

AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE DANOS EM DNA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ADMINISTRAÇÃO DE DOSES ELEVADAS DE VITAMINA D

Evaluation of DNA damage in mice submitted to the administration of elevated doses of vitamin D

Natália Cassettari de Carvalho¹, Maiara Pereira², Emanuel de Souza³, Vanessa Moraes de Andrade⁴.

¹Curso de Medicina da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

³Laboratório de Ensino em Análises Clínicas da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências da saúde. Av. Universitária, 1105
Universitário 88806000 - Criciúma, SC – Brasil. vma@unesc.net

Os gastos foram subsidiados pelo laboratório de Biomedicina Translacional da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

**DANOS EM DNA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À DOSES DE
VITAMINA D**

Resumo

A vitamina D é uma vitamina lipossolúvel que age nos seres humanos como hormônio e desempenha múltiplas ações como inibição da proliferação celular, inibição da angiogênese e apoptose. Embora tenha um perfil de segurança, pouco se sabe sobre a toxicidade quando suplementadas em doses superiores às recomendadas. O objetivo do estudo foi avaliar os níveis de danos em DNA de camundongos após à administração doses elevadas de vitamina D. Os animais receberam três doses de vitamina D (10.000UI) cada 15 dias durante 6 semanas. Em cada semana foi realizado o Ensaio Cometa, dosagem de vitamina D e ao final do experimento a dosagem de cálcio. Ocorreu aumento significativo nos níveis de danos ao DNA na 4ª, 5ª e 6ª semana em relação a 1ª semana, sem suplementação. Além do aumento significativo na curva de danos em 6h e 12h após a administração da vitamina D. Mesmo após o declínio nas horas posteriores, percebe-se que os níveis de danos não retornam ao nível basal e permaneceram bioacumulando. Em relação a dosagem sérica da vitamina D podemos observar o aumento significativo na 4ª e 6ª semana após administração da vitamina D, além do aumento significativo na dosagem do cálcio quando comparado ao grupo controle, o que estão associados com o aumento nos níveis de danos em DNA no Ensaio Cometa. Embora haja evidências que confirmem o potencial benéfico em doses adequadas da vitamina D na redução de danos ao DNA, estudos futuros são necessários para avaliar o bioacúmulo dela no organismo quando suplementada com doses em excesso.

Palavras chave: dano ao DNA; vitamina D3; colecalciferol; Ensaio Cometa

Abstract

Vitamin D is a fat-soluble vitamin that operates as a hormone in humans and performs multiple actions such as cell proliferation inhibition, angiogenesis inhibition and apoptosis. Although it has a safety profile, there is not enough data about its toxicity when supplemented at higher doses than recommended. The aim of this study was to evaluate the levels of DNA damage in mice after administration of high doses of vitamin D. The animals received three doses of vitamin D (10.000UI) every 15 days for 6 weeks. Each week the Comet Assay was performed, with vitamin D dosage and at the end of the experiment, calcium

dosage. There was a significant increase in the levels of DNA damage in the 4th, 5th and 6th week compared to the 1st week, without supplementation. In addition to the significant increase in the damage curve at 6h and 12h after vitamin D administration. Even after the decline in hours later, it is noticed that the damage levels do not return to the basal level and remain bioaccumulating. Regarding the serum dosage of vitamin D, we can observe the significant increase in the 4th and 6th week after administration of vitamin D, in addition to the significant increase in the dosage of calcium when compared to the control group, which are associated with increased levels of damage in DNA in the Comet Assay. Although there is evidence to endorse the potential benefit of adequate doses of vitamin D in decreasing DNA damage, further studies are needed to evaluate its bioaccumulation, when supplemented with high doses.

Keywords: DNA damage; vitamin D3; cholecalciferol; comet assay;

1. INTRODUÇÃO

A estabilidade genômica é vital para a saúde¹. Agentes ou processos como o estresse oxidativo, que aumentam os danos ao DNA ou inibem seu reparo, induzem encurtamento dos telômeros, mutações, alterações fenotípicas e apoptose. Como consequência desse processo ocorre o declínio funcional, envelhecimento, carcinogênese e doenças metabólicas^{1,2,3}.

Uma variedade de vitaminas interage significativamente para manter a estabilidade dos genomas nucleares e mitocondriais⁴, uma dessas é a vitamina D.

A vitamina D é uma vitamina lipossolúvel que age como um hormônio esteroide. Nos seres humanos, após a exposição à UVB ocorre a conversão de 7-desidrocolesterol em vitamina D na pele^{5,6}. A exposição de 10 a 15 min/dia da pele à radiação ultravioleta solar é suficiente para evitar a sua deficiência⁷.

A vitamina D interage com seus receptores presentes em diversos tecidos do organismo⁵ e desempenha múltiplas ações, como a inibição da proliferação celular, indução da diferenciação celular, inibição da angiogênese e apoptose^{8,9,10}. Além disso, há evidências de que a vitamina D pode atuar na redução da taxa de encurtamento dos telômeros¹¹⁻¹⁵ e alterações no DNA que causam instabilidade genômica¹⁶⁻²⁰.

A vitamina D está disponível em duas formas: ergocalciferol ou vitamina D₂ e colecalciferol ou vitamina D₃, que são biologicamente inativas e exigem ativação no fígado e rins^{21,22}. Após entrar na circulação sanguínea através da proteína de ligação (DBP), a vitamina D é metabolizada pela enzima vitamina D-25-hidroxilase (CYP2R1) no fígado em 25-hidroxivitamina D e metabolizada posteriormente no rim pela enzima 1 α -hidroxilase (CYP27B1) para a forma ativa, 1,25-di-hidroxivitamina D (calcitriol)^{5,23}. O receptor de vitamina D (VDR) está presente na maioria dos tecidos e células no corpo²⁴.

A vitamina D₂ pode ser obtida a partir de leveduras, plantas e cogumelos, já a vitamina D₃ pode ser encontrada naturalmente em óleo de fígado de bacalhau e peixes gordurosos como salmão e atum²⁵.

A deficiência e a insuficiência de vitamina D são um problema de saúde global²⁶. Isso se dá em razão da falta de conhecimento, pela maioria das crianças e adultos, de que a exposição solar é a principal fonte desta vitamina^{27,28}. A deficiência de vitamina D foi redefinida em 1998 como um nível

sanguíneo de 25(OH)D menor ou igual a 20 ng/mL²⁹, insuficiência de 21 a 29 ng/mL e suficiência de pelo menos 30 ng/mL para máxima saúde musculoesquelética⁸. Níveis séricos de cerca de 30 ng/mL (75 nmol/L) são considerados por muitos pesquisadores como ideal para a saúde³⁰. Estudos mostram que as concentrações de 25(OH)D de 40 a 60 ng/mL seriam as ideais, e que as concentrações até 100 ng/mL seriam seguras²⁶.

