

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CÂMPUS DE DRACENA**

João Rodolfo Domingues Mansano
Médico

**TOXICIDADE DA IVERMECTINA EM CÉLULAS DE
HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2)**

Dracena
Dezembro 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA

João Rodolfo Domingues Mansano

Médico

TOXICIDADE DA IVERMECTINA EM CÉLULAS DE
HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2)

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Unesp, Câmpus de Dracena como parte das exigências obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto

Dracena
Dezembro 2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvida pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação
Campus de Dracena

M286t

Mansano, João Rodolfo Domingues.

Toxicidade da ivermectina em células de hepatocarcinoma humano (HepG2). -- Dracena: [s.n.], 2022.

61 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2022.

Orientador: Fábio Erminio Mingatto

1. Avermectinas. 2. Fígado. 3. Citotoxicidade. 4. Mitochondria. I. Título.

Bibliotecário Fábio Sampaio Rosas
CRB 8/6665



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Dracena



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

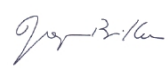
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: TOXICIDADE DA IVERMECTINA EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2)

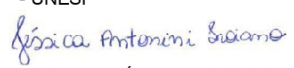
AUTOR: JOÃO RODOLFO DOMINGUES MANSANO

ORIENTADOR: FÁBIO ERMINIO MINGATTO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal, área: Produção Animal pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO (Participação Virtual)
Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - FCAT - UNESP - Dracena / FCAT/Dracena - Unesp


Profa. Dra. JAQUELINE DALBELLO BILLER (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal - DPA / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - FCAT - UNESP


Profa. Dra. JÉSSICA ANTONINI TROIANO (Participação Virtual)
Departamento de Medicina / UNIFADRA - Fundação Dracenense de Educação e Cultura

Dracena, 21 de dezembro de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

João Rodolfo Domingues Mansano, nascido em 13 de Janeiro de 1968, na cidade de Dracena, estado de São Paulo, filho de Delcinha Domingues Iglésias Mansano e João Mansano Thomé. Em Fevereiro de 1987 ingressou no curso de medicina na Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo-SP, curso que concluiu em 1992. No dia 2 de Dezembro de 1992, colou grau recebendo a graduação de Médico. Em Fevereiro de 1993 iniciou Residência Médica em Endoscopia Peroral, concluindo-a em 31 de Janeiro 1996. Recebeu o título de Especialista em Endoscopia Peroral (Endoscopia das Vias Aéreas e Endoscopia das Vias Digestivas Superiores) pela Associação Médica Brasileira e Sociedade de Endoscopia Peroral em 4 de Maio de 1996, homologado pela Associação Médica Brasileira em 7 de Maio de 1999. Também em 4 de Maio de 1996 recebeu o título de Especialista em Endoscopia Digestiva pela Associação Médica Brasileira e Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva, homologado pela Associação Médica Brasileira em 30 de Agosto de 2004. Em Fevereiro de 2019 ingressou como professor de tutoria do curso de Medicina da União das Faculdades de Dracena (UNIFADRA) cargo que ocupa até os dias atuais. Iniciou o curso de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Animal, em nível de mestrado, pela Universidade Estadual Paulista (UNESP) “Júlio de Mesquita Filho” em 1 de Março de 2021 – programa interunidades dos Câmpus de Ilha Solteira e Dracena, realizando estudos na área de “Bioquímica Metabólica e Toxicológica” sob a orientação do Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto. Foi aprovado em sua defesa de tese em 21 de Dezembro de 2022.

DEDICATÓRIA

À minha família que sempre me apoiou durante toda esta etapa. A meus filhos, João Victor Storto Mansano e Eduardo Storto Mansano, por entenderem pelos momentos de ausência e em especial à minha esposa Vanessa Cristina Storto Mansano por suportar os momentos de dificuldade, me encorajar e me confortar.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me permitiu ter saúde e paciência para concluir este desafio. A meus pais, Delcinha Domingues Iglésias Mansano e João Mansano Thomé (“in memoriam”) que me ensinaram a ser um homem íntegro, correto, paciente e trabalhador. À minha família que me incentivou e encorajou para concluir o mestrado.

