



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

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

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

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

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

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

⁶Professora do PPGBIOSAÚDE – jpicada@gmail.com

INTRODUÇÃO

O tioxapol (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 ao DNA, utilizando o ensaio cometa em vários tecidos e o teste de micronúcleo na medula óssea de ratos. O ensaio cometa detecta danos ao DNA, tais como quebras de fitas simples e duplas e danos álcali-lábeis, enquanto que o teste de micronúcleo indica mutações cromossômicas induzidas por agentes clastogênicos e aneugênicos. 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. 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 e a 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. 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).

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 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.

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 + PBS, indicando que a simvastatina induziu danos ao DNA independentemente da presença de tiloxapol.

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. ^aMNPCE: 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.

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

	Índice de danos	Frequência de dano
	Média ± DP	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.

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., 2017. Hypolipidemic effect of β-caryophyllene to treat hyperlipidemic rats, Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 390 215-223.
- MAVOURNIN, K. H.; BLAKEY, D. H.; CIMINO, M. C.; SALAMONE, M. F.; HEDDLE, J. A., 1990. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutat Res. 239 29-80.
- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, Environ. Mol Mutagen. 35 206-221.