Essa deficiência resulta em anormalidades no metabolismo do cálcio, fósforo e ósseo⁸. Além da diminuição na eficiência de absorção intestinal de cálcio e fósforo da dieta, resultando em um aumento nos níveis de paratormônio (PTH)^{5,31}. Essa deficiência se manifesta classicamente como doença óssea (raquitismo ou osteomalácia), que é caracterizada pelo comprometimento da mineralização óssea³². Novos dados sugerem que os benefícios da vitamina D vão além dos ossos saudáveis, no entanto, a evidência dos benefícios não-esqueléticos da vitamina D não é tão forte quanto a evidência dos efeitos esqueléticos³².

Poucos alimentos contêm vitamina D, portanto, diretrizes recomendam a suplementação dessa vitamina em níveis toleráveis nos casos de pacientes diagnosticados com deficiência ou insuficiência³³. As necessidades de vitamina D são de 600 UI/dia para pessoas de 1-70 anos e de 800 UI/dia para pessoas acima de 70 anos, o que resulta em níveis séricos acima de 20 ng/mL, desde que haja um nível mínimo de exposição ao sol³⁴.

Embora a vitamina D tenha um perfil de segurança significativo³⁵, a ingestão em excesso é capaz de ocasionar toxicidade pelo aumento da absorção intestinal de cálcio e fósforo, causar hipercalcemia, hipercalciúria e hiperfosfatemia e resultar em fraqueza, calcificações de tecidos moles, incluindo-se vasculares, nefrolitíase³⁶, algumas vezes coma e até óbito³⁷. Com base na literatura, verifica-se que a toxicidade é um evento raro causado por ingestão inadvertida ou intencional de quantidade excessivamente alta de vitamina D⁸.

Considerando diversas evidências benéficas disponíveis sobre a suplementação com a vitamina D, observa-se poucos estudos negativos e falta de avaliação do potencial de toxicidade da suplementação de vitamina D em doses superiores às normalmente recomendadas. Portanto, o presente trabalho buscou analisar a suplementação de uma dose elevada de vitamina D, administrada com intervalos de 15 dias, sob parâmetros de danos em DNA,

níveis séricos de vitamina D e de cálcio.

2. MÉTODOS

2.1 Aspectos Éticos

Este projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC – Criciúma/SC/Brasil sob protocolo 075/2019-1. Todos os experimentos respeitaram estritamente os princípios éticos na experimentação animal. Todos os procedimentos foram realizados conforme RDC nº 306/2004 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

2.2 Caracterização dos Animais

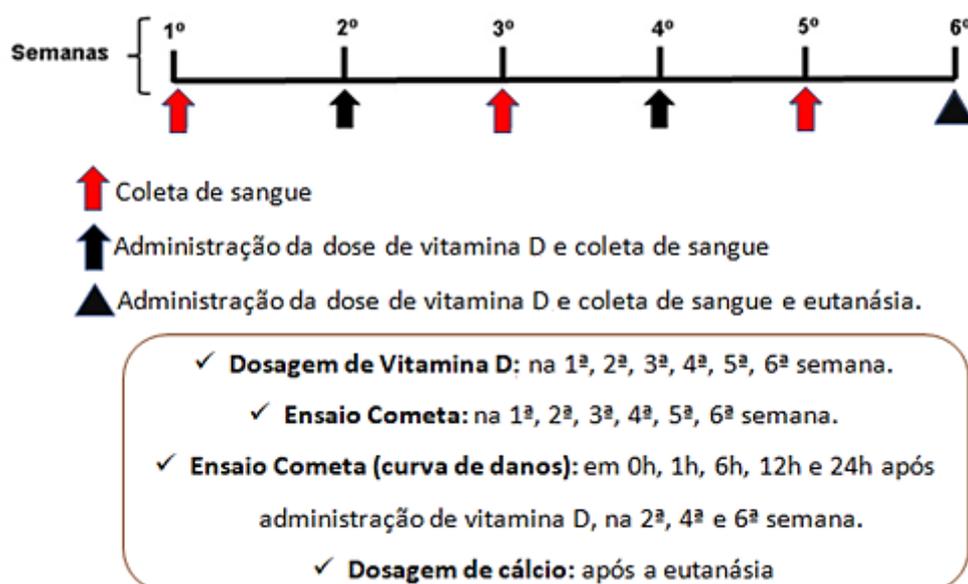
Foram utilizados 6 camundongos *Swiss* machos provenientes do Centro de Experimentação Animal (CEA) da UNESC. Além disso, foram utilizados mais 6 camundongos *Swiss* somente para a dosagem de cálcio (grupo controle cálcio). Estes foram alojados em caixas de polietileno, alimentados com a ração padrão para roedores e água *ad libitum*, mantidos em um ciclo de 12 horas claro-escuro, com temperatura controlada de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.3 Desenho Experimental

Os animais receberam três doses de vitamina D (10.000UI) via gavagem no período de seis semanas, com intervalo de duas semanas entre cada administração. Durante esse período, a cada semana foi realizada uma coleta de sangue para a dosagem de vitamina D e para a realização do Ensaio Cometa. A coleta de sangue foi de $500\mu\text{L}$ para a dosagem da vitamina D via retro-orbital e para a realização do Ensaio Cometa foi de $20\mu\text{L}$ de sangue via veia caudal. Além disso, também foi realizado uma curva de análises de danos em DNA em diferentes horários (0h, 1h, 6h, 12h, e 24h) após cada administração de vitamina D para verificar se houve dano à molécula de DNA ao longo da sua metabolização nas primeiras 24 horas. No final da 6ª semana, foi realizada a coleta de sangue ($20\mu\text{L}$) da veia caudal para realizar o Ensaio Cometa, coleta de sangue ($500\mu\text{L}$) via retro-orbital para a dosagem de cálcio e $500\mu\text{L}$ de sangue via retro-orbital para a dosagem da vitamina D. Também foi realizado a coleta de sangue ($500\mu\text{L}$) via retro-orbital do grupo controle de cálcio. Em seguida os

animais foram eutanasiados. (Figura 01).

Figura 01. Desenho experimental



Para melhor entendimento dos procedimentos experimentais, segue abaixo a descrição detalhada de cada semana:

1ª semana: foi realizado a coleta de sangue dos camundongos para dosagem dos níveis basais de vitamina D (prévia ao início da suplementação) e para análise dos níveis basais de danos em DNA pelo Ensaio Cometa.

