia	p
CT + vs. Leish -	Sim	0,005
CT + vs. Leish+ A	Não	ns
CT + vs. Leish+ O	Não	ns
CT + vs. Leish+ S	Não	ns
Leish - vs. Leish+ A	Sim	0,05
Leish - vs. Leish+ O	Não	ns
Leish - vs. Leish+ S	Sim	0,01
Leish+ A vs. Leish+ O	Não	ns
Leish+ A vs. Leish+ S	Não	ns
Leish+ O vs. Leish+ S	Não	ns

CT: animal Leish- tratado com ciclofosfamida; Leish- : animal controle com teste negativo para Leishmaniose; Leish + A: Animal com leishmaniose assintomático; Leish + O: Animal com leishmaniose oligoassintomático e Leish+ S: Animal com leishmaniose sintomático.

4.2 Ensaio cometa

As lâminas com os cometas foram observadas e registradas em microscópio de fluorescência. Podem se observar fotografias representativas do ensaio cometa na figura 10.

Figura 10: Cometas encontrados em amostras de cães infectados com *Leishmania infantum*. Em A cometa com dano 1, em B e D cometas sem danos, em C cometa com dano 2.

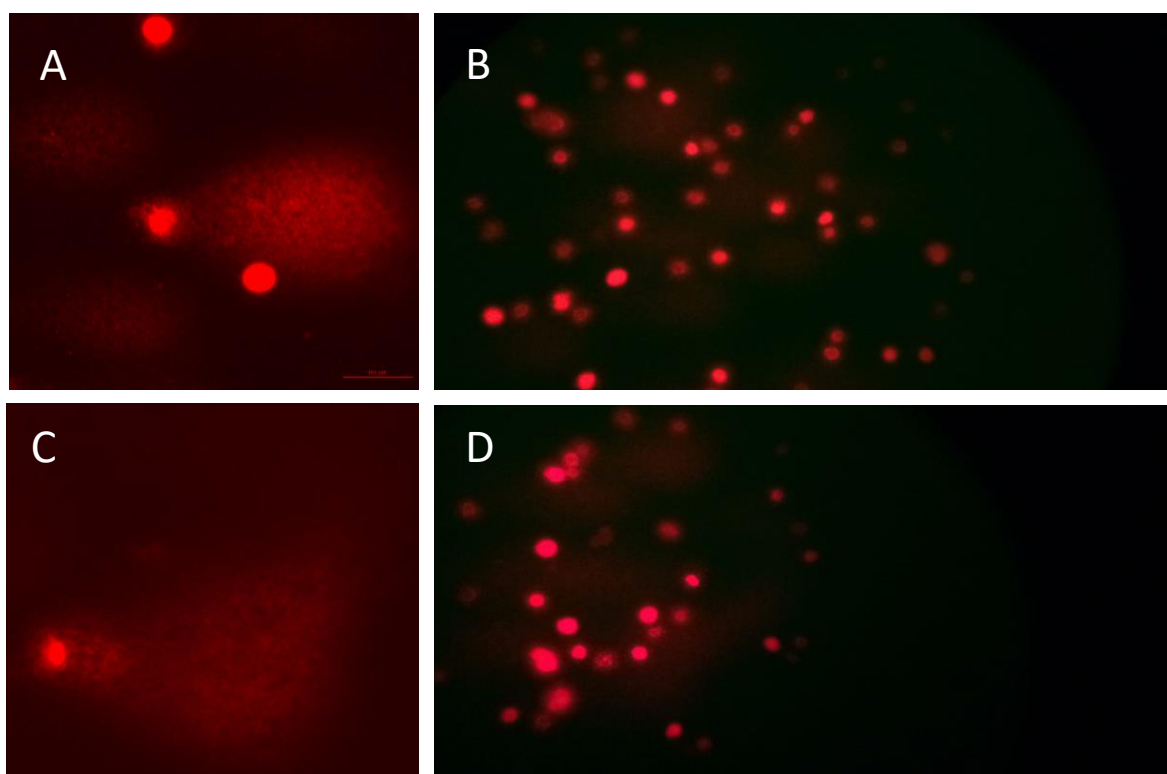
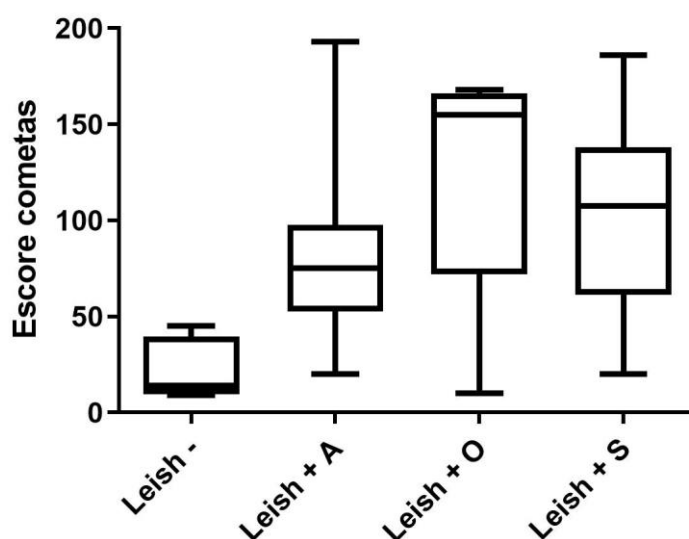


Gráfico 2: Escore dos cometas encontrados.

Leish- : animal controle com teste negativo para Leishmaniose; Leish + A: Animal com leishmaniose assintomático; Leish + O: Animal com leishmaniose oligoassintomático e Leish+ S: Animal com leishmaniose sintomático.

Tabela 4: comparação entre grupos no teste de Dunn dos dados do ensaio cometa.

Teste de Dunn	Significancia	p
Leish - vs. Leish+ A	Não	ns
Leish - vs. Leish+ O	Sim	0,01
Leish - vs. Leish+ S	Sim	0,01
Leish+ A vs. Leish+ O	Não	ns
Leish+ A vs. Leish+ S	Não	ns
Leish+ O vs. Leish+ S	Não	ns

Leish- : animal controle com teste negativo para Leishmaniose; Leish + A: Animal com leishmaniose assintomático; Leish + O: Animal com leishmaniose oligoassintomático e Leish+ S: Animal com leishmaniose sintomático.

4.3 LDH

As mensurações de LDH séricas foram feitas através de bioquímica por fotometria e os resultados apresentados na tabela 5.

