

**AValiação DA RADIAÇÃO IONIANTE EM OVÁRIOS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE) ATRAVÉS DA TÉCNICA DO COMETA****IONIAN RADIATION EVALUATION IN *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE) OVARIES THROUGH THE COMET TECHNIQUE****Alexandre Antonio PASQUALINI<sup>1</sup>; Silvia Piere IRAZUSTA<sup>2</sup>; Valter ARTHUR<sup>3</sup>; Paulo José BALSAMO<sup>4</sup>****RESUMO**

Este trabalho avaliou os efeitos genotóxicos em tecidos ovarianos de ácaros do gênero *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, um carrapato que infesta, preferencialmente, bovinos com o intuito de aprimorar conhecimentos para se adaptar à técnica do inseto estéril como um meio de controle populacional deste parasita. Fêmeas ingurgitadas de sangue e em fase de pré postura foram irradiadas com doses de 0, 5, 10, 15, 20 e 25 Gy com Cobalto-60 e dentro de 24 horas foram dissecadas e seus ovários formaram uma amostra pool com os quais foi realizado o teste do cometa e a genotoxicidade inferida nestes tecidos foi proporcional ao aumento das doses ionizantes.

**Palavras-chave:** Acari; Irradiação; Teste do cometa; DNA.

**ABSTRAT**

The genotoxic effects on ovarian tissues of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* mites, a tick that preferentially infests cattle in order to improve knowledge to adapt to the sterile insect technique as a means of population control of this parasite, were evaluated. Pre-laying blood engorged females were irradiated at doses of 0, 5, 10, 15, 20 and 25 Gy with Cobalt-60 and within 24 hours were dissected and their ovaries formed a pool sample with which it was performed. comet testing and inferred genotoxicity in these tissues was proportional to the increase in ionizing doses.

**Keywords:** Acari; Irradiation; Comet assay; DNA.

<sup>1</sup> Graduado em medicina veterinária (1994). Especialização em Produção de Ruminantes, UFLA (2001). Mestrado em Produção Animal Sustentável, APTA Instituto de Zootecnia de Nova Odessa (2013). Doutorado Aplicações Nucleares. IPEN/USP (2019) – Brasil. E-mail: xpasq@yahoo.com

<sup>2</sup> Possui graduação em Farmácia pela Universidade de São Paulo (1981), mestrado em Ciências Biológicas (Fisiologia) pela Universidade Estadual de Campinas (1988) e doutorado em Anatomia Patológica pela Universidade Estadual de Campinas (1994). Pós doutorado em toxicologia pela Universidade Estadual de Campinas (2011) – Brasil.

<sup>3</sup> Possui graduação em Biologia pela Universidade Metodista de Piracicaba (1977), mestrado em Energia Nuclear na Agricultura (Esalq) Universidade de São Paulo (1982) e doutorado em Agronomia (Entomologia) (Esalq) Universidade de São Paulo (1985) – Brasil.

<sup>4</sup> Graduado em Tecnologia em Saúde pela Faculdade de Tecnologia de Sorocaba (2009), Mestrado em Ciências Biológicas, na área de Biotecnologia e Monitoramento Ambiental, pela Universidade Federal de São Carlos - UFSCar (2016) Doutorando em Ciências Biológicas, na área de Biotecnologia e Monitoramento Ambiental, pela Universidade Federal de São Carlos - UFSCar (2020) – Brasil.

## Introdução

O *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* pertence à ordem Acari e família do Ixodidae, é uma espécie de ácaro presente nos países de clima tropical e parasita diversos animais de interesse zootécnico, mas predominantemente, bovinos. No Brasil, o mercado industrial do setor agropecuário investiu 5,954 bilhões de reais no ano de 2018, sendo que 29% deste total estava relacionado ao emprego de produtos antiparasitários e, os ruminantes demandaram mais de 55% deste mercado (SINDAN, 2018).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da Instrução Normativa - In nº 13 de 29/05/14, suspendeu o uso de lactonas macrocíclicas (avermectinas), endectocida de longa ação no mercado brasileiro, afetando diretamente a pecuária de corte, como também, a pecuária leiteira de animais jovens e a ovinocaprinocultura e, posteriormente, revogou essa proibição em 27/03/2015, mas o mercado internacional não aceita produtos e derivados cárneos e lácteos com resíduos de avermectinas. Assim, se torna necessário pesquisar métodos alternativos de controle desse parasita em animais.

