



AVALIAÇÃO DE DANOS AO DNA EM TECIDOS DE RATOS WISTAR COM HIPERLIPIDEMIA INDUZIDA POR TILOXAPOL

Cleonice Hoffmann¹
Juliana Bondan²
Jean Fachini³
Júlia Unfer⁴
Joubert Aires de Sousa⁵
Jaqueline Nascimento Picada⁶

Resumo

A hiperlipidemia, caracterizada por níveis elevados de triglicerídeos no plasma e LDL-colesterol, acompanhada de níveis reduzidos de colesterol HDL, está frequentemente associada a um risco aumentado de doenças cardiovasculares. No entanto, poucos estudos têm mostrado os efeitos da hiperlipidemia na estabilidade genômica. O objetivo deste estudo foi avaliar os danos ao DNA causados pela hiperlipidemia induzida por tiloxapol. A instabilidade genômica foi avaliada em ratos Wistar, utilizando o ensaio cometa e o teste de micronúcleos. As análises bioquímicas confirmaram hiperlipidemia em ratos tratados com tiloxapol, acompanhada de hiperglicemia. Níveis elevados de creatinina e ureia foram observados, sugerindo lesão renal. O ensaio cometa indicou um aumento dos danos ao DNA em sangue, fígado e rins, mas não no tecido cerebral. No entanto, não houve aumento na frequência de micronúcleos. Esses achados indicam que a hiperlipidemia induzida por tiloxapol é capaz de aumentar a instabilidade genômica, o que está associada com maior risco de câncer. Portanto, este surfactante pode ser usado em modelos para avaliar novos fármacos hipolipidêmicos com propriedades quimiopreventivas associadas.

Palavras chave: ensaio cometa; genotoxicidade; hiperlipidemia; mutagenicidade; tiloxapol.

INTRODUÇÃO

O tiloxapol (Triton WR1339) é um surfactante não iônico que tem sido amplamente utilizado para induzir hiperlipidemia aguda em modelos animais, a fim de detectar fármacos naturais ou substâncias químicas com potencial hipolipidêmico (BALDISSERA et al., 2017). O objetivo deste estudo foi avaliar se a hiperlipidemia induzida por tiloxapol aumenta danos

1 Aluna do curso de graduação de Biomedicina – Bolsista FAPERGS - cleo2506@hotmail.com

2 Aluna do curso de graduação de Biologia – Bolsista FAPERGS – julianabondan@gmail.com

3 Aluno do curso de graduação de Biomedicina – Bolsista CNPq – jeanfachini@hotmail.com

4 Aluna do curso de graduação de Biomedicina – Voluntária – julia.unfer@hotmail.com

5 Aluno de Doutorado do Laboratório de Genética Toxicológica – airesjoubert@yahoo.com.br

6 Professor do PPGBIOSAÚDE – jnpicada@gmail.com

ao DNA, utilizando o ensaio cometa em vários tecidos eo teste de micronúcleo na medula óssea de ratos. O ensaio cometa detecta danos ao DNA, tais como quebras de fitas simples e duplas e danosácali-lábeis, enquanto que o teste de micronúcleo indica mutações cromossômicas induzidas por agentes clastogênicos e aneugênicos (TICE et al., 2000; MAVOURNIN et al. 1990). Estas avaliações podem revelar se a hiperlipidemia induzida por tiloxapol provoca instabilidade genômica.