2ª semana: foi realizado a administração da vitamina D (10.000UI) via gavagem, logo em seguida foi realizado a coleta de sangue dos animais em 0h, 1h, 6h, 12h e 24 horas após a administração da vitamina D para a análise dos danos em DNA pelo Ensaio Cometa e após 24h foi coletado sangue dos animais para a dosagem de vitamina D.

3ª semana: foi realizado a coleta de sangue dos camundongos para dosagem de vitamina D e para análise dos danos em DNA pelo Ensaio Cometa.

4ª semana: foi realizado a administração da vitamina D (10.000UI) via gavagem, logo em seguida foi realizado a coleta de sangue dos animais em 0h, 1h, 6h, 12h e 24 horas após a administração da vitamina D para a análise dos danos em DNA pelo Ensaio Cometa e após 24h foi coletado sangue para a dosagem de vitamina D.

5ª semana: foi realizado a coleta de sangue dos camundongos para dosagem de vitamina D e para análise dos danos em DNA pelo Ensaio Cometa.

6ª semana: foi realizado a administração da vitamina D (10.000UI) via gavagem, logo em seguida foi realizado a coleta de sangue em 0h, 1h, 6h, 12h e 24 horas após a administração da vitamina D para a análise dos danos em DNA pelo Ensaio Cometa e após 24h foi coletado sangue para a dosagem de vitamina D e de cálcio. A dosagem de cálcio foi realizada somente na última semana do experimento pois era necessário grande volume de sangue (via retro-orbital) para avaliar os níveis de vitamina D e níveis de cálcio. Após todos estes procedimentos os animais foram eutanasiados.

2.4 Vitamina D₃

A vitamina D (1,25 (OH) 2D₃, Vida Nature/Criciúma, Brasil) em sua forma ativa foi administrada via gavagem três vezes no período de seis semanas, com intervalo de duas semanas a cada administração. A dose testada de vitamina D foi de 10.000UI³⁸. O volume administrado da solução foi de 0,1mL (100µL) a cada 10g de peso corporal. Os animais foram pesados antes de cada administração para calcular o volume a ser administrado.

2.5 Dosagem de Vitamina D

Foram coletados 500µL de sangue via retro-orbital dos animais, o sangue foi colocado em eppendorfs de 2mL e imediatamente centrifugado a 6000xg por 10 minutos para a separação do soro. O soro foi acondicionado sob refrigeração a $\pm 4^{\circ}$ C e posteriormente enviado ao laboratório. A vitamina D foi analisada pelo laboratório Pasteur (Criciúma/SC), através dos níveis de 25-hidroxivitamina D (25OHD) nas amostras sorológicas dos camundongos. Esta análise foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), método ideal para a dosagem de 25(OH)D₃³⁹.

2.6 Dosagem de Cálcio

Foram coletados 500µL de sangue pela via retro-orbital dos animais que receberam o tratamento com a vitamina D para a dosagem de cálcio apenas na última semana, assim como também foram coletados 500µL de sangue via retro-orbital do grupo controle de cálcio. O sangue foi colocado em eppendorfs

de 2mL e imediatamente centrifugado a 6000xg por 10 minutos para a separação do soro. O soro foi acondicionado sob refrigeração a $\pm 4^{\circ}$ C e posteriormente enviado ao laboratório. Os níveis de cálcio foram analisados no soro dos camundongos pelo Método Enzimático-Colorimétrico (Trinder), no Laboratório de Ensino em Análises Clínicas (LENAC) da UNESC.

2.7 Ensaio Cometa

O emprego do Ensaio Cometa neste estudo seguiu os protocolos internacionais já estabelecidos para a sua realização⁴⁰. O preparo das lâminas foi realizado a partir da mistura de 20 μ L de sangue com 90 μ L de agarose Low Melting Point (0,75%). Colocou-se então, tal mistura (células/agarose) em lâmina de microscópio pré-revestida com 300 μ L de agarose normal (1,5%), cobrindo posteriormente com uma lamínula e levando, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos para solidificação. Logo após, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 2 semanas. Após este período, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos para que ocorra o desenovelamento do DNA. Realizou-se a corrida eletroforética a 25v e 300mA por 15 minutos. Todas as etapas ocorreram sob luz amarela indireta. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado com brometo de etídio (20 μ g/mL) para análise em microscópio de fluorescência com aumento de 400x.

Foi realizada avaliação de 100 células por indivíduo e por tecido (50 células em cada lâmina duplicada). Tais células foram avaliadas visualmente, sendo classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda, sendo a classificação para ausência de cauda considerada 0, até 4 para o comprimento máximo de cauda⁴¹. Desta forma, tem-se um Índice de Danos (ID) para cada animal variando de zero (100 X 0 = 0; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 (100 X 4 = 400; 100 células observadas com dano máximo). Calcula-se a frequência de danos (FD em %) em cada amostra com base no número de células com cauda versus o número de células sem cauda.

Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas.

2.8 Análise Estatística

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, a normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk. As análises estatísticas do Ensaio Cometa e da dosagem de vitamina D foram feitas através do teste de análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo *post hoc* Tukey. Em caso de dados não-paramétricos foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo *post hoc* Dunn's. A análise da dosagem de cálcio foi realizada através do Teste *t-student* e a correlação entre os níveis séricos de vitamina D e do índice de danos foi feita por meio do teste da correlação de Pearson. O pacote estatístico utilizado foi o Graph Pad Prism versão 8.4.3.

3. RESULTADOS

3.1. Análise dos níveis de dano em DNA durante as 6 semanas de experimento.

No Ensaio Cometa foram avaliados danos ao DNA nas células de sangue periférico dos camundongos tratados com 3 administrações de 10.000UI de vitamina D durante seis semanas. Os resultados estão apresentados na Figura 2.

