



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**



**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÔMICA DE
CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CÃES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL NATURALMENTE
INFECTADOS**

POLYANA MAYUME PEREIRA DA SILVA

Campo Grande – MS
2020

POLYANA MAYUME PEREIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÔMICA DE
CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CÃES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL NATURALMENTE
INFECTADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Alda Izabel de Souza

Campo Grande – MS
2020

À minha amada família - Meus pais Aildo e Marina, minha irmã Pamylla meu sobrinho Matheus e meu noivo João. Essa vitória também é deles.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, por me fazer superar as dificuldades, ter sido meu suporte e ter me abençoado.

Aos meus pais Aildo Ferreira da Silva e Marina Pereira dos Santos da Silva, pelo amor incondicional, por sempre me apoiarem e por estarem comigo em todos os momentos.

A minha maninha Pamylla Mayara Pereira da Silva, pelo amor, incentivo e por acreditar em mim mais do que eu mesma.

Ao sobrinho filho Matheus Leonidas, por me proporcionar tantos momentos de felicidades.

Ao meu noivo João Batista Sarmento dos Santos Neto, por sempre me incentivar, me apoiar e nunca me deixa cair.

A minha orientadora, Professora Alda Izabel de Souza, pela paciência, orientação, dedicação e, principalmente pelos ensinamentos na minha vida profissional e pessoal.

A minha amiga Kelly Cristina da Silva Godoy, pelo ombro amigo, companheirismo, ajuda no desenvolvimento do experimento e por acreditar em mim.

Aos meus amigos, Gilliano José Mazzetto de Castro, Laura Raquel Rios Ribeiro, Ricardo dos Santos, Ana Paula, Andressa Eloísa e Gabriela Oliveira Vicente, pelas fazes boas e ruins da vida e do cotidiano, pela amizade sincera, doce e verdadeira.

Aos amigos e colegas de laboratório Gustavo Gomes de Oliveira, Marisol Madrid, Juliana Rosa de Oliveira Maia, Mikaelle de Oliveira Castilho, Tamires Ramborger Antunes, Stephanie Carrelo de Lima, Franciela Cristina Pezzarico e Sandro Pinto de Araújo, que fizeram parte da minha jornada e tornaram meus dias de trabalho mais felizes.

Ao professor Rodrigo Juliano Oliveira e toda equipe do laboratório CeTroGen, em especial, aos colegas Lucas Roberto Pessatto e Adrivanio Baranoski, pela ajuda no desenvolvimento do experimento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante estes 18 meses.

A todos que colaboraram para que este trabalho fosse concluído.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
1. CAPÍTULO I.....	6
1.1 INTRODUÇÃO	6
1.1.1 <i>LEISHMANIA</i> SPP.	7
1.1.2 ENSAIO DE COMETA.....	8
1.1.3 TESTE DE MICRONÚCLEO	10
1.1.4 OBJETIVOS	12
1.1.4.1 OBJETIVO GERAL	12
1.1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
2. CAPÍTULO II.....	17
AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES GENOTÓXICAS INDUZIDAS PELA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS	Erro! Indicador não definido.

SILVA, P.M.P, AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÔMICA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL NATURALMENTE INFECTADOS, 2020. Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso Do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2020.

RESUMO

A estabilidade genômica é uma consequência da exposição a agentes químicos, físicos e biológicos que induzem lesões ao genoma, seja pela mudança no conjunto da estrutura do gene ou pela ocorrência de mutação gênica, que podem ser repassados às próximas gerações celulares, quando ocorre em células germinativas. As mutações e alterações genotóxicas podem ocorrer em qualquer célula, independente do estágio do ciclo celular. No momento em que a mutação/alteração acontece nas células somáticas ocorre um desencadeamento de consequências, sendo as mais frequentes a formação de tumores benignos ou malignos, a morte celular e o envelhecimento precoce. A infecção por *Leishmania infantum* pode estimular estabilidade genômica em camundongos, porém esta associação ainda não foi caracterizada em outras espécies, especialmente em cães que são considerado o principal reservatório em ambientes urbanos pois, além de intenso parasitismo apresentam riscos para a saúde pública com o alto potencial de transmissão para seres humanos. Desta forma o objetivo com este estudo foi identificar a estabilidade genômica da leishmaniose visceral em cães utilizando os testes de ensaio de cometa e micronúcleo, reconhecidos como biomarcadores de genotoxicidade. Um total de 32 cães participaram do estudo, sendo 24 infectados assintomáticos e 8 não infectados. Os testes de ensaio de cometa e micronúcleo foram testados e comparados entre os dois grupos. O teste de normalidade de D'Agostino com nível de significância de 0,05 seguido do teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$) foram utilizados. O teste do ensaio do cometa identificou aumento na porcentagem de DNA na cauda das células danificadas ($p = 0,04$) e o teste do micronúcleo detectou um aumento no número de micronúcleo em eritrócitos policromatofílicos, ($p = 0,0004$) no tecido medular do grupo infectado, quando comparados ao grupo controle. Esses resultados confirmam o potencial genotóxico e mutagênico da leishmaniose visceral nas células da medula óssea de cães.

Palavras-chaves: cometa, genotoxicidade, *Leishmania*, micronúcleo.