Os métodos de profilaxia empregados para as hemoparasitoses são: o controle dos vetores, a quimioprofilaxia, o uso de vacinas e para algumas espécies de insetos, se emprega a técnica do inseto estéril.

Este trabalho buscou fomentar informações sobre os efeitos da radiação ionizante em fêmeas ingurgitadas na fase pré-postural de ácaros da espécie *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* através da exposição ao Cobalto-60 e avaliar através da técnica do cometa, se fomentar conhecimentos para o emprego da técnica modificada do inseto

estéril, para a princípio, se inferir qual dose de radiação seria capaz de inviabilizar a postura ou a eclodibilidade dos ovos, através da avaliação da genotoxicidade nos tecidos ovarianos deste espécime.

## Método

Fêmeas adultas e ingurgitadas de *R.(B.) microplus* em fase de pré postura, obtidas de infestação natural de vacas leiteiras da Escola Técnica ETEC Dr. Carolino da Motta e Silva em Espírito Santo do Pinhal, São Paulo (SP), sem tratamento acaricida há mais de 30 dias, foram lavadas, secadas e selecionadas dentro de um padrão morfológico e peso variando de 200 a 235g de peso vivo.

No Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia, CENA-USP, Piracicaba, SP. essas fêmeas foram irradiadas numa fonte de  $^{60}\text{Co}$ , no GAMMACELL 220, nas doses de 0, 5; 10; 15; 20; e 25 Gy (142 Gy/h.) na presença de oxigênio e em temperatura ambiente.

## Eletroforese em gel de agarose

Vinte e quatro horas após a irradiação, no Laboratório de Toxicologia Ambiental e Ocupacional (LATAMO-FATEC) Sorocaba, SP, cinco fêmeas irradiada de cada dose, foram dissecadas e seus ovários separados, formando-se uma amostra “pool” e mantida em tampão PBS gelado em microtubos. Posteriormente, essas amostras foram maceradas e promoveu-se uma suspensão celular que foi homogeneizada com agarose baixo ponto de fusão em lâminas pré-tratadas com agarose ponto de fusão normal (AZQUETA e COLLINS, 2013). O material foi coberto com uma lamínula para assegurar uma distribuição homogênea, que após a solidificação, a lamínula foram

removidas e as lâminas transferidas a uma solução de concentração superior a 2,0 M e pH >13, que contém tensoativos celulares (Triton X-100) para promoverem a ruptura das membranas (AZQUETA e COLLINS, et al., 2013) e sob condições alcalinas foram medidas as quebras simples e duplas e os sítios álcali-lábeis (FAIRBAIRN et al, 1995).

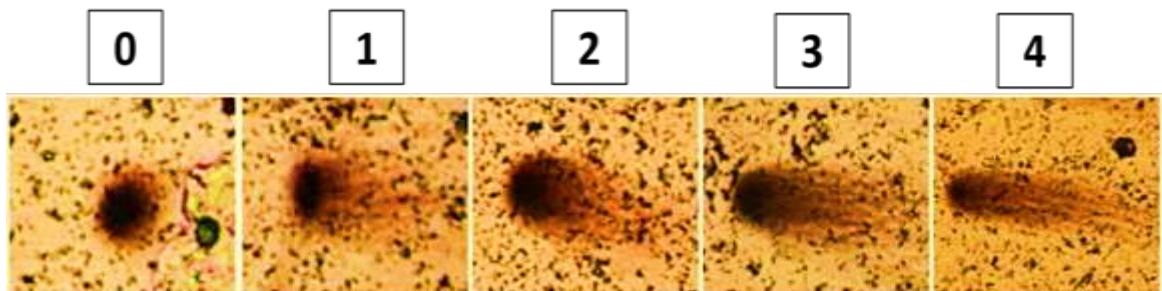
Posteriormente, as lâminas foram levadas para a cuba de eletroforese, e utilizando 300 mA e 36 V, segmentos de DNA livres, fracionados (clastogêneses) migraram em direção ao cátodo, dando origem a uma cauda de cometa. Neste experimento empregou-se a coloração com nitrato de prata, pois tem como vantagens dessa técnica o fácil acesso, o uso de microscópio óptico comum e a possibilidade de armazenamento das lâminas (BRIANEZI et al., 2009). Assim,