À Camila Araújo Miranda pelo auxílio imprescindível nas análises e em especial ao Professor Doutor Fábio Erminio Mingatto pela orientação, paciência e dedicação que sempre apresentou durante todo o Mestrado.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT) que disponibilizou seus professores e área física para a realização desta pesquisa.

Aos Técnicos dos laboratórios da (FCAT) pelo auxílio nas análises.

“O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

EPÍGRAFE

“O primeiro dever da inteligência é desconfiar dela mesma.” (*Albert Einstein*).

RESUMO

A ivermectina (IVM) é um antiparasitário semissintético derivado da abamectina, uma das avermectinas naturais. Sua ação ocorre pela grande afinidade aos receptores de glutamato e do ácido gama-aminobutírico, encontrados no sistema nervoso central. O fígado, promove metabolização e excreção da IVM e por isso pode representar risco de toxicidade hepática. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da IVM em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) para elucidar os mecanismos relacionados à sua toxicidade. Foram avaliadas a citotoxicidade (proliferação, viabilidade, atividade metabólica e integridade da membrana celular), a atividade mitocondrial (potencial de membrana mitocondrial e concentração celular de ATP) e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON). As células HepG2 foram tratadas com 6 concentrações de IVM (1; 2,5; 5; 7,5; 10 e 25 μM), com 3 repetições e avaliações após 24 h e 48 h de incubação. A IVM levou à diminuição da proliferação celular iniciando a partir da dose de 1 μM , aumentando progressivamente de maneira dose e tempo dependentes. A atividade metabólica, avaliada pelo teste de MTT também apresentou diminuição dose e tempo dependentes, iniciando a partir da dose de 2,5 μM para os dois tempos analisados. O teste de exclusão do azul de tripan mostrou diminuição da viabilidade celular a partir de 2,5 μM no tempo de 24 h e em todas as dosagens testadas no tempo de 48 h. A IVM afetou a integridade das membranas celulares em todas as dosagens testadas tanto para o tempo de 24 h quanto para 48h. Foi observada também a diminuição do potencial de membrana mitocondrial a partir da dose de 5 μM para o tempo de 24 h enquanto que no tempo de 48 h o efeito ocorreu em todas as dosagens testadas. A concentração de ATP diminuiu a partir da dose de 5 μM para o tempo de 24 h. No tempo de 48 h a diminuição foi mais intensa, iniciando a partir de 1 μM , e tornando-se máxima a partir de 7,5 μM . A IVM estimulou a produção de ERON em todas as dosagens testadas, ultrapassando 50% de aumento a partir da dose de 7,5 μM no tempo de 24 h e 5 μM no tempo de 48 h. Os resultados mostram que a IVM apresenta sinais de citotoxicidade em células HepG2, desencadeados pela diminuição da atividade mitocondrial levando à diminuição da produção de ATP e, consequentemente, diminuindo a atividade metabólica, ocorrendo sincronicamente à elevação de ERON, que desencadeia o estresse oxidativo.

Palavras chave: Avermectinas. Fígado. Citotoxicidade. Mitocondria.

ABSTRACT

Ivermectin (IVM) is a semi-synthetic antiparasitic derived from abamectin, one of the natural avermectins. Its action occurs due to its great affinity to glutamate and gamma-aminobutyric acid receptors, found in the central nervous system. The liver promotes metabolism and excretion of IVM, representing a risk of toxicity to this organ. The aim of this study was to evaluate the effects of IVM on human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells to elucidate the mechanisms related to its toxicity. Cytotoxicity (proliferation, viability, metabolic activity and cell membrane integrity), mitochondrial activity (mitochondrial membrane potential and cellular ATP concentration) and accumulation of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) were evaluated. HepG2 cells were treated with 6 concentrations of IVM (1; 2.5; 5; 7.5; 10 and 25 μM), with 3 repetitions and evaluations after 24 h and 48 h of incubation. IVM led to a decrease in cell proliferation starting at a dose of 1 μM , progressively increasing in a dose and time dependent manner. The metabolic activity, evaluated by the MTT test, also showed a dose and time dependent decrease, starting from a dose of 2.5 μM for the two analyzed times. The trypan blue exclusion test showed a decrease in cell viability from 2.5 μM at 24 h and at all dosages tested at 48 h. IVM affected cell membrane integrity at all dosages tested for both 24h and 48h time. A decrease in the mitochondrial membrane potential was also observed from the dose of 5 μM to the time of 24 h while at the time of 48 h the effect occurred in all dosages tested. The ATP concentration decreased from the 5 μM dose to the 24 h time. In the time of 48 h the decrease was more intense, starting from 1 μM , and becoming maximum from 7.5 μM . The IVM stimulated the production of RONS in all tested dosages, surpassing 50% of increase from the dose of 7.5 μM in the time of 24 h and 5 μM in the time of 48 h. Results show that IVM presents cytotoxicity in HepG2 cells, triggered by a decrease in mitochondrial activity that leads to a decrease in ATP production and, consequently, a decrease in metabolic activity, occurring synchronously with the increase in RONS, that triggers oxidative stress.