SILVA, P.M.P, EVALUATION OF GENOMIC STABILITY OF BONE MARROW CELLS IN DOGS WITH NATURALLY INFECTED VISCERAL LEISHMANIASIS, 2020. Master. Veterinary Sciences Graduate Program. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso Do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2020.

ABSTRACT

Genomic stability is a consequence of exposure to chemical, physical and biological agents that induce lesions to the genome, either by changing the whole structure of the gene or by the occurrence of gene mutation, which can be passed on to the next cell generations, when it occurs in germ cells. Genotoxic mutations and changes can occur in any cell, regardless of the stage of the cell cycle. At the moment when the mutation/alteration occurs in somatic cells, consequences occur, the most frequent being the formation of benign or malignant tumors, cell death and premature aging. *Leishmania infantum* infection may stimulate genomic stability in mice, but this association has not yet been characterized in other species, especially in dogs that are considered the main reservoir in urban environments because, in addition to intense parasitism, they present risks to public health with the high potential for transmission to humans. Thus, the objective of this study was to identify the genomic stability of visceral leishmaniasis in dogs using comet and micronucleus assay tests, recognized as genotoxicity biomarkers. A total of 32 dogs participated in the study, 24 of which were asymptomatic and 8 uninfected. The comet and micronucleus test tests were tested and compared between the two groups. The D'Agostino normality test with significance level of 0.05 followed by the Mann-Whitney test ($p < 0.05$) was used. The comet assay test identified an increase in the percentage of DNA in the tail of the damaged cells ($p = 0.04$) and the micronucleus test detected an increase in the number of micronucleus in polychromatophylic erythrocytes ($p = 0.0004$) in the medullary tissue of the infected group, when compared to the control group. These results confirm the genotoxic and mutagenic potential of visceral leishmaniasis in bone marrow cells of dogs.

Keywords: comet, genotoxicity, *Leishmania*, micronucleus.

1. CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma grave doença zoonótica, potencialmente fatal, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida vetorialmente durante o repasto sanguíneo de fêmeas infectadas de flebotomíneos. Os cães são considerados os principais reservatórios, para o parasito, em ambientes urbanos, pois além de intenso parasitismo estão diretamente em contato com o homem (ALBUQUERQUE et al., 2017).

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença de difícil diagnóstico, uma vez que trata-se de uma enfermidade com características multissistêmica e ampla sintomatologia (BRASIL, 2016; SOLANO-GALLEGO, 2011) e, embora o agente causador seja um protozoário intracelular obrigatório, existem poucos relatos sobre o seu possível efeito genotóxico (DE OLIVEIRA et al., 2011).

A genotoxicidade pode ocorrer em consequência da exposição a agentes químicos, físicos e biológicos que induzem lesões no genoma seja pela mudança no conjunto da estrutura do DNA ou pela ocorrência de mutação gênica, com repasse desses danos às próximas gerações celulares ou para gerações futuras quando ocorre em células germinativas (MOUTSCHEN, 1985).

Alterações genotóxicas já foram descritas em seres humanos portadores de leishmaniose cutânea (KOCYIGIT et al., 2005). Em camundongos, também há descrição de genotoxicidade quanto da infecção por *Leishmania infantum* (DE OLIVEIRA et al., 2011). Esses relatos confirmam a ação do parasito sobre o material genético dos hospedeiros. As alterações são atribuídas ao aumento da produção de óxido nítrico pelos macrófagos, causadas pela presença das formas de amastigotas no tecido, que induzem as alterações no DNA (DE OLIVEIRA et al., 2011).

Em todos os seres vivos, o material genético é organizado por uma ordem específica de nucleotídeos na molécula de DNA. No entanto, as bases desta molécula expostas a vários agentes podem sofrer alteração na sua estrutura ou composição química, denominada de mutação (ZAHA et al., 2003).

As mutações e alterações genotóxicas podem ocorrer em qualquer célula, independente do estágio do ciclo celular (ZAHA et al., 2003). Quando não se tornam letais para as células, elas podem propagar-se pelo corpo em crescimento (mutação somática) ou serem transmitidas às gerações seguintes (mutação germinativa) (RABELLO-GAY, 1991).

No momento em que a mutação/alteração acontece nas células somáticas ocorre o desencadeamento de consequências, tais como a formação de tumores benignos ou malignos, a morte celular, o envelhecimento precoce e a ocorrência de malformação e abortos durante o desenvolvimento embrionário (RABELLO-GAY, 1991). Deste modo, pesquisadores utilizam alguns indicadores de genotoxicidade para avaliar os efeitos de exposições do material genético, na estabilidade do DNA, nos danos genômicos e no dano cromossômico dentre outros.

Os testes do micronúcleo (MN) e ensaio do cometa (EC) são os mais utilizados e recomendados para a detecção dessas atividades genotóxicas (GROVER et al., 2009; BOEIRA et al., 2010; AISSA et al., 2012;). O ensaio do cometa refere-se a um procedimento rápido e sensível para quantificar danos no DNA de várias espécies (ROTHFUSS et al., 2011; TICE et al., 2000). Já o teste do micronúcleo é utilizado para detecção da ação de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e/ou aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (ZAHA, 2014).