foram analisados cerca de 50 cometas escolhidos ao acaso para o controle de cada amostra irradiada. O dano no DNA foi quantificado para cada célula individualmente e classificado em cinco categorias (0-4) correspondente as seguintes quantidades de danos na cauda do DNA:

Nível 0 = sem danos (<5%); Nível 1 = baixo nível de danos (5-20%); Nível 2 = médio nível de danos (20-40%); Nível 3 = alto nível de danos (40-95%) e Nível 4 = dano total (>95%).

## Resultados

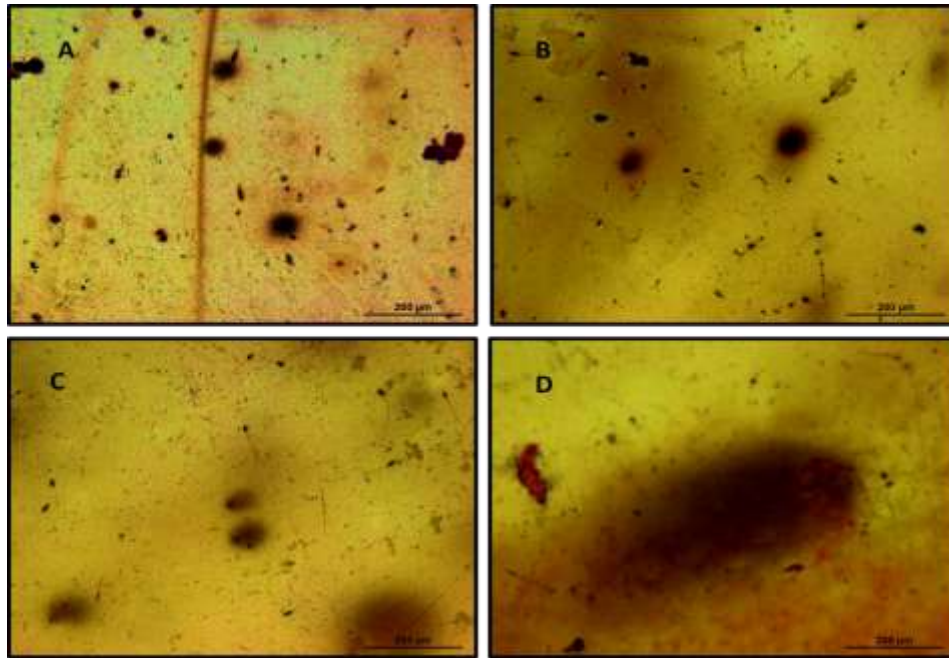
Para avaliação e quantificação dos danos adotou-se como referência um gabarito confeccionado a partir da amostra de sangue total humano, utilizado como controle interno da reação (Figura 01).