METODOLOGIAS

Utilizaram-se 23 ratos Wistar machos com peso de 300-360 g. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Guia do Instituto Nacional de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (Publicações NIH No. 80-23) (revisado, 1996) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da ULBRA (protocolo número 2015-6P). Os animais foram divididos em quatro grupos (n = 5 animais por grupo) e receberam duas doses de 10 mL/kg (peso corporal), a primeira por gavagem eo segunda 150 min após a primeira por injeção intraperitoneal (ip), como se segue: PBS + PBS; PBS + T; Sim + PBS; Sim + T. As doses administradas foram tiloxapol 400 mg/kg e simvastatina 10 mg/kg. Vinte e quatro horas após a segunda administração, todos os ratos foram eutanaziados por decapitação para coleta de amostras biológicas. O ensaio de cometa alcalino foi conduzido como previamente descrito em Tice et al. (2000). Analisaram-se as imagens de 100 células selecionadas aleatoriamente, coradas com prata (50 células de cada duas lâminas replicadas) de cada tecido. Foram calculados o índice de danos (DI) e a frequência de danos (DF), ambos utilizados como parâmetros para avaliação genotóxica. O ensaio do micronúcleo foi realizado de acordo com as diretrizes internacionais descritas em Mavournin et al. (1990). Determinou-se a proporção de eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (PCE/NCE) em 1000 células. A incidência de micronúcleos foi observada em 2.000 EPC para cada animal usando microscopia óptica. Os dados obtidos foram analisados utilizando a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida dos testes de comparação múltipla de Tukey com significância estatística em $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis de CT, TG, glicose, albumina, creatinina e ureia aumentaram no grupo PBS + T quando comparados com o grupo PBS + PBS. O grupo Sim + T teve baixos níveis de CT e TG, em comparação com PBS + T, indicando um efeito hipolipidêmico (Tabela 1).

Tabela 1. Análises bioquímicas em soro coletadas 24 h após tratamento agudo com tiloxapol.

	PBS+PBS	PBS+T	Sim+PBS	Sim+T
CT (mg/dL)	85.7 ± 9.2	585.6 ± 55.7***	67.0 ± 3.7###	313.8 ± 71.5**##
HDL (mg/dL)	24.7 ± 1.2	28.0 ± 2.1	24.3 ± 0.7	26.3 ± 2.2
TG (mg/dL)	69.9 ± 12.0	1714.0 ± 123.8***	77.7 ± 10.9###	1278.0 ± 264.7***#
Glicose (mg/dL)	98.0 ± 5.7	241.9 ± 40.8**	87.4 ± 7.0##	207.4 ± 29.9 *
AST (U/L)	63.7 ± 9.7	58.3 ± 10.6	67.4 ± 6.7	56.1 ± 2.9
ALT (U/L)	94.9 ± 9.5	113.7 ± 4.5	104.0 ± 8.4	116.1 ± 14.3
ALP (U/L)	33.7 ± 4.4	41.1 ± 3.3	35.7 ± 5.6	32.4 ± 4.3
Albumina (g/dL)	2.18 ± 0.16	3.40 ± 0.42 *	2.22 ± 0.10#	3.16 ± 0.43
Creatinina (mg/dL)	1.24 ± 0.04	2.20 ± 0.14***	1.24 ± 0.02###	1.76 ± 0.19 *
Ureia (mg/dL)	35.1 ± 7.8	121.2 ± 34.5**	36.9 ± 7.6##	86.2 ± 4.9 *

N= 5 animais por grupo. Os dados foram expressos como médias ± erro padrão. *P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001 em comparação com o grupo PBS + PBS. #P <0,05; ## P <0,01; ### P <0,001 em comparação com o grupo PBS + T. ANOVA, teste de Tukey.

O grupo PBS + T apresentou aumento de danos ao DNA no sangue periférico (DI: p <0,05), fígado (DI e DF: p <0,001) e rins (DI: p <0,001; DF: p <0,01) em comparação ao grupo PBS + PBS (Tabela 2). O grupo Sim + T não apresentou diminuição significativa de danos ao DNA em comparação com o grupo PBS + T. No tecido cerebral, não foi observado aumento no dano ao DNA no grupo PBS + T, mas os valores de ID registrados para os grupos Sim + PBS e Sim + T foram elevados em comparação com o grupo PBS + PSB, indicando que a simvastatina induziu danos ao DNA independentemente da presença de tiloxapol.

Tabela 2. Ensaio cometa em vários tecidos de grupos de ratos Wistar tratados e não tratados com tiloxapol.