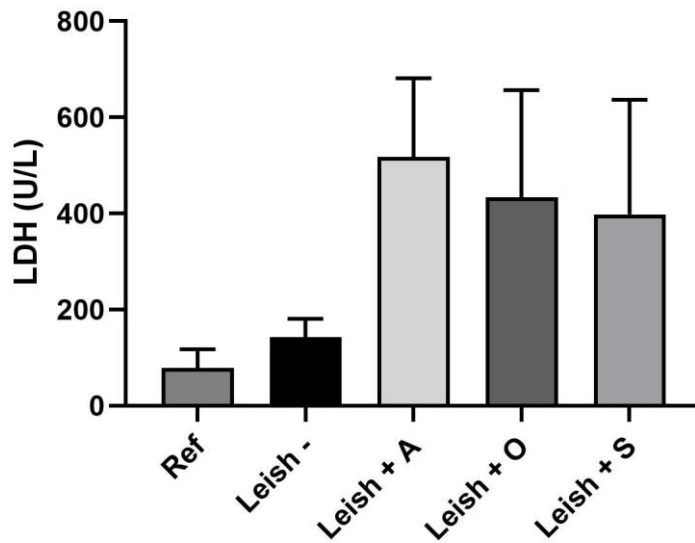
Tabela 5: Valores da enzima lactato deshidrogenase sérica (LDH) expressada em U/L.

Grupo	Valor médio LDH (U/L)	Desvio Padrão	n
Leish -	142,80	37,94	5
Referência	78,90	39,00	41
Leish + Assintomático	517,53	164,31	17
Leish + Oligossintomático	433,43	223,65	7
Leish + Sintomático	398,33	238,38	12

Valores de referência da LDH obtidos de KOPANKE; CHEN; BRUNE; BRENNAN *et al.* (2018)

Os resultados estatísticos de múltiplas comparações de Bonferroni são apresentados no gráfico 3 e na tabela 6.

Gráfico 3: Análise estatístico comparando os valores de LDH sérica.



Ref: Valores de referência da LDH obtidos de KOPANKE; CHEN; BRUNE; BRENNAN *et al.* (2018); Leish- : animal controle com teste negativo para Leishmaniose; Leish + A: Animal com leishmaniose assintomático; Leish + O: Animal com leishmaniose oligoassintomático e Leish+ S: Animal com leishmaniose sintomático.

Tabela 6: Valores do teste de Bonferroni para múltiplas comparações.

Teste de Bonferroni	Significancia	p
Leish - vs. Leish- A	Sim	0,001
Leish - vs. Leish- O	Sim	0,01
Leish - vs. Leish- S	Sim	0,01
Leish - vs. Ref	Não	ns
Leish- A vs. Leish- O	Não	ns
Leish- A vs. Leish- S	Não	ns
Leish- A vs. Ref	Sim	0,001
Leish- O vs. Leish- S	Não	ns
Leish- O vs. Ref	Sim	0,001
Leish- S vs. Ref	Sim	0,001

5. DISCUSSÃO

A cidade de Foz do Iguaçu é uma região endêmica para *Leishmania infantum* e apresenta grande quantidade de novos casos em cães diariamente (THOMAZ *et al.*, 2017). Sendo assim, torna-se de grande relevância obter uma melhor compreensão dos mecanismos que levam a doença à sua forma grave e determinar potenciais comorbidades importantes causadas por esta infecção. Nesse contexto salientamos desde já a importância deste estudo que mostra através dos resultados estatísticos que existe uma relação entre a infecção por *Leishmania infantum* e alterações clastogênicas.

Baseado em estudos com cães infectados com *Leishmania* e com sintomatologia variada (assintomáticos, oligossintomáticos e polisintomáticos), ficou demonstrado que cães assintomáticos podem representar fonte de infecção para os flebotomíneos (GUARGA *et al.*, 2000; MOLINA *et al.*, 1994). Diante dessa classificação e juntamente com nossos achados podemos debater o nível de clastogênese desses animais perante sua atividade antiinflamatória diante da infecção de correlacionar esses dados com as possíveis alterações mutagênicas de cada grupo de acordo com a sintomatologia. Nossos resultados mostram que cães infectados com sintomas apresentam níveis mais elevados de LDH sérica ($517,5 \pm 164,3$ U / L, $n = 17$) quando comparados a cães oligossintomáticos ($433,4 \pm 223,6$ U / L, $n = 7$), sintomáticos ($398,3 \pm 238,3$ U / L, $n = 12$) ou cães saudáveis ($142,38 \pm 37,94$ U / L, $n = 5$). O maior nível de dano ao DNA foi encontrado em cães com infecção sintomatológica, conforme demonstrado pelo teste do micronúcleo e pelo teste do cometa. Foram encontradas diferenças estatísticas entre os animais oligossintomáticos e sintomáticos em comparação com cães saudáveis.

Segundo *guideline* publicado por SOLANO-GALLEGO *et al.* (2009) fica claro que a leishmaniose é uma doença de caráter crônico capaz de causar sintomas muito variados nos animais ou até mesmo ser assintomática durante muito tempo. Órgãos linfoides são o alvo do parasita após escapar dos macrófagos e da resposta imune e ganhar a circulação sanguínea, após isso se dá então o início da variabilidade dos sintomas clínicos ou doença subclínica.

As infecções crônicas causadas por agentes biológicos contribuem com aproximadamente 20% das causas de câncer mundialmente, acredita-se que essa fração possa sofrer variações de acordo com as regiões, status social e patógenos endêmicos (SAITO *et al.*, 2015). Diante disso podemos inferir que é de suma

importância estabelecer essa relação entre a doença infecciosa de caráter crônico e a possível relação destas com regiões endêmicas, no caso do nosso estudo a leishmaniose, e estabelecer assim diagnóstico precoce e sugerir motivos para melhorias às autoridades, comunidades e tutores de animais, em relação à prevenção da infecção.

Há muito tempo atrás foi sugerido por Rudolf Virchow que tumores tendem a surgir em sítios de inflamação. A relação entre inflamação e câncer vem sendo confirmada por numerosas observações epidemiológicas de associação entre condições inflamatórias crônicas e o desenvolvimento de neoplasias (SAITO *et al.*, 2015).