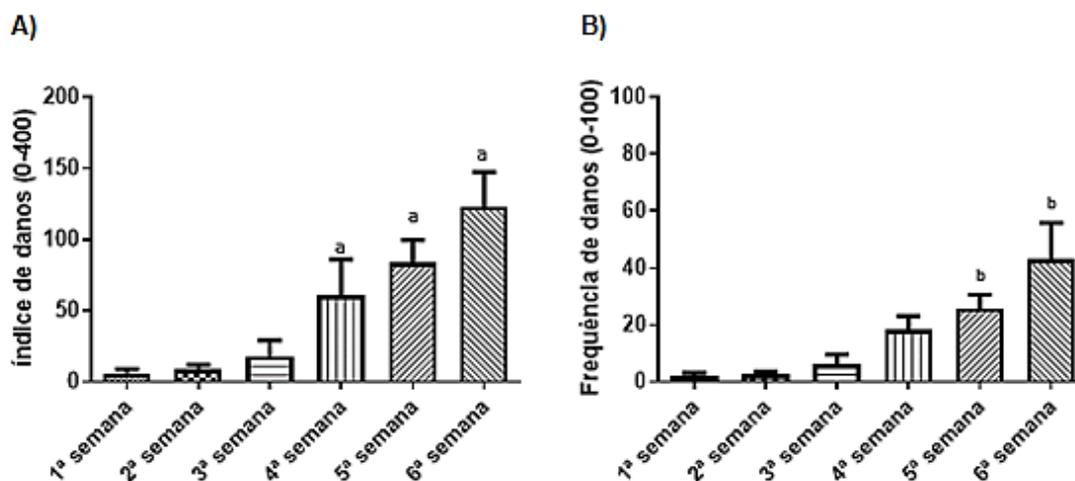


Figura 02: (A) valores referentes ao índice de danos no DNA e (B) valores referentes a frequência de danos no DNA de células sanguíneas de camundongos durante as 6 semanas de experimento.

Na 1^a, 3^a e 5^a não foi realizado a suplementação com a vitamina D, foi realizado somente a coleta de 20µL de sangue via veia caudal para avaliar ID e FD.

Na 2^a, 4^a e 6^a semana foi administrado a vitamina D (10.000UI) via gavagem e 24h após a administração foi realizado a coleta de sangue para avaliar o ID e FD.

^a Diferença significativa em relação a 1^a semana com $p < 0,05$ (análise de variância unilateral (ANOVA), seguido pelo *post hoc* de Tukey).

^b Diferença significativa em relação a 1^a semana com $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido pelo *post hoc* de Dunn's).

Em relação ao índice de danos (ID), parâmetro que avalia a severidade dos danos no DNA no Ensaio Cometa, as células sanguíneas de camundongos que receberam administrações de vitamina D ao longo das seis semanas mostraram um aumento significativo nesse parâmetro na 4^a, 5^a e 6^a semana em relação a 1^a semana, com $p < 0,05$ (Figura 02.A). Já em relação à frequência de danos (FD), que mede a porcentagem de células com qualquer tipo de dano no DNA, em células sanguíneas de camundongos ao longo das seis semanas, apresentam um aumento significativo na FD na 5^a e 6^a semana em relação ao ID na 1^a semana com $p < 0,05$ (Figura 02.B).

3.2. Curva de danos no DNA após a primeira administração de Vitamina D na 2^a semana do experimento.

No Ensaio Cometa foram analisados os danos ao DNA (em 0h, 1h, 6h, 12h e 24h) nas células de sangue periférico dos camundongos após a administração de vitamina D na dose de 10.000UI na segunda semana do experimento. Os parâmetros avaliados foram índice de danos (ID) e frequência de danos (FD).

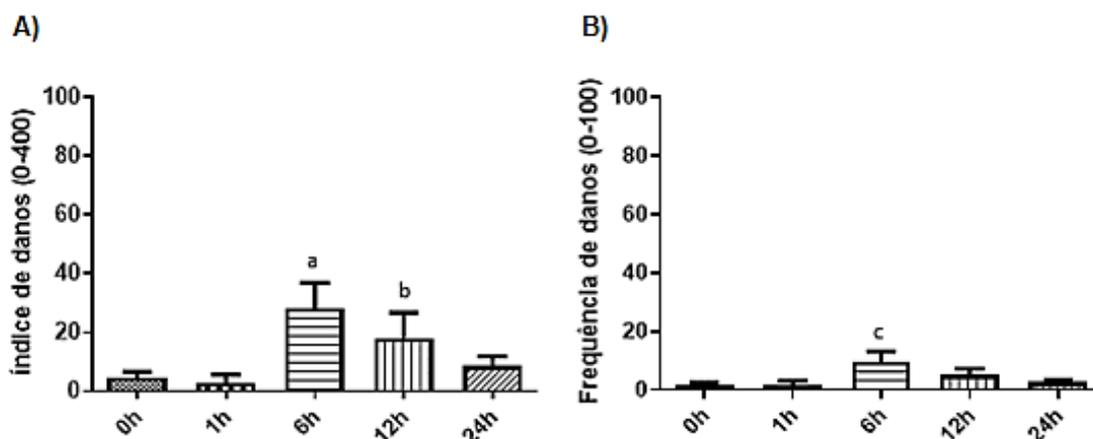


Figura 03: (A) valores referentes ao índice de danos no DNA e (B) valores referentes a frequência de danos no DNA em células sanguíneas de camundongos tratados com 10.000UI de vitamina D na 2ª semana do experimento.

^a Diferença significativa em relação a 0h e 1h com $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido pelo *post hoc* de Dunn's).

^b Diferença significativa em relação a 1h com $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido pelo *post hoc* de Dunn's).

^c Diferença significativa em relação a 0h e 1h com $p < 0,05$ (análise de variância unilateral (ANOVA), seguido *post hoc* of Tukey).

Em relação a curva de danos ao longo da metabolização da vitamina D, pode-se observar que após 6h da administração houve um aumento significativo no índice de danos (ID) em relação a 0h e 1h ($p < 0,05$). Em 12h, observou ainda um aumento no ID em relação à 1h ($p < 0,05$). Após o aumento significativo às 6h e às 12h, observa-se a diminuição no índice de danos em 24h, evidenciando a atuação do sistema de reparo em relação aos danos causados (Figura 03.A). Em relação ao parâmetro Frequência de Danos (FD), podemos observar o aumento significativo de danos ao DNA após 6h da administração da vitamina D em relação a 0h e 1h ($p < 0,05$). Após isso, observamos a diminuição na FD no DNA em 12h e 24h ($p < 0,05$) (Figura 03.B).

3.3. Curva de danos no DNA após a segunda administração de Vitamina D na 4ª semana do experimento

No Ensaio Cometa foram analisados os danos ao DNA nas células sanguíneas em 0h, 1h, 6h, 12h e 24 horas após a segunda administração de vitamina D na dose de 10.000UI na quarta do experimento. Os parâmetros avaliados foram índice de danos (ID) e frequência de danos (FD).