1.1.1 LEISHMANIOSE

A leishmaniose visceral (LV) é uma grave doença zoonótica crônica, potencialmente fatal e com ampla distribuição geográfica acometendo indivíduos, na maioria das vezes, de países subdesenvolvidos como a Índia, Nepal, África do Sul e Brasil (COSTA, 2011).

Já LVC refere-se a uma enfermidade causada pelo protozoário do gênero *Leishmania infantum*. O cão é considerado o principal reservatório no ciclo urbano de transmissão pois, além de apresentar intenso parasitismo está diretamente em contato com o homem (ALBUQUERQUE et al., 2017). A principal forma de transmissão da LVC é por meio da picada do inseto

pertencente à família dos flebotomídeos, ao gênero *Lutzomyia* e à espécie *Lutzomyia longipalpis*, conhecido popularmente por mosquito-palha (FEITOSA et al., 2000; DINIZ et al., 2008).

O ciclo da doença inicia-se quando, durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, a fêmea do flebotomídeo ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania infantum*. No trato digestivo superior (esôfago e a faringe) do vetor ocorre a diferenciação para formas promastigotas metacíclicas (IKEDA-GARCIA e MARCONDES, 2007).

O ciclo biológico completa-se quando fêmeas infectadas realizam um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado liberando as formas promastigotas metacíclicas. No interior dos macrófagos, as formas promastigotas metacíclicas diferenciam-se em formas amastigotas, que se multiplicam intensamente por divisão binária. Liberadas, essas formas serão fagocitadas por novos macrófagos, em um processo contínuo, com disseminação hematogênica e linfática para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário (IKEDA-GARCIA e MARCONDES, 2007)

A presença das formas de amastigotas no tecido aumenta a produção de óxido nítrico pelos macrófagos que podem induzir a alterações genotóxicas no DNA (DE OLIVEIRA et al., 2011). Neste contexto, levando em consideração que as alterações ainda não foram demonstradas na leishmaniose visceral canina, se faz necessário a investigação de possíveis alterações genotóxicas nesta espécie. A utilização de biomarcadores como o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo são reconhecidos como boas técnicas para a investigação dessas alterações (VALENTE et al., 2017).

1.1.2 ENSAIO DE COMETA

O ensaio de cometa (EC) ou “*Single Cell Gel Electrophoresis*” (SCGE) é um método muito difundido e eficaz, que pode detectar sinais de genotoxicidade por meio da identificação da quebra da fita de DNA de células expostas a agentes químicos, físicos e biológicos (OLIVEIRA et al., 2009).

Estudos comprovaram a eficiência deste teste em vários grupos celulares utilizando diferentes agentes (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; TICE et al., 2000; DE LEMOS et al., 2000; LEE; STEINERT, 2003; MATSUMOTO et al., 2006). Trata-se de um método rápido, no qual as lesões no DNA podem ser vistas na ausência da atividade mitótica (CASTRO, 2004).

Ao ser comparado com outros testes o ensaio do cometa apresenta vantagens como a detecção de dano no material genético, exigência de poucas células para a sua realização e a possibilidade de se obter dados de células individualizadas (MITCHELMORE; CHIPMAN., 1998; BUCKER et al., 2006).

As células são incorporadas em gel de agarose e espalhadas sobre uma lâmina. Essa lâmina é submetida a uma corrente elétrica que produz uma força proporcionando a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do nucleóide (MCKELVEY-MARTIN et al., 1993).

Após a eletroforese as células que apresentam um nucleóide redondo são identificadas como normais, ou seja, sem danos no DNA. Quando vista ao microscópio a célula com danos adquire a forma aparente de um cometa, com cabeça referente a região nuclear e cauda que contém fragmentos ou fitas de DNA que migraram na direção do ânodo (FAIRBAIRN et al., 1995).

O tamanho da cauda é proporcional à dimensão do dano que foi causado, mas a simples visualização do cometa já significa que danos estão presentes no DNA (Figura. 1), podendo indicar quebras de fita simples, duplas, *crosslinks*, sítios de reparo por excisão e/ou lesões álcali-lábeis (TICE et al., 1995).

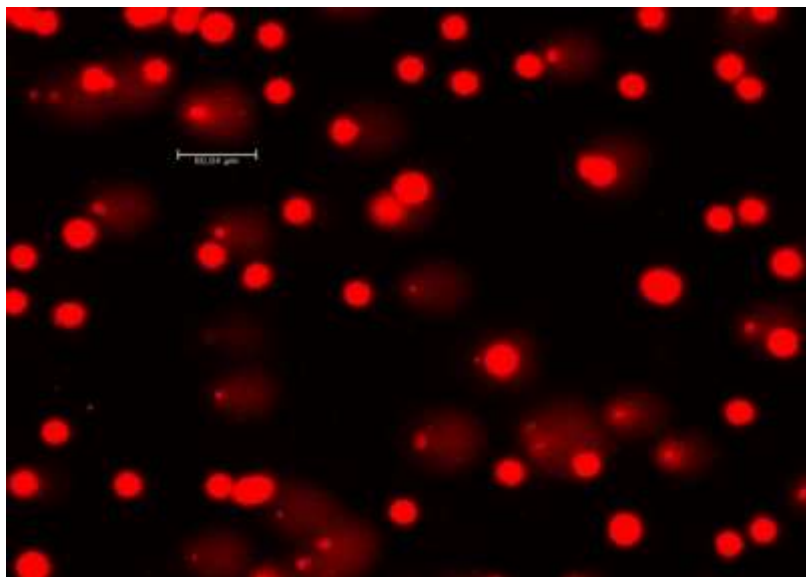


Figura1. Diferentes níveis de dano no material genético observados como cometas (nucleóides) com caudas de comprimentos variados, em eritrócitos de camundongos. Aumento X400, corado com brometo de etídio e visualizado com microscopia de fluorescência (Fonte: Arquivo pessoal).