Keywords: Avermectins. Liver. Cytotoxicity. Mitochondria.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\psi_m$	Potencial elétrico de membrana mitocondrial
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
CCCP	Carbonilcianeto-m-clorofenilhidrazona
CYP	Citocromo P450
CM-H ₂ DCFDA	(5,6-clometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, acetil éster)
DHL	Desidrogenase láctica
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPM	Erro padrão da média
ERON	Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio
FA	Fosfatase alcalina
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
GAMA-GT	Gama glutamil transferase
GLU	Glutamato
HepG2	Linhagem celular de Hepatocarcinoma Humano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IVM	Ivermectina
MDA	Malondialdeído
MEM	Meio "Minimum Essential Medium"
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
MTT	Corante Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2il) -2,5 difeniltetrazólio
ONU	Organização das Nações Unidas
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
SNC	Sistema Nervoso Central
SRB	Corante sulforodamina B
TMRM	Tetrametilrodamina metil éster
Tris	Tris-(hidroximetil) amino metano
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química das avermectinas naturais.	17
Figura 2 - Estrutura química da Abamectina.	19
Figura 3 - Estrutura química das Avermectinas e da Ivermectina.	20
Figura 4 - Representação esquemática do mecanismo de ação da ivermectina. Receptores de glutamato abrindo os canais de cloro causando hiperpolarização do neurônio.	21
Figura 5 - Biópsia de fígado humano após administração de 300 µg/kg de peso de ivermectina mostrando infiltrado inflamatório intralobular, macrófagos carregados com material ceróide, necrose confluyente perivenular e apoptose intralobular.	24
Figura 6 - Biópsia de fígado de ratos machos albinos, 24 horas após a última dosagem (8ª semana) de ivermectina (0,4mg/Kg de peso), mostrando áreas focais de necrose, caracterizadas pela perda de detalhes celulares, com núcleos picnócíticos ou ausência de núcleo.	26
Figura 7 - Visão microscópica das células HepG2 (utilizando objetiva com aumento 10x)	31
Figura 8 - Imagens representativas da câmara de Neubauer, utilizada para o teste de exclusão do azul de tripan.	35
Figura 9 - Diminuição da quantidade de proteína nas células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina	39
Figura 10 - Atividade metabólica das células HepG2, avaliada por meio da capacidade em reduzir o corante MTT, após exposição a diferentes concentrações de ivermectina	41
Figura 11 - Aumento da atividade da LDH (U/L) no meio de cultivo (extracelular) das células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina	43
Figura 12 - Diminuição da viabilidade das células HepG2 verificada pelo teste de exclusão do azul de tripan, após exposição a diferentes concentrações de ivermectina	45
Figura 13 - Potencial de membrana mitocondrial nas células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina	47
Figura 14 - Concentração de ATP nas células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina.	49
Figura 15 - Acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) nas células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina (1; 2,5; 5; 7,5; 10 e 25 µM) por 24 h (A) e 48 h (B).	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Avermectinas.....	17
3.2 Ivermectina.....	19
3.3 Toxicidade da Ivermectina.....	22
3.4 Fígado e Biotransformação de Xenobióticos.....	27
3.5 Estresse Oxidativo, Radicais Livres e Sistemas Antioxidantes	28
3.6 Células HepG2	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Reagentes.....	32
4.2 Cultura das Células HepG2.....	32
4.3 Ensaio de Citotoxicidade	33
4.3.1 Ensaio de Proliferação Celular	33
4.3.2 Ensaio de Atividade Metabólica Celular	33
4.3.3 Ensaio para Avaliação da Integridade da Membrana Celular.....	34
4.3.4 Ensaio de Viabilidade Celular pelo Teste de Exclusão do Azul de Tripan.....	34
4.4 Atividade Mitocondrial	35
4.4.1 Potencial de Membrana Mitocondrial	35
4.4.2 Determinação dos Níveis Celulares de ATP	36
4.5 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERON).....	36
4.6 Análise Estatística	37
5. RESULTADOS	38
5.1 Ensaio de Citotoxicidade	38
5.1.1 Efeito da Ivermectina Sobre a Proliferação Celular	38
5.1.2 Efeito da Ivermectina Sobre a Viabilidade das Células HepG2.....	40
5.1.3 Efeito da Ivermectina Sobre a Integridade da Membrana Celular	42
5.1.4 Ensaio de Viabilidade Celular pelo Teste de Exclusão do Azul de Tripan.....	44
5.2 Ensaio de Atividade Mitocondrial.....	46
5.2.1 Efeito da Ivermectina Sobre o Potencial de Membrana Mitocondrial	46
5.2.2 Efeito da Ivermectina na Concentração Celular de ATP	48