A inflamação além de ser ineficiente em alguns casos pode se tornar um agente iniciador e promotor da carcinogênese (GRETEN E GRIVENNIKOV, 2019; MORGILLO *et al.*, 2018; OKADA, 2014). Enquanto a inflamação aguda atua na regressão do tumor através de células “antitumorais” como as Natural Killer (NK) e linfócitos T citotóxicos; a não resolução do caso e consequente inflamação crônica podem promover carcinogênese através do estresse oxidativo mediado por TNF-alfa (fator de necrose tumoral), interleucinas, interferons, macrófagos e esses em conjunto produzir espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS) capazes de gerar quebras na fita de DNA (SCHWING *et al.*, 2019).

È relatado por SOLANO-GALLEGO *et al.*, (2016) que a leishmaniose é uma doença que pode evoluir para um estatus de cronicidade, capaz de causar uma variabilidade de sintomas e sinais que podem ser observados através de exames clínicos e laboratoriais, alterações como leucocitose ou leucopenia por exaustão medular são observadas, níveis elevados de LDH, proteína C reativa e fobrinogênio, anemia normocítica normocrômica característica da inflamação crônica.

A instabilidade genômica desencadeada por essa condição aumenta a taxa de mutações no genoma do hospedeiro, o reparo do DNA fica prejudicado nesses tecidos inflamados o que aumenta o risco de um evento carcinogênico. O reparo de bases mal pareadas é inibido por moléculas de óxido de nitrogênio (NO) e por H1F-1 α , este último induzido por TNF- β , IL-1 e prostaglandina E2 produzidos durante a inflamação. Essas moléculas disparam vias de sinalização que podem culminar em hipermetilação dos promotores de genes que codificam proteínas de reparo e na sua regulação transcricional (MORRISON, 2012).

CHISTI *et al.*, (2016) relatou a leishmaniose cutânea como causadora de carcinomas, vale ressaltar que o tecido que está sob condição de inflamação crônica, visto que a *Leishmania* é capaz de causar inflamação importante na pele, é caracterizado por alta taxa de proliferação celular a fim de que esse tecido seja reparado mas essa proliferação persistente aumenta a taxa de mutações aleatórias desencadeadas pelo estresse oxidativo, além de poder perpetuar o dano ao genoma celular.

Diferentes relatos na literatura associaram a carga parasitária em diferentes tecidos com a resposta imune do hospedeiro, avaliando os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias. Existe um consenso de que uma resposta mista Th1 / Th2 é observada no momento da detecção de uma infecção por *Leishmania sp.*, apesar da prevalência de um perfil Th2. Mais tarde na infecção, quando a carga do parasita diminui, por exemplo como resultado do tratamento, o perfil Th1 se torna predominante. Assim um espectro de respostas imunes inatas e adquiridas a infecção é montada pelo hospedeiro canino. Os dois extremos opostos desse espectro são a pro-imunidade mediada por células T e a suscetibilidade a doença associada a uma resposta imune humoral não protetora e depressão de células relacionadas com a imunidade (BANETH *et al.*, 2008).

Morrisom em 2012, relatou vários tipos de câncer em animais que podem estar associados com inflamação crônica, dentre eles, vírus, bactérias e até mesmo um parasita, o *Spirocerca Lupi*. Ele cita que mediadores inflamatórios como citocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, prostaglandinas, e fatores de crescimento são capazes de iniciar mutações no DNA, com isso as células podem passar por processos de interrupção de função em locais de grande importância do material genético que podem ser os responsáveis pela homeostase celular. A iniciação com a presença de mutações permanentes são condição ideais para o desenvolvimento do câncer (MORRISON, 2012).

Em se tratando de responsabilidade da imunidade celular, baseado em testes *in vitro* e *in vivo*, é amplamente aceito que os macrófagos desempenham um papel central no controle da infecção por *Leishmania sp.* Citocinas como interferon-gamma (IFN- γ), IL-2 e fator de necrose tumoral (TNF- α) secretado por células T induzem a atividade anti-leishmania de macrófagos. Esta atividade é mediada pela ação do óxido nítrico (NO), que é considerada a principal molécula efetora produzido por macrófagos, e induz a morte intracelular das formas amastigotas por apoptose. As células do baço

de cães infectados mostraram expressão predominante de IL-10, que foi positivamente correlacionado com carga parasitária e gravidade do quadro clínico. A IL-10 é considerada um regulador da atividade Th1 que mantém o equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 e inibe a atividade microbicida dos macrófagos infectados (PAPADOGIANNAKIS E KOUTINAS, 2015).

Segundo KOCYIGIT *et al.* (2005), como primeira linha de defesa durante a fagocitose na infecção por *Leishmania sp.*, macrófagos geram espécies reativas de oxigênio como ROS e RNS. A infecção e a inflamação ativam uma variedade de células inflamatórias que induzem e ativam cascatas inflamatórias com várias enzimas geradoras de moléculas oxidantes, como a NADPH oxidase, a óxido nítrico sintase inducível, a mieloperoxidase e a eosinófilo peroxidase. A indução e ativação dessas enzimas nas células inflamatórias também são estimuladas por muitas citocinas pró-inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral alfa, interleucina-1, IL-6 e outras. A produção exacerbada dessas citocinas induzem altas concentrações de vários radicais livres e oxidantes diferentes, incluindo o ânion superóxido, óxido nítrico, nitroxil, nitrogênio dióxido, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Esses oxidantes reagem entre si para produzir outras espécies reativas que são ainda mais oxidantes. ROS e RNS são produzidos principalmente atacar agentes infecciosos invasores e corpos estranhos por nitração, oxidação e cloração. Contudo, quantidades excessivas dessas espécies reativas em tecidos inflamados podem causar a depleção de antioxidante reativo total (TAR), lesão nas células hospedeiras e induzir danos e mutações no DNA alterando a estrutura e função proteica. E neste ambiente oxidativo, o DNA pode sofrer danos facilmente, e assim acumular mutações.

Diante do exposto anteriormente, sobre as vias de imunidade que são ativadas quando a infecção por *Leishmania infantum* está presente e suas consequências como produção de espécies reativas de oxigênio, foi a linha principal de pesquisa deste estudo que visa demonstrar através de testes citogênicos já consagrados na literatura, a instabilidade genética causada pela infecção.