1.1.3 TESTE DE MICRONÚCLEO

O micronúcleo (MN) é um pequeno núcleo delimitado por uma membrana nuclear, independente do núcleo principal, que aparece nas células filhas como consequência de danos não reparados ocorridos nas células mães (WALKER et al., 1996).

O teste do micronúcleo foi introduzido por Heddle em 1973, como uma alternativa simples para avaliar danos cromossômicos. É um teste de mutagenicidade *in vivo* que reconhece a ação de agentes clastogênicos e aneugênicos (FENECH, 2000; SALVADORI et al., 2003).

O princípio do teste está baseado no fato de que, durante a anáfase, as cromátides e fragmentos cromossômicos acêntricos não são transportados pelas fibras do fuso para polos opostos, ao contrário dos fragmentos com centrômero. Após a telófase os cromossomos sem danos são incluídos no núcleo de cada uma das células filhas e elementos que não foram transportados pelo fuso também podem ser englobados pelos núcleos recém-formados. No entanto, alguns destes elementos, normalmente muito pequenos, não são incluídos nos

novos núcleos e permanecem no citoplasma, constituindo as estruturas caracterizadas como micronúcleos (SCHMID, 1975).

Como é decorrente de material genético que se separou do núcleo principal, o MN é um representante de perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento), numérico (cromossomo inteiro) ou ainda dano no aparelho mitótico. A presença de micronúcleo é um fenômeno natural, porém as exposições a compostos genotóxicos aumentam a sua frequência nas células (FENECH, 2000). Os micronúcleos podem ser observados também em células anucleadas como é o caso dos eritrócitos policromáticos do sangue periférico de mamíferos. Essas células no final do seu processo de diferenciação sobre uma enucleação e os micronúcleos não são expulsos juntamente com o núcleo principal e, portanto, são mantidos no citoplasma (Figura 2).



Figura 2. Eritrócitos policromáticos de sangue periférico de rato Wistar. A seta indica o micronúcleo. Coloração: Laranja de acridina. Aumento de 1000x. Laboratório de Nutrigenômica-FCFRP/USP, 2011 (Fonte: Lívia Cristina Hernandes).

Os MN formados por agentes genotóxicos só apareceram após um ciclo completo de divisão celular (SALVADORI et al., 2003). Portanto, danos cromossômicos estruturais estão relacionados à exposição direta do agente mutagênico com o DNA ou com defeitos intracelulares na replicação do DNA, recombinação ou mecanismo de reparo recentes (FENECH, 2000).

1.1.4 OBJETIVOS

1.1.4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a estabilidade genômica em células da medula óssea de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados.

1.1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Identificar danos genômicos no tecido medular de cães com LVC por meio da técnica de cometa.

2- Identificar danos cromossômicos no tecido medular de cães com LVC por meio do ensaio de micronúcleo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, K. C. O. D., VEIGA, A. D. S. S. D., BRIGIDO, H. P. C., FERREIRA, E. P. D. R., COSTA, E. V. S., MARINHO, A. M. D. R., & DOLABELA, M. F. Brazilian Amazon traditional medicine and the treatment of difficult to heal leishmaniasis wounds with Copaifera. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.2017 p.9, 2017.

AISSA, A. F., BIANCHI, M. L. P., RIBEIRO, J. C., HERNANDES, L. C., de FARIA, A. F., MERCADANTE, A. Z., & ANTUNES, L. M. G. Comparative study of β -carotene and microencapsulated β -carotene: evaluation of their genotoxic and antigenotoxic effects. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 1418-1424, 2012.

BOEIRA, J. M., FENNER, R., BETTI, A. H., PROVENSI, G., LACERDA, L. D. A., BARBOSA, P. R., & PEDROSO, A. P. Toxicity and genotoxicity evaluation of Passiflora a lata Curtis (Passifloraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 128, p. 526-532, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1ed. Atualizada Brasília: **Ministério da Saúde**, p.522, 2016.

BÜCKER, A., CARVALHO, W, & ALVES-GOMES, J. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigen mannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazonica**, v.36, p.357-364, 2006.

CASTRO, T. M., NETO, R., CÍCERO, E., SCALA, K. A., & SCALA, W. A. Manifestações orais associada ao Papilomavírus Humano (HPV) conceitos atuais: revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.70, p. 546-550, 2004.

COSTA, C.H.N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, p.232-242, 2011

DE LEMOS, C. T; ERDTMANN, B. Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 467.1, p. 1-9, 2000.

DE OLIVEIRA, L. R. C., CEZÁRIO, G. A. G., DE LIMA, C. R. G., NICOLETE, V. C., PERESI, E., DE SÍBIO, M. T., & CALVI, S. A. DNA damage and nitric oxide production in mice following infection with *L. chagasi*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 723, p. 177-181, 2011.