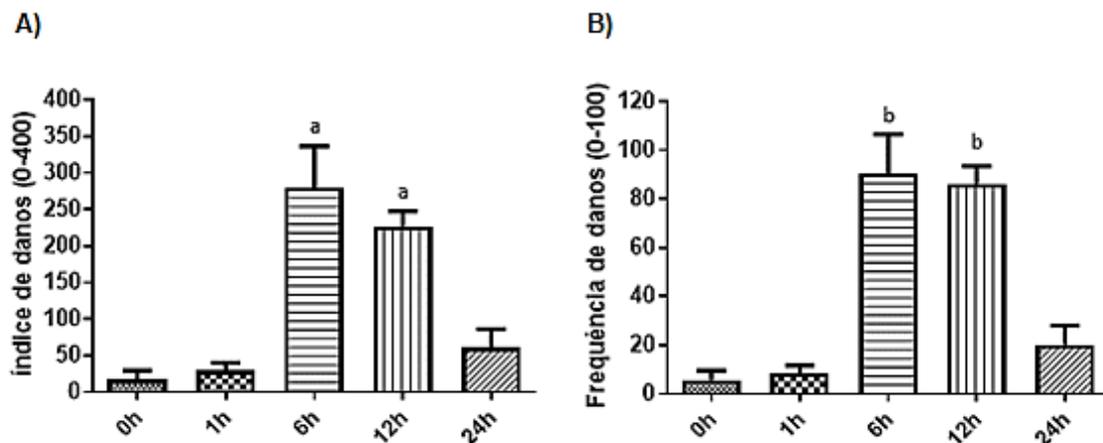


Figura 04: (A) valores referentes ao índice de danos no DNA e (B) valores referentes a frequência de danos no DNA nas células sanguíneas de camundongos tratados com 10.000UI de vitamina D na 4ª semana do experimento.

^a Diferença significativa em relação a 0h e 1h com $p < 0,05$ (análise de variância unilateral (ANOVA), seguido pelo *post hoc* de Tukey).

^b Diferença significativa em relação a 0h e 1h com $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido pelo *post hoc* de Dunn's).

Em relação a curva de danos ao longo da metabolização da vitamina D na 4ª semana de experimento, em 6h e 12h houve um aumento significativo no índice de danos (figura 04.A) e na frequência de danos (figura 4.B) em relação a 0h e 1h, com $p < 0,05$. Após esse aumento significativo observa-se a diminuição desses valores em 24h, evidenciando a atuação do sistema de reparo em relação aos danos causados (Figura 04. A e 04.B).

3.4. Curva de danos no DNA após a terceira administração de Vitamina D na 6ª semana do experimento

No Ensaio Cometa foi analisada a curva de danos ao DNA nas células de sangue dos camundongos tratados 10.000UI de vitamina D após a terceira administração, na sexta semana do experimento. Os parâmetros avaliados foram índice de danos (ID) e frequência de danos (FD).

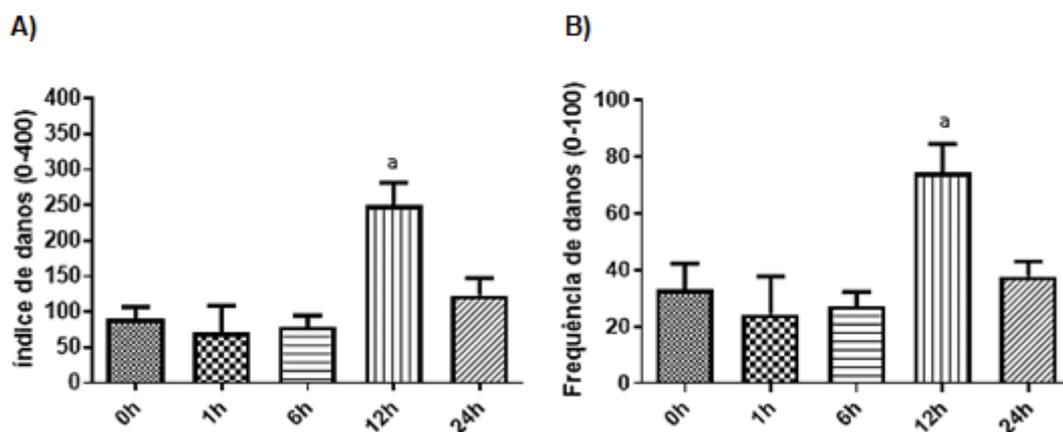


Figura 05: (A) valores referentes ao índice de danos no DNA e (B) valores referentes a frequência de danos no DNA nas células sanguíneas de camundongos tratados com 10.000UI de vitamina D na 6ª semana de experimento.

^a Diferença significativa em relação a 1h e 6h com $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido pelo *post hoc* de Dunn's).

Em relação a curva de danos ao longo da metabolização da vitamina D após a terceira administração, somente após 12h houve um aumento significativo no índice de danos (ID) em relação a 0h, 1h, 6h ($p < 0,05$). Após esse aumento significativo observou-se a diminuição no índice de danos em 24h, evidenciando a atuação do sistema de reparo em relação aos danos causados (Figura 05.A). No que se refere ao parâmetro FD, também observa-se o aumento significativo às 12h em relação a 0h, 1h, 6h ($p < 0,05$). Após o aumento, observa-se a diminuição da FD em 24h (Figura 05.B).

3.5. Dosagem de 25 Hidroxi Vitamina D (ng/mL)

A quantificação das concentrações de vitamina D sanguínea foi realizada através da análise dos níveis de 25-hidroxivitamina D (25OHD) nas amostras sorológicas dos camundongos durante seis semanas.

Coletas	25 Hidroxi Vitamina D
1ª semana	35,6 ± 3,3
2ª semana	77,4 ± 12,7
3ª semana	50,0 ± 12,0
4ª semana	156,0 ± 15,4*

5ª semana	122,7 ± 15,8
6ª semana	188,4 ± 8,2*

Tabela 01: Análise da concentração média (ng/mL) de 25 Hidroxi Vitamina D no soro dos camundongos tratados com 10.000UI de Vitamina D.

Na 1ª, 3ª e 5ª não foi realizado a suplementação com a vitamina D, foi realizado somente a coleta de 500µL de sangue via retro-orbital para dosagem da vitamina D.

Na 2ª, 4ª e 6ª semana foi administrado a vitamina D (10.000UI) via gavagem e 24h após a administração foi realizado a coleta de sangue para a dosagem da vitamina D.

*Diferença significativa em relação a 1ª semana com $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido pelo *post hoc* de Dunn's).