É sabido que mesmo antes da descrição completa da molécula de DNA, já era evidente que agentes químicos, físicos e biológicos podiam interagir com material genético resultando em mutações, o que está associado com instabilidade genética e câncer. Encontram-se relatos na literatura indicando uma possível associação da leishmaniose e doenças oncológicas, porém ainda não tem sido demonstrado a associação de ambas nem mostrado quais os mecanismos subjacentes a este

possível efeito carcinogênico. Foi relatado inicialmente por KOPTERIDES *et al.* (2007) e posteriormente por MASROUR-ROUDSARI e EBRAHIMPOUR (2017), a leishmaniose como um parasita potencial causador de câncer como por exemplo de carcinomas e linfomas. Agentes biológicos têm sido bastante estudados nas últimas décadas na sua relação sobre a carcinogênese, e após muitos anos conseguiu-se demonstrar que alguns agentes infecciosos, como vírus e bactérias por exemplo, têm seu papel na oncogênese, como exemplo podemos citar o vírus do HPV em humanos, o vírus da hepatite C como maior causador de carcinomas hepáticos (SAITO *et al.*, 2015) e diversos outros trabalhos tem demonstrado a associação entre os agentes infecciosos associados ao desenvolvimento do câncer podemos citar o trabalho publicado por Weiss em 2010 e Cristo em 2019 relatando o caso da leucemia felina causada pelo vírus (Felv) os tumores benignos e malignos provocados pelo papiloma vírus em animais e humanos (ARALDI *et al.*, 2013; CRISTO *et al.*, 2019; WEISS *et al.*, 2010) o câncer de estômago provocado pela bactéria *H. Pylori* (MASROUR-ROUDSARI E EBRAHIMPOUR, 2017; SAITO *et al.*, 2015).

Demonstrar que um determinado agente biológico é carcinogênico não é uma tarefa simples devido principalmente a que este potencial é relacionado à infecção crônica e pode se alastrar por anos, incluso pela dependência do estado imune do animal infectado. Sabe-se que pacientes com doença primária e secundária que causam imunodeficiências são mais suscetíveis à doença linfoproliferativa como por exemplo doença relacionada ao vírus *Epstein-Barr* (EBV-LPD) ou até mesmo ao HIV (SAITO *et al.*, 2015)

O objetivo deste trabalho foi demonstrar através de testes mutagênicos a capacidade da infecção por *Leishmania infantum* ser capaz de iniciar esse processo, mas é claro que sabemos que o câncer é uma doença multifatorial e que a mutagênese é apenas o primeiro passo no processo oncogênico. Essa relação citada pelos autores acima pode ser vislumbrada ao fazer a leitura do nosso texto mas cabe salientar que nosso trabalho demonstra a capacidade mutagênica em si apenas.

Nos foi possível observar, além disso, que existe grande dano celular nesses animais infectados por *Leishmania infantum* tendo em vista os altos níveis da enzima LDH sérica. Embora não possamos, com os dados obtidos, demonstrar que este aumento esteja sendo induzido diretamente pelo parasita, podemos observar claramente que existe um ambiente inflamatório nesses animais.

Para determinar se este ambiente era propício ao dano ao DNA, utilizamos o teste de micronúcleo e o ensaio cometa e estes tem sido largamente usado para estabelecer conexão entre agentes infecciosos e o processo mutagênico. Trabalhos antigos, completos e bem-conceituados com grande importância no meio acadêmico, como o de Singh (SINGH *et al.*, 1988) e Fenech (FENECH, 2007), popularizaram estas técnicas e são até os tempos empregadas para demonstrar agentes infecciosos, químicos ou físicos no processo mutacional e oncogênico. Portanto o ensaio cometa e o ensaio de micronúcleo juntos permitem detectar substâncias aneugênicas e clastogênicas com alta sensibilidade e poder estatístico.

MARLIN *et al.* (2004) escreveram que a maioria dos estudos com o teste ensaio cometa tem sido feitos em laboratórios que usam amostras de humanos ou animais de laboratório, existem poucos estudos usando o ensaio cometa com animais de companhia. Heaton e colaboradores descreveram a aplicação da técnica em linfócitos de cães e gatos. Nosso estudo é o único até o presente momento usando está técnica bem como o ensaio micronúcleo em cães e correlacionando com a leishmaniose (HEATON *et al.*, 2002).

Em relação aos nossos resultados, podemos compara-los para uma maior compreensão, com a medicina humana onde ensaios de mutagênese são realizados como padrão para determinar toxicidade de drogas bem como de agentes infecciosos. Neste trabalho pudemos observar que os resultados dos testes demostram com clareza que os animais infectados tiveram alterações importantes em seu material genético, o que não foi visto no grupo controle com animais saudáveis. Isto é relevante pois mostra que comorbidades importantes acontecem nesses cães e não são doenças paralelas e sim correlacionadas, são consequência da cronicidade do processo.

Sabendo que o status mutagênico de um microambiente é um passo do processo oncogênico podemos dizer que os pacientes infectados deram o primeiro passo em relação à doença neoplásica associada a leishmaniose sendo está uma doença de caráter inflamatório e consequentemente capaz de induzir mutagênese (SAITO *et al.*, 2015).

Segundo KOCYIGIT *et al.* (2005) em um estudo na medicina humana com leishmaniose cutânea, sendo essa uma doença infecciosa e inflamatória de caráter crônico, torna-se um local predisponente ao câncer. No entanto, os mecanismos de carcinogênese associados à infecção e inflamação não foram totalmente elucidados.

Três mecanismos principais podem ser levados em consideração sobre seu efeito na carcinogênese: ação direta do agente infeccioso sobre células ou tecidos hospedeiros, imunossupressão e produção de ROS e RNS. Ambos diretos (integração de DNA viral no genoma do hospedeiro) e indireto (ativação de células inflamatórias e envolvimento de genes ou outros fatores do hospedeiro). Estes mecanismos podem cooperar para induzir câncer em muitos casos de infecção e inflamação com câncer associado.

Contudo no nosso estudo não foi possível a realização de aferição de espécies reativas de oxigênio, sendo assim podemos deixar a lacuna a ser preenchida por novos estudos na medicina veterinária que se complementem a esse e esclareça se as vias que podem estar envolvidas na quebra desse material genético causado pela infecção por *Leishmania infantum* elucidado por esse trabalho, são causadas pelas vias de produção de ROS e RNS.