DINIZ, S. A., SILVA, F. L., NETA, A. C. C., BUENO, R., GUERRA, R. M., ABREU-SILVA, A. L., & SANTOS, R. L. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, p. 024-033, 2008.

FAIRBAIRN, DARYL W.; OLIVE, PEGGY L.; O'NEILL, KIM L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 339, p. 37-59, 1995.

225 FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation**
 226 **Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455,
 227 n.1-2, p.81-95, 2000.

228 FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: A Arte Do Diagnóstico**. Grupo Gen-
 229 Editora Roca Ltda, 2000.

230 GROVER, R. Improving the safety of aesthetic surgery: Recommendations
 231 following a 14-year review of cases referred to the Medical Defence Union from
 232 across the United Kingdom (1990–2004). **Clinical Risk**, v. 15, p. 241-243, 2009.

233 HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation**
 234 **Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.18, n.
 235 2, p.187-190, 1973.

236 IKEDA-GARCIA, F. A., LOPES, R. S., MARQUES, F. J., DE LIMA, V. M. F.,
 237 MORINISHI, C. K., BONELLO, F. L., & FEITOSA, M. M. Clinical and
 238 parasitological evaluation of dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania)
 239 chagasi submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Veterinary**
 240 **Parasitology**, v. 143, p. 254-259, 2007.

241 KOCYIGIT. A, KELES.H, SELEK.S, GUZEL.S, CELIK.H, EREL.O. 2005.
 242 Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous
 243 leishmaniasis. **Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental**
 244 **Mutagenesis**. v. 585, p. 71-78, 2005.

245 LEE, R. F., & STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet
 246 assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater)
 247 animals. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 544, n.1, p.43-
 248 64, 2003.

249 MATSUMOTO, S. T., MANTOVANI, M. S., MALAGUTTII, M. I. A., DIAS, A. L.,
 250 FONSECA, I. C., & MARIN-MORALES, M. A.
 251 Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as
 252 evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis*
 253 in lotic us and chromosome me aberrations in onion root-tips. **Genetics and**
 254 **Molecular Biology**, v. 29, p. 148-158, 2006.

255 MOUTSCHEN, J. **Introduction to Genetic Toxicology**. Wiley, 1985.

256 MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic
 257 organisms and the potential value of the comet assay in environmental
 258 monitoring. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of**
 259 **Mutagenesis**, v. 399, p. 135-147, 1998.

260 MCKELVEY-MARTIN, V. J., GREEN, M. H. L., SCHMEZER, P., POOL-ZOBEL,
 261 B. L., DE MEO, M. P., & COLLINS, A. The single cell gel electrophoresis assay
 262 (comet assay): a European review. **Mutation Research/Fundamental and**
 263 **Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.288, p. 47-63, 1993.

264 OLIVEIRA, R. J., SALLES, M. J. S., DA SILVA, A. F., KANNO, T. Y. N., DOS
 265 SANTOS LOURENÇO, A. C., FREIRIA, G. A., & MANTOVANI, M. S. Effects of
 266 the polysaccharide β -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute
 267 exposure to cyclophosphamide in mice. **Regulatory Toxicology and**
 268 **Pharmacology**, v. 53, p. 164-173, 2009.

269 RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.R.; MONTELEONE-NETO, R.
 270 Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação.
 271 Ribeirão Preto: **Sociedade de Genética/ Revista Brasileira de Genética**, v.
 272 1991, 1991.

273 ROTHFUSS, A., O'DONOVAN, M., DE BOECK, M., BRAULT, D., CZICH, A.,
 274 CUSTER, L., & KRAYNAK, A. R. Collaborative study on fifteen compounds in
 275 therat-liver Comet assay integrated into 2-and 4-week repeat-dose
 276 studies. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental**
 277 **Mutagenesis**, v.702, p. 40-69, 2010.

278 SALVADORI, D.; RIBEIRO, L.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células
 279 humanas in vitro. In: RIBEIRO, L. M.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K.
 280 **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da Ulbra. 2003.

281 SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: **Chemical**
 282 **Mutagens**. Springer, Boston, MA, p. 31-53, 1976.

283 SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI,
 284 M.G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Leish Vet

guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 86, 2011.

TICE, R. R. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. **Environmental Mutagenesis**, v. 1995, 1995.

VALENTE, D., COSTA-AMARAL, I.C., CARVALHO, L. V. B. D., SANTOS, M. V. C. D., CASTRO, V. S. D., RODRIGUES, D. D. R. F., & MOREIRA, J. C. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina, **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, 2017.

ZAHA, A., FERREIRA, H. B., & PASSAGLIA, L. M. (2014). **Biologia Molecular Básic**. 3ª edição, Artmed Editora, Porto Alegre-RS, 2003.

ZAHA, A., FERREIRA, H. B., & PASSAGLIA, L. M. **Biologia Molecular Básica**. 5ª edição, Art med Editora, Porto Alegre-RS, 2014.

WALKER, J. A., BOREHAM, D. R., UNRAU, P., & DUNCAN, A. M. V. Chromosome content and ultrastructure of radiation-induced micronuclei. **Mutagenesis**, v.11, n.5, p.419-424, 1996.

2. CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÔMICA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL NATURALMENTE INFECTADOS

Polyana Mayume Pereira da Silva¹, Alda Izabel de Souza².