	Índice de danos Média ± DP	Frequência de dano Média ± DP
Sangueperiférico		
PBS+PBS	18.9±2.2	17.1±5.0
PBS+T	27.9 ±8.8 *	25.8±10.4
Sim+PBS	21.0±5.4	20.7±5.4
Sim+T	22.1±6.8	19.9±6.7
Fígado		
PBS+PBS	65.6±26.4	51.8±19.1
PBS+T	182.5±47.3***	89.0±7.4***
Sim+PBS	82.4 ±28.7###	62.0±16.6##

Sim+T	164.7±36.2 ***	82.7±4.9**
Rim		
PBS+PBS	109.2 ± 30.0	50.3 ± 17.3
PBS+T	179.8 ± 30.5**	74.2 ± 10.0*
Sim+PBS	125.0 ± 23.4 [#]	62.8 ± 6.0
Sim+T	131.3 ± 26.1	55.0 ± 7.0
Cérebro		
PBS+PBS	138.3±23.8	78.8±6.1
PBS+T	156.6±17.4	77.2±7.5
Sim+PBS	187.5±14.4**	87.3±11.3
Sim+T	186.3 ±12.3*	87.0±3.5

N = 5 animais por grupo. O índice de danos pode variar de 0 (completamente intacto, 100 células × 0) a 400 (com danos máximos de 100 × 4). A frequência de dano foi calculada com base no número de células com cauda versus aquelas sem cauda. *P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001 em comparação com o grupo PBS + PBS. [#]P <0,05; ^{##} P <0,01; ^{###} P <0,001 em comparação com o grupo PBS + T. (ANOVA, teste de Tukey).

Não houve aumento do MNPCE em nenhum dos grupos estudados, com exceção do grupo controle ciclofosfamida. A relação EPC/ENC foi semelhante para todos os grupos, indicando falta de toxicidade na medula óssea após os tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação da atividade mutagênica em grupos de ratos Wistar tratados e não tratados com tiloxapol, utilizando o teste de micronúcleos na medula óssea.

Grupo de Tratamento	MNPCE ^a em 2.000 PCE	Relação PCE / NCE ^b
	Média ± DP	Média ± DP
PBS+PBS	6.2 ± 3.5	2.2 ± 0.9
PBS+T	7.4 ± 2.5	3.3±0.8
Sim+PBS	8.2 ± 2.6	3.0 ± 0.7
Sim+T	6.3 ± 1.5	2.4 ± 0.4
Ciclofosfamida ^c	21.0 ± 3.6 ***	2.4 ± 0.2

N = 5 animais por grupo. ^a MNPCE: micronúcleo em eritrócitos policromáticos. ^bRelação PCE / NCE: Relação eritrócitos policromáticos/eritrócitos normocromáticos. ^cPositivo de controle (40 mg kg⁻¹i.p., N = 3).*** P <0,001: diferença significativa em comparação com todos os outros grupos. (ANOVA, teste de Tukey).

CONCLUSÃO

Hiperlipidemia induzida por tiloxapol aumenta danos ao DNA em sangue, fígado e rins, mas não no tecido cerebral. A genotoxicidade parece estar associada ao aumento dos níveis de TG e CT, sugerindo que a hiperlipidemia induz danos ao DNA em diferentes tecidos. Em adição, o modelo de hiperlipidemia induzida por tiloxapol pode ser uma ferramenta na descoberta de novos alvos terapêuticos envolvendo moléculas com

propriedades hipolipidêmicas, hipoglicêmicas e quimiopreventivas combinadas, tornando este modelo promissor para futuras investigações.

REFERÊNCIAS

BALDISSERA, M.D.; SOUZA, C.F.; GRANDO, T. H.; DOLESKI, P.H.; BOLIGON, A.A.; STEFANI, L.M.; MONTEIRO, S.G. Hypolipidemic effect of β -caryophyllene to treat hyperlipidemic rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 390, n. 2, p. 215-223, 2017.

MAVOURNIN, K.H.; BLAKEY, D.H.; CIMINO, M.C.; SALAMONE, M.F.; HEDDLE, J.A. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v. 239, n. 1, p. 29-80, 1990.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Mutagen Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 21-206, 2000.