5.3 Efeito da Ivermectina Sobre a Produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio	50
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

Com o contínuo crescimento da população mundial as necessidades de alimentos também crescem continuamente. De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), já atingimos 8 bilhões e estima-se que em 2100 a população mundial superará 11 bilhões de pessoas. O Brasil desempenha importante papel sendo um dos principais produtores mundiais de alimentos, dentre eles a proteína animal. Segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) (2022), os principais produtores mundiais de carne bovina são Estados Unidos, Brasil, China e União Europeia, sendo que neste cenário o Brasil é ainda o maior exportador de carne bovina. Na produção de carne de frango, o Brasil é o terceiro maior produtor e o maior exportador segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) (2021).

Na produção animal, para se obter altas taxas de produtividade, se faz necessária a utilização de antiparasitários. O Brasil como grande produtor de proteína animal é, portanto, um grande consumidor de antiparasitários. O Brasil é o terceiro maior consumidor mundial de antiparasitários, em números absolutos, segundo dados da FAO (2020). Dentre os antiparasitários encontramos a ivermectina (IVM) que é um derivado semissintético da Abamectina, uma das avermectinas naturais, que são uma classe de substâncias que contém em sua estrutura química lactonas macrocíclicas. As avermectinas são produzidas a partir do processo de fermentação realizada pela bactéria *Streptomyces avermitilis* que é uma bactéria filamentosa gram positiva pertencente ao grupo *Actinomicetes* (LASOTA; DYBAS, 1991; LAING *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2008).

O mecanismo de ação da IVM ocorre por meio da afinidade pelos receptores de glutamato e do ácido gama-aminobutírico (GABA) causando morte por paralisia de vertebrados e invertebrados. A IVM é considerada droga segura, porém existem casos de toxicidade descritos. Como é lipofílica, pode se acumular em tecidos animais como tecido adiposo, fígado e rins. A biotransformação ocorre no fígado, pela via enzimática do citocromo P450 (CYP) e a excreção ocorre pelas fezes através dos ductos biliares (em torno de 98%) e pelos rins (cerca de 1-2%). Como a IVM passa pelo fígado onde é metabolizada e excretada, além de se acumular, ela representa risco potencial de

toxicidade a este órgão (LAING *et al.*, 2017; BATIHA *et al.*, 2020; RENDIC, 2021; CANGA *et al.*, 2009).

Apesar de ser considerada uma substância bastante segura para mamíferos, há casos de intoxicação relatados. A maioria destes casos refere-se a alterações no Sistema Nervoso Central (SNC) (CANGA *et al.*, 2009), relacionadas à afinidade da IVM pelos receptores glutamato e GABA (LAING *et al.*, 2017; BATIHA *et al.*, 2020). Em muitos desses casos observam-se também alterações nos níveis sorológicos de enzimas hepáticas como as aminotransferases, gama-glutamil transferase (GAMA-GT) e desidrogenase láctica (DHL). Além disso foram também relatados casos diretos de toxicidade hepática, com alterações laboratoriais e histológicas.