¹Discente do Programa de Pós-graduação Ciências Veterinária, FAMEZ/UFMS.

²Docente FAMEZ/UFMS.

RESUMO: Estabilidades genômicas já foram observadas em células de camundongos com leishmaniose visceral, entretanto esses efeitos ainda não foram descritos na espécie canina, considerada o principal reservatório da doença. Por isso o objetivo com este trabalho foi identificar a estabilidade genômica da leishmaniose visceral em cães infectados naturalmente. Um total de 32 cães participaram do estudo, sendo 24 animais assintomáticos, infectados naturalmente, e 8 não infectados, utilizados como grupo controle. Os testes de ensaio de cometa e micronúcleo foram realizados em células da medula óssea obtidas por meio de punção aspirativa. O teste de normalidade de D'Agostino com nível de significância de 0,05 foi empregado, seguido do teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$) para a comparação entre os grupos infectados e controle. No teste do ensaio do cometa foi possível observar um aumento na porcentagem de DNA na cauda das células danificadas ($p = 0,04$). No teste do micronúcleo foi detectado aumento no número de micronúcleo em eritrócitos policromatofílicos ($p = 0,0004$) no tecido medular do grupo infectados, quando comparados ao grupo controle. Esses resultados demonstram o potencial genotóxico e mutagênico da leishmaniose visceral nas células da medula óssea de cães infectados naturalmente e que pode estar associado a ação do protozoário no tecido.

Palavras-chaves: ensaio de cometa, genotoxicidade, LVC, teste de micronúcleo.

ABSTRACT: Genomic stability has already been observed in cells of mice with visceral leishmaniasis, however these effects have not yet been described in the canine species, considered the main reservoir of the disease. Therefore, the aim of this work was to identify the genomic stability of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs. A total of 32 dogs participated in the study, with 24 asymptomatic animals, naturally infected, and 8 uninfected, used as a control group. Comet and micronucleus assay tests were performed on bone marrow cells obtained by aspiration puncture. The D'Agostino normality test with a significance level of 0.05 was used, followed by the Mann-Whitney test ($p < 0.05$) for the comparison between the infected and control groups. In the comet assay test, it was possible to observe an increase in the percentage of DNA in the tail of the damaged cells ($p = 0.04$). In the micronucleus test, an increase in the number of micronucleus was detected in polychromatophilic erythrocytes ($p = 0.0004$) in the medullary tissue of the infected group, when compared to the control group. These results demonstrate the genotoxic and mutagenic potential of visceral leishmaniasis in the bone marrow cells of naturally infected dogs, which may be associated with the action of the protozoan in the tissue.

Keywords: comet assay, genotoxicity, LVC, micronucleus test.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma das zoonoses tropicais de maior negligência no mundo. Essa doença é causada, principalmente, pelo protozoário *Leishmania infantum* e transmitida por fêmeas de flebotomíneos infectadas (HALDAR et al., 2011). A doença apresenta altas taxas de incidência nas Américas, com 96% dos casos ocorrendo no Brasil (OPAS, 2019).

O cão é considerado o principal reservatório em ambientes urbanos pois, além de intenso parasitismo apresentam riscos para a saúde pública com o alto potencial de transmissão para seres humanos (ALBUQUERQUE et al. 2017). No cão a infecção pela *Leishmania infantum* desencadeia uma diversidade de respostas que podem variar da infecção assintomática ao desenvolvimento da doença ativa (SOLANO-GALLEGO, et al 2011; BRASIL, 2016).

A *L. infantum* provoca supressão da imunidade mediada por células, possibilitando a disseminação e multiplicação incontrolada do protozoário (BRASIL, 2014). A presença das formas de amastigotas no tecido aumenta a produção de óxido nítrico pelos macrófagos e induzem estabilidade genômica (DE OLIVEIRA et al., 2011). Esse mecanismo de indução de danos no DNA foi observado em leucócitos de camundongos infectados por *L. infantum* (DE OLIVEIRA et al. 2011; MOREIRA et al., 2017). Entretanto esses efeitos genotóxicos ainda não foram descritos em cães com LV. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade genômica em células da medula óssea de cães com leishmaniose visceral natural infectados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMS) sob o protocolo número 1.018/2019.

2.1 Amostras

A amostragem, por conveniência, totalizou a inclusão de 32 cães de ambos os sexos, sem restrição de raça e com idade entre 1 a 8 anos. Desses, 24 eram animais naturalmente infectados por *L. infantum*, assintomáticos e diagnosticados pelo teste imunocromatografico (DPP® LVC Bio-Manguinhos) e confirmação parasitológica, entregues ao Centro de Controle de Zoonose de Campo Grande, MS, para eutanásia, seguindo à Portaria Interministerial número 1.426, de 11 de julho de 2008.

Considerando a frequência de coinfeções na região, todos os animais foram submetidos ao teste de Reação de Cadeia Polimerase (PCR) para *Babesia canis* e *Ehrlichia* sp. e os animais positivos foram excluídos da amostragem. Campo Grande está em uma área não endêmica para *Trypanosoma cruzi* e *Dirofilaria immitis*, portanto infecções para esses agentes não foram investigadas. O grupo controle foi formado por 8 cães sem alterações clínicas e negativos pelo teste imunocromatografico (DPP® LVC Bio-Manguinhos).