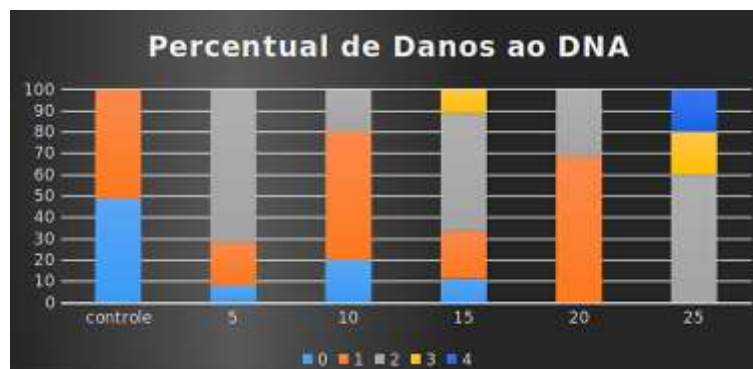
**Figura 01.** Níveis de cometa com células sanguíneas como referência comparativa ao experimento. Fonte: Autor.

Os resultados obtidos com o ensaio do cometa para avaliação dos danos ao DNA nos tecidos ovarianos dos ácaros submetidos às gradativas doses de radiação mostraram que a intensidade das quebras aumentou com o aumento das doses, porém os danos mais severos (níveis 3 e 4) só ocorreram com a

maior dose (25Gy). Na figura 02 se observa imagens do cometa em células de ovários e a classificação quanto ao dano celular. O Histograma da Figura 03 apresenta a frequência de cada nível de danos em porcentagem após a contagem de 50 nucleídeos.



**Figura 02.** Imagens dos cometas das células de ovário. Em A. os cometas foram classificados em nível 0 e são do grupo controle; em B. observa-se cometas em nível 1; em C. os cometas estão no nível 3 e em D. a imagem é de um cometa nível 4. Aumento de 100X no fotomicroscópio Leyca. Fonte: Autor.



**Figura 03.** Histograma de distribuição dos diferentes níveis de dano (0-4) nas diferentes doses de radiação (0, 5, 10, 15, 20 e 25 Gy). Fonte: Autor.

### Discussão

O teste do cometa é uma ferramenta para estudos da genotoxicidade em processos relacionados a malformações, doenças congênitas, genéticas e degenerativas, envelhecimento celular, câncer, entre outras (ERDTMANN, 2003).

A eletroforese em gel de agarose é um método muito utilizado para a separação e visualização de fragmentos de DNA. A forma e o tamanho das bandas após a corrida são adotados como parâmetros para detectar as possíveis lesões geradas na molécula de DNA

e apresenta como vantagens avaliação de dano em células isoladas, quantidade pequena de amostra, da ordem de microlitros, utilização de qualquer tipo celular proliferativo ou não, avaliação da capacidade de reparo, além de apresentar uma boa sensibilidade para detecção de danos ocorridos no DNA (SPEIT e HARTMANN, 1999).

Contudo, o teste do cometa não permite identificar o tipo de dano no DNA. O estudo da cinética de reparo celular tem adotado como referência para danos de bases e quebras simples na fita do cromossomo, reparos com alta fidelidade dentro de 15

minutos após a irradiação, desde que a fita não danificada contenha a sequências de bases complementar para que possa ser usada como "template" no reparo. Quando o dano ocorre na fita dupla, onde ambas as fitas do DNA são afetadas, no mesmo sítio, pode ocorrer o reparo do DNA entre 2-3h (SINGH et al., 1988; POPANDA et al., 2003).

Com foco em danos causados pela radiação, Hill (1999) relatou que mais de 90% das quebras da fita dupla induzidas pela radiação y são reparadas em 3 h; já as quebras na fita dupla produzidas pelas partículas  $\alpha$  podem ser reparadas com uma redução de 30 – 50 % após 3 h.

Nascimento (2000) avaliou os danos e reparos do DNA em células sanguíneas de 3 doadores de sangue sadios e de 3 pacientes com câncer de mama, através da técnica de eletroforese, processando células 3 e 24 horas após a exposições in vitro com doses de 0,2 a 10 Gy de radiação gama de  $^{60}\text{Co}$  (0,722Gy/min) e constatou que o dano ao DNA foi mais pronunciado logo após as irradiações e que as células apresentaram um aumento na migração de DNA em função da dose de radiação tanto em doadores sadios como em pacientes com câncer de mama.