Durante as décadas de 1960 e 1970, uma das perguntas mais no debate sobre a correlação entre carcinogenicidade e mutagenicidade foi, que tipo de mutação genética é mais provável resultar em câncer? Em 1969, foi declarado como sendo as substituições de pares de bases sendo os candidatos mais prováveis a desempenhar um papel dominante no início da formação de tumores. Existe uma evidência geral que está inclinando a substituições de pares de bases e alterações cromossômicas como o início predominante dos eventos. No entanto, mutações de deslocamento foram relatadas como estarem iniciando eventos em certos tipos de câncer através do truncamento da síntese de proteínas (VALARMATHI *et al.*, 2004). Recentemente, uma compilação de dados e profunda discussão dos aspectos da associação entre leishmaniose e desordens malignas em seres humanos foram estabelecidos quatro diferentes tipos de associação: 1) leishmaniose mimetizando uma doença maligna, tal como linfoma; 2) ocorrência da leishmaniose dificultando o diagnóstico e o tratamento em pacientes tratados com quimioterapia para distúrbios malignos; 3) diagnóstico simultâneo de leishmaniose e processo neoplásico na mesma amostra de tecido em pacientes imunologicamente comprometidos 4) envolvimento direto da *Leishmania infantum* na patogênese de lesões neoplásicas malignas, especialmente, na pele e membranas mucosas. No estudo, os autores concluíram que a leishmaniose pode afetar direta ou indiretamente a apresentação, o diagnóstico e a evolução de várias doenças malignas e que, em áreas endêmicas a leishmaniose deve ser considerada como diagnóstico diferencial de doenças malignas (KOPTERIDES *et al.*, 2007).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO) a leishmaniose é uma zoonose que tem se disseminado para áreas antes consideradas impensadas, o Brasil é endêmico em muitas regiões. Ainda a mesma instituição relata que o câncer é umas das doenças que mais mata no mundo. Um bom esclarecimento da epidemiologia de ambas pode contribuir com a prevenção e sendo assim ver diminuir esses altos índices. Podemos estender esses conceitos para a medicina veterinária, visto que, diante de vários relatos citados, doenças infecciosas estão relacionadas com neoplasmas e atualmente os animais tem aumentado sua expectativa de vida e sendo um ser senciente capaz de sentir e interagir, nós profissionais da saúde temos por obrigação diminuir esses indicativos através do conhecimento da doença e sabendo das consequências investir na conscientização e prevenção.

6. CONDISERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a infecção por *Leishmania infantum* está associada a um aumento do dano ao DNA de linfócitos do sangue periférico. A partir da alta taxa destes eventos pode se inferir que exista uma taxa elevada de mutagênese nas células de cães infectados e um estado inflamatório crônico. Isso demonstra que devemos continuar a estudar a participação deste parasita na patogênia de processos neoplásicos de animais infectados. Do ponto de vista clínico, os resultados apresentados ganham relevância, visto que, Foz do Iguaçu é uma cidade endemêmica. Os testes mutagênicos realizados com sangue periférico no experimento, nunca antes feito com este agente infeccioso em cães, mostram que a *Leishmania infantum* apresenta uma ação mutagênica, podendo levar tanto a iniciação neoplásica, como contribuir com a heterogeneidade genética do micro-ambiente tumoral.

Os resultados obtidos com amostra de sangue periférico de 45 cães infectados bem como os controles, mostram que a infecção pelo parasita *Leishmania infantum* em cães é capaz de produzir um ambiente de estresse celular e inflamação crônica capaz de induzir instabilidade de material genético gerando mutações.

A dosagem de LDH sérico fornecem informação de injúria celular importante nesses cães. Embora ainda seja necessária complementação de estudos em relação ao LDH, mediadores da inflamação e substâncias advindas desse evento como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e outros oxidantes, que muitos estudos mostram que podem ter participação no processo de mutação e carcinogênese,

Um grande número de agentes infecciosos tem sido descrito e identificado como causadores ou colaboradores para o desenvolvimento de câncer em humanos e animais. Portanto, entender esses fatores e a interação deles com o câncer para que sejam melhor estabelecidos e tratados. Nesse sentido, o vasto cenário de doenças infecciosas e surgimentos de neoplasias relacionadas abre um caminho a ser explorado para pesquisa buscando esclarecimentos, diagnóstico precoce, tratamento e até mesmo prevenção. Na medicina veterinária algumas relações entre agentes infecciosos e sua relação com o câncer estão bem estabelecidas outras ainda como a leishmaniose necessita de estudos complementares.

A cidade de Foz do Iguaçu é uma região endêmica onde cães infectados morrem espontaneamente por insucesso no tratamento ou são eutanasiados, alguns deles com doenças neoplásicas com estadiamento avançado, nesse contexto podemos concluir diante desse trabalho, que mostrou através de ensaios de mutagênese, que esse processo foi iniciado nesses cães infectados e que esta relação precisa ser melhor estudada e esclarecida.

7. REFÊRENCIAS

- ABAJO, P.; BUEZO, G. F.; FRAGA, J.; SANZ, J. *et al.* Leishmaniasis and Kaposi's sarcoma in an HIV-infected patient. **Am J Dermatopathol**, 19, n. 1, p. 101-103, Feb 1997.
- ABEYSINGHE, S. S.; CHUZHANOVA, N.; KRAWCZAK, M.; BALL, E. V. *et al.* Translocation and gross deletion breakpoints in human inherited disease and cancer I: Nucleotide composition and recombination-associated motifs. **Hum Mutat**, 22, n. 3, p. 229-244, Sep 2003.
- AGUT, A.; CORZO, N.; MURCIANO, J.; LAREDO, F. G. *et al.* Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. **Vet Rec**, 153, n. 21, p. 648-652, Nov 22 2003.
- ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J. *et al.* Canine leishmaniasis. **Adv Parasitol**, 57, p. 1-88, 2004.
- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitol**, 22, n. 12, p. 552-557, Dec 2006.
- ARALDI, R. P. Linhagens celulares derivadas de cultivos primários de neoplasias infectadas pelo BPV como modelo de estudo da transição epitélio-mesênquima. **Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo,, p. 372, 2017.**
- ARALDI, R. P.; DE MELO, T. C.; MENDES, T. B.; DE SA JUNIOR, P. L. *et al.* Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomed Pharmacother**, 72, p. 74-82, May 2015.
- ARALDI, R. P.; MELO, T. C.; DINIZ, N.; MAZZUCHELLI-DE-SOUZA, J. *et al.* Bovine papillomavirus clastogenic effect analyzed in comet assay. **Biomed Res Int**, 2013, p. 630683, 2013.
- ARALDI, R. P.; RECHIUTTI, B. M.; MENDES, T. B.; ITO, E. T. *et al.* Mutagenic potential of Cordia ecalyculata alone and in association with Spirulina maxima for their evaluation as candidate anti-obesity drugs. **Genet Mol Res**, 13, n. 3, p. 5207-5220, Jul 7 2014.
- AZQUETA, A.; GUTZKOW, K. B.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A. R. Towards a more reliable comet assay: optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. **Mutat Res**, 724, n. 1-2, p. 41-45, Sep 18 2011.
- BACKER, L. C.; GRINDEM, C. B.; CORBETT, W. T.; CULLINS, L. *et al.* Pet dogs as sentinels for environmental contamination. **Sci Total Environ**, 274, n. 1-3, p. 161-169, Jul 2 2001.
- BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, 357, n. 9255, p. 539-545, Feb 17 2001.
- BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P. *et al.* Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol**, 24, n. 7, p. 324-330, Jul 2008.