Em todos os cães 2 ml de sangue medular foram coletados por punção do úmero proximal, com o auxílio de agulha tipo *Jamshidi*, seguindo-se os métodos preconizados por Grindem et al. (2009). O material amostrado foi utilizado na confecção de lâminas individuais para os testes de cometa e micronúcleo, seguindo a metodologia descritas abaixo para cada uma das análises.

2.2 Ensaio de cometa

Uma amostra de 20 µL, da diluição 1:400, das células medulares com solução fisiológica (aproximadamente 20.000 células nucleadas) foi usada para o ensaio do cometa, realizado de acordo com Oliveira et al. (2013). Posteriormente, as lâminas foram coradas com 100µL de brometo de etídio (200µg/ mL) antes da leitura.

O material foi analisado em microscópio invertido de fluorescência (Leica® Microsystems-DMi8), em objetiva de 40X, com filtro de excitação de 420-

490 nm e filtro de barreira de 520 nm. Um total de 200 células de cada indivíduo foi analisado utilizando o *software* CometScore© para avaliar a porcentagem do DNA na cauda e comprimento do cometa.

2.3 Teste de micronúcleo

Para avaliação da existência de micronúcleos utilizou-se o método descrito por Oliveira et al. (2009). As lâminas foram inicialmente coradas com 20 µL de laranja de acridina (1 mg / mL). Em seguida, 20 µL de sangue medular, de cada cão, foi depositado na lâmina, recoberto com lamínula e armazenados em freezer (-20 ° C) por um período mínimo de 15 dias. Após esse período as lâminas foram analisadas em microscopia de fluorescência (Nikon® – Eclipse E200) com um filtro de excitação de 420 a 490 nm e um filtro de barreira de 520 nm.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Médias e desvios padrões foram calculados para ambas as análises. Os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de D'Agostino. Para os testes de micronúcleo e ensaio de cometa os animais infectados foram comparados com o controle por teste de U de Mann-Whitney com nível de significância <0,05.

3. RESULTADOS

O ensaio do cometa identificou aumento na porcentagem de DNA na cauda das células danificadas ($p=0,04$), porém sem aumento no comprimento dos cometas ($p=0,06$). A investigação de danos ao DNA pelo teste do micronúcleo detectou um aumento no número de MNEPC ($p=0,0004$)

Os resultados obtidos a partir do teste do ensaio do cometa e teste do micronúcleo no tecido medular do grupo com LVC, quando comparados ao grupo controle podem ser observados na Tabela 1.

Tabela1. Resultados de m, desvio padrão e diferença estatística nos testes de ensaio de cometa e micronúcleo realizados em células medulares de cães com leishmaniose visceral e do grupo controle.

	Controle Mediana (DP)	Infectado Mediana (DP)	p-valor
(%) DNA na cauda	9,64±5,48	11,21±9,36	0,04*
Comprimento do cometa	29,5±2,34	33,34±8,17	0,06
MNEPC	15±5,17	79±61	0, 0004*

DP - Desvio padrão, MNEPC - micronúcleo em eritrócitos policromatofilicos, indica diferença estatística por teste de Mann- Whitney.

4.DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através do ensaio do cometa identificaram que, o protozoário responsável pela leishmaniose visceral exerceu atividade genotóxica nas células dos cães naturalmente infectados quando comparados com o controle. Estudos comprovam que dados referentes à porcentagem de DNA são mais sensíveis e menos variáveis que os parâmetro do comprimento do cometa, e portanto fornece uma estimativa mais fidedigna dos danos no DNA, independentemente, do tipo celular estudado (LEE et al., 2003; FUCHS et al., 2012; FROTSCHL et al., 2015).

A investigação de danos ao DNA pelo teste do micronúcleo detectou um aumento no número de MNEPC. Esse resultado indica dano permanente nos eritrócitos, ratificando a observação de Moreira et al. (2017), em camundongos infectados experimentalmente com *Leishmania (Leishmania) infantum*. Esse efeito pode ser atribuído aos mecanismos de tentativa de controle do parasito, que induz os macrófagos parasitados em aumentar a produção de óxido nítrico na tentativa de eliminar o parasita. Essa produção aumentada de óxido nítrico tem como efeito adverso a indução de lesões oxidativas no material genético (DE OLIVEIRA et al., 2011).

Segundo Heuser et al., (2008); Araldi et al., (2015) e OCDE (2016) o teste do ensaio do cometa e o teste do micronúcleo possuem a robustez, sensibilidade

e poder estatístico necessários para avaliar e identificar genotoxicidade. Por isso, os resultados obtidos no presente trabalho confirmam a genotoxicidade, nas células da medula óssea de cães naturalmente infectados, induzida pela infecção por *L. infantum*.

FENECH et al., 2011; MATZENBACHER et al. 2017, afirmam que a presença de micronúcleos pode ser considerado um biomarcador para a detecção de aberrações cromossômicas numéricas e quebras induzidas dos cromossomos em células que sofreram a ação de diferentes agentes. Reiteram também que essas células não são propensas a reparos e apresentam uma alta correlação com o risco de carcinogênese.