Existem diversos modelos experimentais celulares, disponíveis para avaliação da toxicidade hepática: fígado isolado perfundido, amostras de fatias de fígado, hepatócitos isolados, culturas primárias de hepatócitos e linhagens celulares hepáticas (GUILLOUZO, 1998). Dentre esses modelos, aqueles com hepatócitos isolados são considerados ideais, porém seu uso é limitado pela baixa disponibilidade, altos custos, vida limitada, qualidade e variabilidade elevada entre as amostras. No entanto, as linhagens celulares apresentam robustez e reprodutibilidade dos estudos. Existem várias linhagens celulares derivadas de fígado humano disponíveis, dentre elas as células HepG2, que são células imortalizadas, derivadas de um carcinoma hepático que mantêm as principais funções metabólicas dos hepatócitos e propiciam o estudo de mecanismos de toxicidade hepática (TOLOSA *et al.*, 2013; CHOI *et al.*, 2014).

Devido à grande utilização da IVM, seja no tratamento de parasitoses em animais e humanos, além de sua utilização como droga antineoplásica (JUAREZ; SCHCOLNIK-CABRERA; DUEÑAS-GONZALES, 2018), ou em casos de infecções virais (dentre elas a COVID-19), aliado à possibilidade de toxicidade hepática, ainda pouco estudada, encontramos a justificativa para a realização desta pesquisa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade do antiparasitário ivermectina em células HepG2.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a citotoxicidade da ivermectina nas células HepG2;
- Analisar o efeito da ivermectina na atividade mitocondrial das células HepG2;
- Verificar se há acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) após a exposição das células HepG2 à ivermectina.

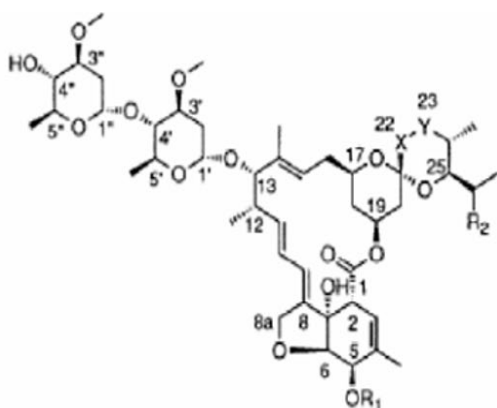
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Avermectinas

As avermectinas são lactonas macrocíclicas produzidas a partir do processo de fermentação realizada pela bactéria *Streptomyces avermitilis*. Ela é uma bactéria filamentosa, gram positiva, que pertencente ao grupo *Actinomicetes*. Foi descoberta na década de 70, pelo microbiologista Satoshi Omura em Kawana, cidade de Ito, na costa leste da ilha de Honshu, Japão, em solo próximo a campos de Golfe. Do solo, ele isolou o *Streptomyces avermitilis* em culturas realizadas no instituto Kitasato, Tóquio. O *Streptomyces avermitilis* foi adquirido e enviado para análises e desenvolvimento aos laboratórios “Merck Sharp and Dohme Research” (LASOTA; DYBAS, 1991; LAING *et al.*, 2017).

A fermentação da *Streptomyces avermitilis*, produz uma mistura com 4 compostos naturais, constituída por 2 pares homólogos que são as avermectinas A1, A2, B1 e B2, sendo que cada uma delas apresenta 2 variantes, “a” e “b”. Os homólogos A apresentam ligados ao carbono 5, um grupo metoxi, enquanto que os homólogos B apresentam no mesmo carbono 5, um grupo hidroxila. A subscrição 1 indica que há uma dupla ligação entre os carbonos 22 e 23, enquanto que a subscrição 2 indica que há um hidrogênio ligado ao carbono 22 e um grupo hidroxila ligado ao carbono 23. A variante “a” indica que há um grupo secbutil ligado ao carbono 25, enquanto que a variante “b” indica que há um grupo isopropil ligado ao mesmo carbono (Figura 1) (LASOTA; DYBAS, 1991; LAING *et al.*, 2017; GERENUTTI; SPINOSA, 1997; BATIHA *et al.*, 2020).