- BARBOSA, M. A.; ALEXANDRE-PIRES, G.; SOARES-CLEMENTE, M.; MARQUES, C. *et al.* Cytokine gene expression in the tissues of dogs infected by *Leishmania infantum*. **J Comp Pathol**, 145, n. 4, p. 336-344, Nov 2011.
- BERGMEYER, J.; GRASSL, M. Methods of enzymatic analysis (3rd Edn), Vol. I. 118-125 p. 1983.
- BOCANETI, F.; ALTAMURA, G.; CORTEGGIO, A.; VELESCU, E. *et al.* Bovine Papillomavirus: New Insights into an Old Disease. **Transbound Emerg Dis**, 63, n. 1, p. 14-23, Feb 2016.
- BOUTROS, N.; HAWKINS, D.; NELSON, M.; LAMPERT, I. A. *et al.* Burkitt lymphoma and Leishmaniasis in the same tissue sample in an AIDS patient. **Histopathology**, 48, n. 7, p. 880-881, Jun 2006.
- BRANDONISIO, O.; SPINELLI, R.; PEPE, M. Dendritic cells in *Leishmania* infection. **Microbes Infect**, 6, n. 15, p. 1402-1409, Dec 2004.
- CARDINET III, G. H. Skeletal muscle function. . In: **KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical biochemistry of domestic animals 5.ed. San Diego: Academic, 1997, 1997.**
- CHISTI, M.; ALMASRI, R.; HAMADAH, I. Is cutaneous leishmaniasis a risk factor for basal cell carcinoma? **Gulf J Oncolog**, 1, n. 21, p. 64-66, May 2016.
- CRISTALDI, M.; ANNA IERADI, L.; UDROIU, I.; ZILLI, R. Comparative evaluation of background micronucleus frequencies in domestic mammals. **Mutat Res**, 559, n. 1-2, p. 1-9, Apr 11 2004.
- CRISTO, T. G.; BIEZUS, G.; NORONHA, L. F.; GASPAR, T. *et al.* Feline Leukaemia Virus Associated with Leukaemia in Cats in Santa Catarina, Brazil. **J Comp Pathol**, 170, p. 10-21, Jul 2019.
- DAMANIA, B. A Virological Perspective on Cancer. **PLoS Pathog**, 12, n. 2, p. e1005326, Feb 2016.
- DELVES, P. J.; MARTIN, S. J.; BURTON, D. R.; ROITT, I. M. **Roitt's essential immunology**. 13th edition. ed. 2013. p. p., text. 9781118415771 (pbk.).
- DO NASCIMENTO, P. R.; MARTINS, D. R.; MONTEIRO, G. R.; QUEIROZ, P. V. *et al.* Association of pro-inflammatory cytokines and iron regulatory protein 2 (IRP2) with *Leishmania* burden in canine visceral leishmaniasis. **PLoS One**, 8, n. 10, p. e73873, 2013.
- DONMEZ-ALTUNTAS, H.; HAMURCU, Z.; LIMAN, N.; DEMIRTAS, H. *et al.* Increased micronucleus frequency after oral administration of cadmium in dogs. **Biol Trace Elem Res**, 112, n. 3, p. 241-246, Sep 2006.
- DORVAL, M. E.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C.; ALVES, T. P. *et al.* Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of an American cutaneous leishmaniasis endemic area in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 104, n. 5, p. 695-702, Aug 2009.

- ESCH, K. J.; JUELGAARD, R.; MARTINEZ, P. A.; JONES, D. E. *et al.* Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. **J Immunol**, 191, n. 11, p. 5542-5550, Dec 1 2013.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nat Protoc**, 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.
- FENG, Z.; WANG, H.; WANG, S.; ZHANG, Q. *et al.* Enzymatic Assemblies Disrupt the Membrane and Target Endoplasmic Reticulum for Selective Cancer Cell Death. **J Am Chem Soc**, 140, n. 30, p. 9566-9573, Aug 1 2018.
- FERRO, S.; PALMIERI, C.; CAVICCHIOLI, L.; DE ZAN, G. *et al.* Leishmania amastigotes in neoplastic cells of 3 nonhistiocytic canine tumors. **Vet Pathol**, 50, n. 5, p. 749-752, Sep 2013.
- FOGLIA MANZILLO, V.; GIZZARELLI, M.; VITALE, F.; MONTAGNARO, S. *et al.* Serological and entomological survey of canine leishmaniasis in Lampedusa island, Italy. **BMC Vet Res**, 14, n. 1, p. 286, Sep 19 2018.
- FOGLIA MANZILLO, V.; PAGANO, A.; GUGLIELMINO, R.; GRADONI, L. *et al.* Extranodal gammadelta-T-cell lymphoma in a dog with leishmaniasis. **Vet Clin Pathol**, 37, n. 3, p. 298-301, Sep 2008.
- GALLEGO, M. A.; AGUILAR, A.; PLAZA, S.; GOMEZ, J. M. *et al.* Kaposi's sarcoma with an intense parasitization by Leishmania. **Cutis**, 57, n. 2, p. 103-105, Feb 1996.
- GRANER, M.; RAYMOND, A.; ROMNEY, D.; HE, L. *et al.* Immunoprotective activities of multiple chaperone proteins isolated from murine B-cell leukemia/lymphoma. **Clin Cancer Res**, 6, n. 3, p. 909-915, Mar 2000.
- GRETEN, F. R.; GRIVENNIKOV, S. I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. **Immunity**, 51, n. 1, p. 27-41, Jul 16 2019.
- GUARGA, J. L.; LUCIENTES, J.; PERIBANEZ, M. A.; MOLINA, R. *et al.* Experimental infection of Phlebotomus perniciosus and determination of the natural infection rates of Leishmania infantum in dogs. **Acta Trop**, 77, n. 2, p. 203-207, Nov 2 2000.
- HAMMER, A.; GETZY, D.; OGILVIE, G.; UPTON, M. *et al.* Salivary gland neoplasia in the dog and cat: survival times and prognostic factors. **J Am Anim Hosp Assoc**, 37, n. 5, p. 478-482, Sep-Oct 2001.
- HARTMANN, A.; PLAPPERT, U.; POETTER, F.; SUTER, W. Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test. **Mutat Res**, 536, n. 1-2, p. 27-38, Apr 20 2003.
- HEATON, P. R.; RANSLEY, R.; CHARLTON, C. J.; MANN, S. J. *et al.* Application of single-cell gel electrophoresis (comet) assay for assessing levels of DNA damage in canine and feline leukocytes. **J Nutr**, 132, n. 6 Suppl 2, p. 1598S-1603S, Jun 2002.
- KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin Dermatol**, 17, n. 3, p. 279-289, May-Jun 1999.
- KIRSCH-VOLDERS, M. Towards a validation of the micronucleus test. **Mutat Res**, 392, n. 1-2, p. 1-4, Aug 1 1997.