Em relação a quantificação das concentrações de vitamina D, podemos observar o aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis de 25-hidroxivitamina D (25OHD) nas amostras sorológicas dos camundongos na 4ª e 6ª semana em relação a semana 1 do experimento, onde não havia ainda a administração de vitamina D aos animais (Tabela 01).

3.6. Dosagem de Cálcio

Os níveis de cálcio foram analisados no soro dos camundongos tratados com 10.000UI de Vitamina D apenas após o término do experimento, pois era necessário coletar um grande volume de sangue (via retro-orbital) dos animais para realizar a dosagem de cálcio. Além disso, também foi realizado a dosagem do nível de cálcio dos animais do grupo controle.

Dosagem de cálcio	
Controle	10.000 UI de vitamina D
7,0 ± 1,0	10,5 ± 1,1*

Tabela 02: Análise da concentração média (mg/dL) de cálcio no soro dos camundongos tratados com 10.000UI de Vitamina D.

*Diferença significativa em relação ao controle com $p < 0,05$ (Teste *t-student*).

Em relação a análise da concentração média de cálcio no soro dos camundongos, podemos observar um aumento significativo dos níveis de cálcio

em relação ao grupo controle após as 6 semanas de experimento, evidenciando maior concentração de cálcio após a administração de doses de vitamina D (Tabela 02).

3.7. Correlação entre o índice de danos (ID) e os níveis séricos de vitamina D durante as 6 semanas de suplementação.

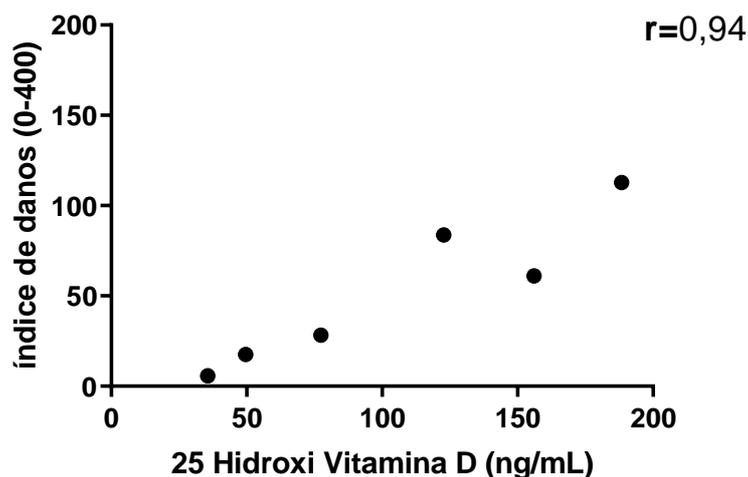


Figura 06: Correlação ilustrando a linearidade positiva com valor de $r=0,94$ entre o Índice de danos e os níveis séricos 25 hidroxi vitamina D (Pearson) .

Quando avaliado a correlação entre o índice de danos (ID) analisado na 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª e 6ª semana de experimento e os níveis séricos de 25 hidroxi vitamina D, também analisados na 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª e 6ª semana de experimento, observa-se uma linearidade positiva com valor de $r=0,94$, evidenciando que quanto maior o nível sérico de vitamina D, maior é o índice de danos ao DNA em células do sangue periférico de camundongos (Figura 06). A correlação foi feita apenas com o parâmetro do ID pois este é o parâmetro mais importante no Ensaio Cometa.

4. DISCUSSÃO

A vitamina D é um hormônio esteroide cuja principal função é a regulação do metabolismo ósseo⁴², do cálcio e fosfato^{5, 43}. É produzida, de forma endógena, nos tecidos cutâneos após a exposição solar⁴², ingerida de alimentos específicos ou suplementação²⁵. Além disso, estudos referem os benefícios da vitamina D na longevidade e na prevenção de várias doenças agudas e crônicas⁵.

Ainda é controverso quanta vitamina D é necessária, como deve ser administrada, ou seja, diária versus semanal ou mensal, e qual nível de 25 (OH) D sérico é ideal para a saúde imunológica e benefícios gerais para a saúde^{23, 8}. Permanece também controversa as informações sobre se o aumento do nível sérico de 25 (OH) D acima de 50 ng/mL leva a mais benefícios à saúde ou se se torna potencialmente prejudicial²³.

Embora a vitamina D tenha um perfil de segurança significativo, a ingestão excessiva de vitamina D por um período prolongado de tempo apresenta o risco de hipervitaminose D e subsequente toxicidade da vitamina D³⁵. A vitamina D nas formas de colecalciferol [vitamina D3] e ergocalciferol [vitamina D2] são vitaminas solúveis em gordura, com meia-vida longa no corpo inteiro (\approx 2 meses), e quando absorvidas no intestino são armazenadas em depósitos de gordura corporal e metabolizadas lentamente⁴⁴. Portanto, quando ingeridas em excesso, seus efeitos intoxicantes podem durar vários meses³⁵.

Os sintomas de intoxicação são inespecíficos, como náuseas, vômitos, fadiga, fraqueza, perda de peso, constipação, dor abdominal, polidipsia, poliúria, dor de cabeça, depressão ou apatia, confusão e desorientação^{45, 46, 44}. A hipercalcemia, hipercalcúria e hiperfosfatemia são complicações causadas pela intoxicação pela vitamina D^{5, 8, 47}.

Existem muitos fatores que contribuem para o dano ao DNA, dieta, estilo de vida, meio ambiente e capacidade de reparo¹. Os níveis de dano ao DNA refletem um equilíbrio entre a indução e o reparo do dano, e os mecanismos de reparo são normalmente regulados positivamente quando o dano ao DNA aumenta^{48, 49}. No que se refere à toxicidade de vitaminas nesse nível molecular, sabe-se que a vitamina C em altas doses mostra citotoxicidade em alguns contextos, induzindo danos ao DNA⁵⁰. No entanto, no que se refere à Vitamina D, sabemos surpreendentemente pouco sobre os mecanismos de toxicidade em nível de DNA⁴⁴.

No presente estudo, realizamos a administração de vitamina D em doses superiores às recomendadas a fim avaliar o potencial de toxicidade em nível de DNA. Podemos observar que ao longo das seis semanas de experimento os níveis de danos ao DNA das células sanguíneas dos camundongos aumentaram quando comparados a primeira semana, que demonstra o nível de dano basal, sem suplementação extra. E conforme foi

aumentando o acúmulo de vitamina D no organismo (com as doses subsequentes), observamos também o aumento nos níveis de dano em DNA em relação as semanas iniciais. De fato, a literatura científica evidencia o acúmulo da vitamina D na corrente sanguínea dos animais durante o experimento com base no seu tempo de meia-vida, que é cerca de 2 meses na circulação³².