Oliveira (2000), utilizando  $^{90}\text{Sr}$  e  $^{90}\text{Y}$  com dose entre 0,2 a 5Gy adotando a referência de Estimativa de Dano ao DNA (DD) usualmente numa escala de 1- 4, de menor dano ao maior, constatou a correlação direta de maior dano celular proporcionalmente as doses de radiação Beta, similarmente ao padrão encontrado por Nascimento, 2000.

Valgôde (2008) estudando os efeitos da radiação gama do  $^{60}\text{Co}$  em linhagens tumorais (T-47D e IVCF-7) e não tumorais (MCF-10) originárias de mama humana, constatou que uma hora após a exposição a 5; 10; 20 e 30 Gy (1,5 Gy/min), todas as linhagens exibiram uma redução considerável de dano quando comparadas com os valores

iniciais e que após 3 horas, praticamente todo o dano radioinduzido havia sido reparado.

### Conclusão

Este experimento se ateve em demonstrar que o dano celular foi proporcional ao aumento das doses ionizantes com  $^{60}\text{Co}$  em concordância com a literatura consultada, contudo, demonstrou que as doses empregadas são consideradas baixas quando comparadas às empregadas em ácaros machos nos experimentos direcionados para a técnica do inseto estéril, mas que resultaram em severos danos celulares nos tecidos ovarianos, assim como, resultou em inviabilidade de nascituros, proporcionalmente às dose crescentes.

### Referências

- AZQUETA, A; COLLINS, A. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. Archives of Toxicology, New York, v. 87, n. 6, p. 949–968, jun. 2013.
- BRASIL (Ministério da gricultura, Pecuáia e Abasatecimento – MAPA). In nº 13 de 29/05/14.
- BRIANEZI, G.S. et al. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. J Bras Patol Med Lab • v. 45 • n. 4, p. 325-334 • agosto 2009.
- ERDTMANN, B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: Silva, J.; Erdtmann, B.; Henriques, J. A. P. Genética Toxicológica. Porto Alegre: Alcance. 2003.
- FAIRBAIRN, D., OLIVE, P. L. AND O'NEILL, K. L., The comet assay: a comprehensive review. Mutat. Res., vol. 339, p 37-59, 1995.

- HILL, M.A. Radiation damage to DNA: the importance of track structure. *Radiation Measurements*, v.31, n.1-6, p.15-23, 1999.
- NASCIMENTO, P.A. Avaliação do dano radioinduzido e capacidade de reparo do DNA em pacientes com cancer de mama por meio da técnica do cometa. Tese. [http://pelicano.ipen.br/PosG30/TextoCompleto/Patricia%20Alves%20do%20Nascimento\\_M.pdf](http://pelicano.ipen.br/PosG30/TextoCompleto/Patricia%20Alves%20do%20Nascimento_M.pdf) Acessado em 20/07/2019.
- OLIVEIRA, E.M. Avaliação do efeito da radiação beta de <sup>90</sup>Sr em células sanguíneas humanas e elaboração de curva-resposta. Dissertação. <http://repositorio.ipen.br/bitstream/handle/123456789/10815/06865.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acessado em 20/07/2019.
- POPANDA, O. et al; Radiation-induced DNA damage and repair in lymphocytes from breast cancer patients and their correlation with acute skin reactions to radiotherapy. *International Journal Radiation Oncology Biology Physics.*, v.55, n.5, p.1216-25, 2003.
- SINDAN - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. Mercado Brasileiro. <http://www.sindan.org.br/mercado-brasil-2018/> Acessado 05/07/2018.
- SINGH, N et al. A simple technique for quantitation of damage of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, New York, v.175, n. 1, p. 184–191, 1988.
- SPEIT, G & HRTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods in Molecular Biology*, v113, p.203-12, 1999.
- VALGÔDE, F.G.S. Avaliação do dano radioinduzido, capacidade de reparo e morte celular em células humanas tumorais (T-47D e MCF-7) e não tumorais (MCF-10) de mama. 2008. Tese. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-16052012-141727/en.php>.