KIRSCH-VOLDERS, M.; FENECH, M.; BOLOGNESI, C. Validity of the Lymphocyte Cytokinesis-Block Micronucleus Assay (L-CBMN) as biomarker for human exposure to chemicals with different modes of action: A synthesis of systematic reviews. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen**, 836, n. Pt A, p. 47-52, Dec 2018.

KOCYIGIT, A.; KELES, H.; SELEK, S.; GUZEL, S. *et al.* Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. **Mutat Res**, 585, n. 1-2, p. 71-78, Aug 1 2005.

KOPANKE, J. H.; CHEN, A. V.; BRUNE, J. E.; BRENNAN, A. C. *et al.* Reference intervals for the activity of lactate dehydrogenase and its isoenzymes in the serum and cerebrospinal fluid of healthy canines. **Vet Clin Pathol**, 47, n. 2, p. 267-274, Jun 2018.

KOPPEN, G.; AZQUETA, A.; POURRUT, B.; BRUNBORG, G. *et al.* The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, 32, n. 3, p. 397-408, May 1 2017.

KOPTERIDES, P.; MOURTZOUKOU, E. G.; SKOPELITIS, E.; TSAVARIS, N. *et al.* Aspects of the association between leishmaniasis and malignant disorders. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 101, n. 12, p. 1181-1189, Dec 2007.

LANA, R. S.; MICHALSKY, E. M.; LOPES, L. O.; LARA-SILVA, F. O. *et al.* Ecoepidemiological aspects of visceral leishmaniasis in an endemic area in the Steel Valley in Brazil: An ecological approach with spatial analysis. **PLoS One**, 13, n. 10, p. e0206452, 2018.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 82, n. 4, p. 566-567, 1988.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature**, 454, n. 7203, p. 436-444, Jul 24 2008.

MARCONATO, L.; CRISPINO, G.; FINOTELLO, R.; MAZZOTTI, S. *et al.* Serum lactate dehydrogenase activity in canine malignancies. **Vet Comp Oncol**, 7, n. 4, p. 236-243, Dec 2009.

MARLIN, D. J.; JOHNSON, L.; KINGSTON, D. A.; SMITH, N. C. *et al.* Application of the comet assay for investigation of oxidative DNA damage in equine peripheral blood mononuclear cells. **J Nutr**, 134, n. 8 Suppl, p. 2133S-2140S, Aug 2004.

MASROUR-ROUDSARI, J.; EBRAHIMPOUR, S. Causal role of infectious agents in cancer: An overview. **Caspian J Intern Med**, 8, n. 3, p. 153-158, Summer 2017.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRES, M. *et al.* Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 88, n. 4, p. 491-493, Jul-Aug 1994.

MOREIRA, M. A.; LUVIZOTTO, M. C.; GARCIA, J. F.; CORBETT, C. E. *et al.* Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Vet Parasitol**, 145, n. 3-4, p. 245-252, Apr 30 2007.

MORGILLO, F.; DALLIO, M.; DELLA CORTE, C. M.; GRAVINA, A. G. *et al.* Carcinogenesis as a Result of Multiple Inflammatory and Oxidative Hits: a Comprehensive Review from Tumor Microenvironment to Gut Microbiota. **Neoplasia**, 20, n. 7, p. 721-733, Jul 2018.

MORRISON, W. B. Inflammation and cancer: a comparative view. **J Vet Intern Med**, 26, n. 1, p. 18-31, Jan-Feb 2012.

NESTOR, D. D.; MCCULLOUGH, S. M.; SCHAEFFER, D. J. Biochemical analysis of neoplastic versus nonneoplastic abdominal effusions in dogs. **J Am Anim Hosp Assoc**, 40, n. 5, p. 372-375, Sep-Oct 2004.

OGILVIE, G. K. Paraneoplastic syndromes. In: **ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Textbook of veterinary internal medicine. Philadelphia: Saunders**, p. 5, 2000.

OHSHIMA, H.; TATEMACHI, M.; SAWA, T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. **Arch Biochem Biophys**, 417, n. 1, p. 3-11, Sep 1 2003.

OKADA, F. Inflammation-related carcinogenesis: current findings in epidemiological trends, causes and mechanisms. **Yonago Acta Med**, 57, n. 2, p. 65-72, Jun 2014.

OLIVA, G.; SCALONE, A.; FOGLIA MANZILLO, V.; GRAMICCIA, M. *et al.* Incidence and time course of Leishmania infantum infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **J Clin Microbiol**, 44, n. 4, p. 1318-1322, Apr 2006.

ORDEIX, L.; SOLANO-GALLEGU, L.; FONDEVILA, D.; FERRER, L. *et al.* Papular dermatitis due to Leishmania spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. **Vet Dermatol**, 16, n. 3, p. 187-191, Jun 2005.

OSAKWE, N. M.; PAULUS, A.; HAGGERTY, P. F.; WOOD, R. A. *et al.* Visceral leishmaniasis with associated immune dysregulation leading to lymphoma. **Mil Med**, 178, n. 3, p. e386-389, Mar 2013.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 123, n. 1, p. 291-298, Aug 30 1984.