Na 2^a, 4^a e 6^a semanas foram realizadas análises de curva de danos em 0, 1h, 6h, 12h e 24h após a administração da vitamina D (10.000UI) para observar em que horário seria maior o ID e FD de danos no DNA. Os níveis aumentados foram observados às 6h e 12h após a administração da dose elevada de vitamina D. Após o pico máximo de danos, ocorre o declínio no ID e FD nas horas posteriores evidenciando atuação do sistema de reparo, porém percebe-se que os valores no ID e FD não retornam ao nível de dano basal.

Conforme estudo realizado por Fagundes et al.⁵¹, observou-se redução no ID durante o tratamento diário de 4.000UI de vitamina D3 (25(OH)D) em pacientes portadores de DM2 durante 8 semanas. Além disso, através do teste do micronúcleo (MN), observou-se que a suplementação de vitamina D3 na dose utilizada não apresentou atividade mutagênica, mostrando ser benéfica no reparo de danos ao DNA quando suplementada nessa dose do estudo. Diferentemente, em nossos resultados observamos que a suplementação com doses elevadas de vitamina D, em um curto intervalo de tempo, parecem estar bioacumulando nas células sanguíneas de camundongos, aumentando os níveis de dano em DNA.

Ao interpretar os resultados deste estudo, é importante observar que a suplementação com doses elevadas (10.000UI) exibem respostas diferentes às doses recomendadas (4.000UI), sendo que a ingestão de doses em excesso pode apresentar efeitos deletérios. De acordo com Schwalfenberg⁵², tem havido preocupação expressa de que o consumo de doses excessivas de suplementos de vitamina D pode representar certos riscos e potencialmente conferir danos para indivíduos.

No presente estudo também foi realizado a dosagem da concentração sérica de 25(OH)D circulante. Conforme demonstrado em Lai⁴⁷, este é o melhor método para se avaliar a vitamina D. Pudemos observar o aumento significativo dos níveis de 25-hidroxivitamina D nas amostras sorológicas dos camundongos na 4^a e 6^a semana após a administração das doses de vitamina D, o que está

associado ao aumento no níveis de danos em DNA analisados no Ensaio Cometa.

Além disso, podemos observar que os níveis de cálcio sérico dosados aumentaram no final do experimento quando comparado ao grupo de animais que não receberam suplementação de vitamina D. Conforme demonstrado no estudo de Meerza⁵³, houve o aumento do nível sérico de cálcio no grupo de animais tratados com vitamina D em comparação com os níveis diminuídos no grupo de camundongos diabéticos, uma vez que a vitamina D desempenha papel na manutenção da homeostase do cálcio.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho contribuem para melhor compreensão em relação a administração de doses elevadas de vitamina D em camundongos, visto que isso provocou danos à molécula de DNA analisados através do Ensaio Cometa.

Embora haja diversas evidências na literatura que confirmam o potencial benéfico da vitamina D na redução de danos ao DNA em humanos quando suplementado em doses adequadas, pouco se sabe em relação a doses elevadas de vitamina D e dano ao DNA. Portanto, estudos como este geram hipóteses para o desenvolvimento de estudos futuros necessários para avaliar o bioacúmulo da vitamina D no organismo humano quando suplementada com doses elevadas e em curto espaço de tempo.

6. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi subsidiado pelo Laboratório de Biomedicina Translacional da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

7. REFERÊNCIAS

1. FERGUSON, Lynnette R. et al. Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2015. p. S5-S24.
2. RANI, Vibha et al. Oxidative stress and metabolic disorders: pathogenesis and therapeutic strategies. **Life sciences**, v. 148, p. 183-193, 2016.
3. LENART, Peter; KREJCI, Lumir. DNA, the central molecule of aging. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 786, p. 1-7, 2016.
4. VAN OMMEN, Ben et al. The Micronutrient Genomics Project: a community-driven knowledge base for micronutrient research. **Genes & nutrition**, v. 5, n. 4, p. 285, 2010.
5. HOLICK, Michael F. Vitamin D deficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 3, p. 266-281, 2007.
6. LAU, A. H.; HOW, P. P. The role of the pharmacist in the identification and management of secondary hyperparathyroidism. **US Pharm**, v. 32, n. 7, p. 62-72, 2007.
7. KIMLIN, Michael G. et al. The contributions of solar ultraviolet radiation exposure and other determinants to serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in Australian adults: the AusD Study. **American journal of epidemiology**, v. 179, n. 7, p. 864-874, 2014.
8. HOLICK, Michael F. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 7, p. 1911-1930, 2011.
9. MILCZAREK, Magdalena et al. Vitamin D analogs enhance the anticancer activity of 5-fluorouracil in an in vivo mouse colon cancer model. **BMC cancer**, v. 13, n. 1, p. 1-19, 2013.
10. SINTOV, Amnon C.; BERKOVICH, Liron; BEN-SHABAT, Shimon. Inhibition of cancer growth and induction of apoptosis by BGP-13 and BGP-15, new calcipotriene-derived vitamin D 3 analogs, in-vitro and in-vivo studies. **Investigational new drugs**, v. 31, n. 2, p. 247-255, 2013.
11. HOFFECKER, Brett M. et al. Systemic lupus erythematosus and vitamin D deficiency are associated with shorter telomere length among African Americans: a case-control study. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63725, 2013.
12. LIU, Jason J. et al. Plasma vitamin D biomarkers and leukocyte telomere length. **American journal of epidemiology**, v. 177, n. 12, p. 1411-1417, 2013.