Esse é o primeiro estudo a investigar a capacidade da LVC em promover estabilidade genômica em células da medula óssea de cães infectados naturalmente. Os testes MN e EC contribuíram como biomarcadores de baixo custo na análise desses efeitos e pode ser recomendado, em estudos futuros, para investigação de associação de neoplasias em cães positivos para leishmaniose visceral.

5.CONCLUSÃO

O aumento da frequência de micronúcleos, e aumento de dano no DNA nas células da medula óssea confirmaram a atividade genotóxica da *L. infantum* em cães infectados naturalmente.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo fornecida e ao laboratório Centro de Estudos e Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen) do hospital Maria Aparecida Pedrossian, pelo apoio durante a pesquisa.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, K. C. O. D., VEIGA, A. D. S. S. D., BRIGIDO, H. P. C., FERREIRA, E. P. D. R., COSTA, E. V. S., MARINHO, A. M. D. R., & DOLABELA, M. F. Brazilian Amazon traditional medicine and the treatment of difficult to heal leishmaniasis wounds with *Copaifera*. ***Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine***, 8350320, v.2017 p.9, 2017.

ARALDI, R. P., DE MELO, T. C., MENDES, T. B., DE SÁ JÚNIOR, P. L., NOZIMA, B. H. N., ITO, E. T., & DE CASSIA STOCCO, R. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. ***Biomedicine & Pharmacotherapy***, v. 72, p. 74-82, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1ed., 5 reimpr., Brasília: **Ministério da Saúde**, p.120, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1ed. Atualizada Brasília: **Ministério da Saúde**, p.522, 2016.

DE OLIVEIRA, L. R. C., CEZÁRIO, G. A. G., DE LIMA, C. R. G., NICOLETE, V. C., PERESI, E., DE SÍBIO, M. T., ... & CALVI, S. A. DNA damage and nitric oxide production in mice following infection with *L. chagasi*. ***Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis***, v. 723, p. 177-181, 2011.

FRÖTSCHL, R. Experiences with the in vivo and in vitro comet assay in regulatory testing. ***Mutagenesis***, v. 30, p. 51-57, 2015.

FUCHS, R., STELZER, I., DREES, C. M., REHNOLT, C., SCHRAML, E., SADJAK, A., & SCHWINGER, W. Modification of the alkaline comet assay with human mesenchymal stem cells. ***Cell Biology International***, v.36, p. 113-117, 2012.

GRINDEM, C.B.; TYLER, R.D.; COWELL, R.L. A medula óssea. In: COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H.; DENICOLA, D.B. ***Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e Gatos***, v.3, p. 423-451, 2009.

552 HEUSER, V. D., DE ANDRADE, V. M., PERES, A., DE BRAGA, L. M. G. M., &
 553 CHIES, J. A. B. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage
 554 detected by micronucleus test and comet assay in mice peripheral blood
 555 cells. **Cell Biology International**, v. 32, p. 1223-1229, 2008.

556 HALDAR, A. K., SEN, P., & ROY, S. Use of antimony in the treatment of
 557 leishmaniasis: current status and future directions. **Molecular Biology**
 558 **International**, v.2011, 2011.

559 LEE, RICHARD F., AND SCOTT STEINERT. Use of the single cell gel
 560 electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and
 561 freshwater) animals. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**. v.
 562 544, p. 43-64, 2003.

563 MATZENBACHER, C. A., GARCIA, A. L. H., DOS SANTOS, M. S., NICOLAU,
 564 C. C., PREMOLI, S., CORRÊA, D. S., & KALKREUTH, W. DNA damage induced
 565 by coal dust, fly and bottom ash from coal combustion evaluated using the
 566 micronucleus test and comet assay in vitro. **Journal of Hazardous Materials**, v.
 567 324, p. 781-788, 2017.

568 MOREIRA, V. R., DE JESUS, L. C. L., SOARES, R. E. P., SILVA, L. D. M.,
 569 PINTO, B. A. S., MELO, M. N., & PEREIRA, S. R. F. Meglumine antimoniate
 570 (Glucantime) causes oxidative stress-derived DNA damage in BALB/c mice
 571 infected by *Leishmania (Leishmania) infantum*. **Antimicrobial Agents and**
 572 **Chemotherapy**, v. 61, p. 360-416, 2017.

573 OCDE, Test N° 489 **In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay**, 2016.
 574 Disponível em: <https://mutagenbrasil.org.br>. Acesso em: 03/01/2020.

575 OLIVEIRA, R. J., SALLES, M. J. S., DA SILVA, A. F., KANNO, T. Y. N., DOS
 576 SANTOS LOURENÇO, A. C., FREIRIA, G. A., & MANTOVANI, M. S. Effects of
 577 the polysaccharide β -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute
 578 exposure to cyclophosphamide in mice. **Regulatory Toxicology and**
 579 **Pharmacology**, v. 53, p. 164-173, 2009.

580 OLIVEIRA, R. J., SALLES, M. J. S., SILVA, A. F. D., KANNO, T. Y. N.,
 581 LOURENÇO, A. C. D. S., LEITE, V. D. S., & MANTOVANI, M. S. In vivo
 582 evaluation of the antimutagenic and antigenotoxic effects of β -glucan extracted

from *Saccharomyces cerevisiae* in acute treatment with multiple doses. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, p. 413-424, 2013.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Leishmaniasis**- informe epidemiológico das Américas. Informe de Leishmanioses. n.7, 2019

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 86, 2011.