PALTRINIERI, S.; GRADONI, L.; ROURA, X.; ZATELLI, A. *et al.* Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Vet Clin Pathol**, 45, n. 4, p. 552-578, Dec 2016.

PAPADOGIANNAKIS, E. I.; KOUTINAS, A. F. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniasis due to Leishmania infantum. **Vet Immunol Immunopathol**, 163, n. 3-4, p. 94-102, Feb 15 2015.

PAREDES, R.; MUNOZ, J.; DIAZ, I.; DOMINGO, P. *et al.* Leishmaniasis in HIV infection. **J Postgrad Med**, 49, n. 1, p. 39-49, Jan-Mar 2003.

PEIXOTO, R.; CORREIA PINTO, J.; SOARES, V.; KOCH, P. *et al.* Primary thyroid lymphoma: A case report and review of the literature. **Ann Med Surg (Lond)**, 13, p. 29-33, Jan 2017.

PERRIN, L.; YERLY, S. Acute HIV infection. **J Biol Regul Homeost Agents**, 9, n. 3, p. 95-99, Jul-Sep 1995.

PINA TRENCH FJ, R. A., GEWEHR TA, DE SOUZA LEANDRO A, CHIYO L, ET AL. . First Report of Autochthonous Visceral Leishmaniosis in Humans in foz Do Iguaçu, Paraná State, Southern Brazil. **Ann Clin Cytol Pathol** 2, n. 6, 2016.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W. *et al.* Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect Immun**, 62, n. 1, p. 229-235, Jan 1994.

PORTA, C.; LARGHI, P.; RIMOLDI, M.; TOTARO, M. G. *et al.* Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. **Immunobiology**, 214, n. 9-10, p. 761-777, 2009.

REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; CARRILLO, E.; MARTINS-FILHO, O. A. *et al.* Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends Parasitol**, 26, n. 7, p. 341-349, Jul 2010.

RIBEIRO, R. R.; MICHALICK, M. S. M.; DA SILVA, M. E.; DOS SANTOS, C. C. P. *et al.* Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **Biomed Res Int**, 2018, p. 3296893, 2018.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! **Int Immunol**, 30, n. 3, p. 103-111, Mar 10 2018.

SAITO, R. D. F.; LANA, M. V. G.; MEDRANO, R. F. V.; CHAMMAS, R. Fundamentos de oncologia molecular. **Editores Atheneu**, 2015.

SANTOS-GOMES, G. M.; CAPELA, M. J.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. Experimental canine leishmaniasis: evolution of infection following re-challenge with *Leishmania infantum*. **Acta Trop**, 87, n. 2, p. 235-244, Jul 2003.

SANTOS, D. R.; FERREIRA, A. C.; BISETTO JUNIOR, A. The first record of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Parana, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, 45, n. 5, p. 643-645, Oct 2012.

SCHWING, A.; POMARES, C.; MAJOOR, A.; BOYER, L. *et al.* *Leishmania* infection: Misdiagnosis as cancer and tumor-promoting potential. **Acta Trop**, 197, p. 104855, Sep 2019.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; PEREIRA, E. A.; DE SOUZA, A. A. *et al.* A longitudinal study on the transmission dynamics of human *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* *chagasi* infection in Amazonian Brazil, with special reference to its prevalence and incidence. **Parasitol Res**, 104, n. 3, p. 559-567, Feb 2009.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, 175, n. 1, p. 184-191, Mar 1988.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRO, G.; CARDOSO, L. *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**, 165, n. 1-2, p. 1-18, Oct 28 2009.

SOLANO-GALLEG0, L.; MONTSERRAT-SANGRA, S.; ORDEIX, L.; MARTINEZ-ORELLANA, P. Leishmania infantum-specific production of IFN-gamma and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis. **Parasit Vectors**, 9, n. 1, p. 317, Jun 3 2016.

SOUZA, G. D.; SANTOS, E.; ANDRADE FILHO, J. D. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 104, n. 8, p. 1181-1182, Dec 2009.

STOCCO DOS SANTOS, R. C.; LINDSEY, C. J.; FERRAZ, O. P.; PINTO, J. R. *et al.* Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. **J Gen Virol**, 79 (Pt 9), p. 2127-2135, Sep 1998.

THOMAZ SOCCOL, V.; PASQUALI, A. K. S.; POZZOLO, E. M.; LEANDRO, A. S. *et al.* More than the eyes can see: The worrying scenario of canine leishmaniasis in the Brazilian side of the triple border. **PLoS One**, 12, n. 12, p. e0189182, 2017.

VALARMATHI, M. T.; SAWHNEY, M.; DEO, S. S.; SHUKLA, N. K. *et al.* Novel germline mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes in Indian breast and breast-ovarian cancer families. **Hum Mutat**, 23, n. 2, p. 205, Feb 2004.

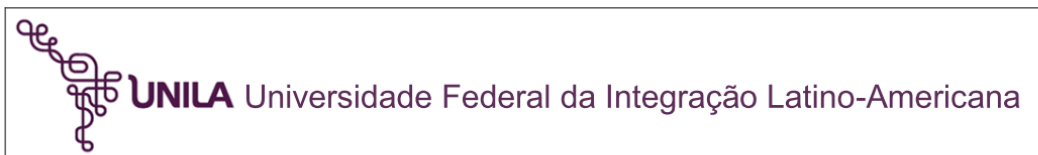
WEISS, A. T.; KLOPFLEISCH, R.; GRUBER, A. D. Prevalence of feline leukaemia provirus DNA in feline lymphomas. **J Feline Med Surg**, 12, n. 12, p. 929-935, Dec 2010.

WINKLER, S.; MURUA ESCOBAR, H.; REIMANN-BERG, N.; BULLERDIEK, J. *et al.* Cytogenetic investigations in four canine lymphomas. **Anticancer Res**, 25, n. 6B, p. 3995-3998, Nov-Dec 2005.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. **Virology**, 384, n. 2, p. 260-265, Feb 20 2009.

8. ANEXOS

8. 1 Anexo 1.



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UNILA

O projeto intitulado “Avaliação do efeito clastogênico da infecção por *Leishmania sp* em cães”, processo de número 001/2019, sob responsabilidade do prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008).

Foz do Iguaçu, 03 de maio de 2019

A handwritten signature in black ink, appearing to be "F. Tavares", is centered on the page.

Prof. Dr. Flávio Luiz Tavares
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais - UNILA