13. PUSCEDDU, Irene et al. The role of telomeres and vitamin D in cellular aging and age-related diseases. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 53, n. 11, p. 1661-1678, 2015.
14. BEILFUSS, Julia; CAMARGO JR, Carlos A.; KAMYCHEVA, Elena. Serum 25-hydroxyvitamin D has a modest positive association with leukocyte telomere length in middle-aged US adults. **The Journal of nutrition**, v. 147, n. 4, p. 514-520, 2017.
15. MAZIDI, Mohsen; MICHOS, Erin D.; BANACH, Maciej. The association of telomere length and serum 25-hydroxyvitamin D levels in US adults: the National Health and Nutrition Examination Survey. **Archives of medical science: AMS**, v. 13, n. 1, p. 61, 2017.
16. DING, Shian-ling; SHEN, Chen-Yang. Model of human aging: recent findings on Werner's and Hutchinson-Gilford progeria syndromes. **Clinical Interventions in Aging**, v. 3, n. 3, p. 431, 2008.
17. GONZALEZ-SUAREZ, Ignacio et al. A new pathway that regulates 53BP1 stability implicates cathepsin L and vitamin D in DNA repair. **The EMBO journal**, v. 30, n. 16, p. 3383-3396, 2011.
18. LÓPEZ-OTÍN, Carlos et al. The hallmarks of aging. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1194-1217, 2013.
19. CHOW, Hei-man; HERRUP, Karl. Genomic integrity and the ageing brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 11, p. 672-684, 2015.
20. AUNAN, J. R. et al. Molecular and biological hallmarks of ageing. **British Journal of Surgery**, v. 103, n. 2, p. e29-e46, 2016.
21. KIMBALL, Samantha; FULEIHAN, Ghada El-Hajj; VIETH, Reinhold. Vitamin D: a growing perspective. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 45, n. 4, p. 339-414, 2008.
22. HOLICK, Michael F. The D-lightful vitamin D for child health. **Journal of parenteral and enteral nutrition**, v. 36, p. 9S-19S, 2012.
23. CHAROENNGAM, Nipith; SHIRVANI, Arash; HOLICK, Michael F. The ongoing D-lemma of vitamin D supplementation for nonskeletal health and bone health. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 26, n. 6, p. 301-305, 2019.
24. CHLEBOWSKI, Rowan T. et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of breast cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 22, p. 1581-1591, 2008.
25. CHAROENNGAM, Nipith; HOLICK, Michael F. Immunologic effects of vitamin D on human health and disease. **Nutrients**, v. 12, n. 7, p. 2097, 2020.

26. HOSSEIN-NEZHAD, Arash; HOLICK, Michael F. Vitamin D for health: a global perspective. In: **Mayo clinic proceedings**. Elsevier, 2013. p. 720-755.
27. LOOKER, Anne C. et al. Vitamin D status: United states, 2001–2006. **NCHS data brief**, v. 59, n. 59, p. 1-8, 2011.
28. HOLICK, Michael F. Biological effects of sunlight, ultraviolet radiation, visible light, infrared radiation and vitamin D for health. **Anticancer research**, v. 36, n. 3, p. 1345-1356, 2016.
29. MALABANAN, A.; VERONIKIS, I. E. Redefining vitamin D insufficiency. **The Lancet**, v. 351, n. 9105, p. 805-806, 1998.
30. LEHMANN, Bodo; MEURER, Michael. Vitamin D metabolism. **Dermatologic therapy**, v. 23, n. 1, p. 2-12, 2010.
31. LIPS, P. et al. The prevalence of vitamin D inadequacy amongst women with osteoporosis: an international epidemiological investigation. **Journal of internal medicine**, v. 260, n. 3, p. 245-254, 2006.
32. THACHER, Tom D.; CLARKE, Bart L. Vitamin D insufficiency. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2011. p. 50-60.
33. NAIR, Rathish; MASEEH, Arun. Vitamin D: The “sunshine” vitamin. **Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics**, v. 3, n. 2, p. 118, 2012.
34. LICHTENSTEIN, Arnaldo et al. Vitamin D: non-skeletal actions and rational use. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 5, p. 495-506, 2013.
35. RAJAKUMAR, Kumaravel; REIS, Evelyn Cohen; HOLICK, Michael F. Dosing error with over-the-counter vitamin D supplement: a risk for vitamin D toxicity in infants. **Clinical pediatrics**, v. 52, n. 1, p. 82-85, 2013.
36. MARKS, Robin et al. The effect of regular sunscreen use on vitamin D levels in an Australian population: results of a randomized controlled trial. **Archives of dermatology**, v. 131, n. 4, p. 415-421, 1995.
37. CHESNEY, Russell W. The five paradoxes of vitamin D and the importance of sunscreen protection. **Clinical pediatrics**, v. 51, n. 9, p. 819-827, 2012.
38. TABLAS, Mariana B. et al. Vitamin D₃ suppresses the early stages of chemically induced hepatocarcinogenesis in rats: a dose-response analysis. **Nutrire**, v. 43, n. 1, p. 1-8, 2018.
39. SCHUCH, Natielen Jacques; GARCIA, Vivian Cristina; MARTINI, Ligia Araújo. Vitamin D and endocrine diseases. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 625-633, 2009.
40. TICE, Raymond R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular**

mutagenesis, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

41. COLLINS, Andrew et al. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 30, n. 2, p. 139-146, 1997.

42. SCHALKA, Sergio; REIS, V. M. Sun protection factor: meaning and controversies. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 3, p. 507-15, 2011.

43. PRIETL, Barbara et al. Vitamin D and immune function. **Nutrients**, v. 5, n. 7, p. 2502-2521, 2013.

44. JONES, Glenville. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. **The American journal of clinical nutrition**, v. 88, n. 2, p. 582S-586S, 2008.

45. KAPTEIN, Sara et al. Life-threatening complications of vitamin D intoxication due to over-the-counter supplements. **Clinical Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 460-462, 2010.

46. ROSS, A. Catharine et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 1, p. 53-58, 2011.

47. LAI, Jeffrey KC et al. Hip fracture risk in relation to vitamin D supplementation and serum 25-hydroxyvitamin D levels: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials and observational studies. **BMC public health**, v. 10, n. 1, p. 1-17, 2010.

48. COLLINS, Andrew et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. **Mutation research/reviews in mutation research**, v. 759, p. 27-39, 2014.

49. SLYSKOVA, Jana et al. Both genetic and dietary factors underlie individual differences in DNA damage levels and DNA repair capacity. **DNA repair**, v. 16, p. 66-73, 2014.

50. KIM, Tae-Jun et al. Cellular toxicity driven by high-dose vitamin C on normal and cancer stem cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 497, n. 1, p. 347-353, 2018.

51. FAGUNDES, Gabriela Elibio et al. Vitamin D3 as adjuvant in the treatment of type 2 diabetes mellitus: modulation of genomic and biochemical instability. **Mutagenesis**, v. 34, n. 2, p. 135-145, 2019.

52. SCHWALFENBERG, Gerry K.; GENUIS, Stephen J. Vitamin D, essential minerals, and toxic elements: exploring interactions between nutrients and toxicants in clinical medicine. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

53. MEERZA, Dilnasheen; NASEEM, Imrana; AHMED, Jamal. Effect of 1, 25

(OH) 2 vitamin D3 on glucose homeostasis and DNA damage in type 2 diabetic mice. **Journal of diabetes and its complications**, v. 26, n. 5, p. 363-368, 2012.