Figura 1 - Estrutura química das avermectinas naturais.



avermectina	R ₁	R ₂	X-Y
A1a	CH ₃	C ₂ H ₅	CH=CH
A1b	CH ₃	CH ₃	CH=CH
A2a	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₂ -CH(OH)
A2b	CH ₃	CH ₃	CH ₂ -CH(OH)
B1a	H	C ₂ H ₅	CH=CH
B1b	H	CH ₃	CH=CH
B2a	H	C ₂ H ₅	CH ₂ -CH(OH)
B2b	H	CH ₃	CH ₂ -CH(OH)

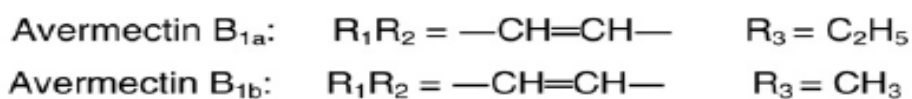
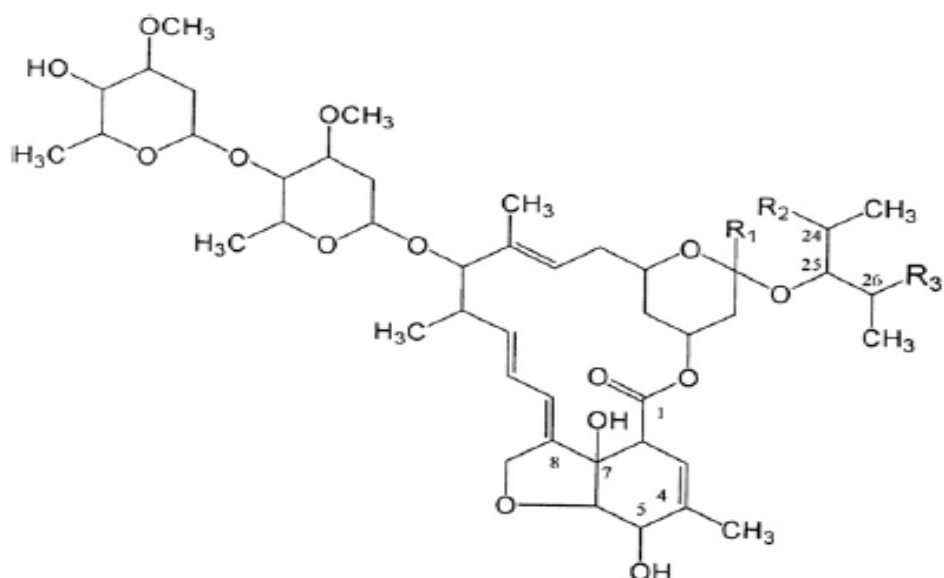
Fonte: ufsg.edu.br

O termo avermectina origina-se de 2 línguas, latim e grego. O prefixo *a* deriva do grego e significa *sem*; o termo *verme* vem do latim *vermis* e significa verme; já o termo *ecto* também se origina do grego e significa *externo/de fora* (GENERUTTI; SPINOSA, 1997).

As avermectinas são também denominadas endectocidas pois têm ação contra endoparasitas e também contra ectoparasitas (LAING *et al.*, 2017). O grupo das avermectinas é formado por abamectina, ivermectina, eprinomectina, doramectina, selamectina, moximectina e nemadectina (BATIHA *et al.*, 2020).

A abamectina (Figura 2) é uma das avermectinas naturais. Ela é composta por cerca de 80% da avermectina B1a e 20% da avermectina B1b. A avermectina B1a é a que apresenta maior potência além de amplo espectro parasiticida, porém a separação dos grupos das avermectinas B1a e B1b é considerada economicamente inviável na indústria farmacêutica. Sendo assim os produtos comerciais de abamectina, disponíveis no mercado são compostos por uma mistura contendo 90% de avermectina B1a e 10% da avermectina B1b (HERNÁNDEZ-BORGES *et al.*, 2007; ZANOLI *et al.*, 2012).

Figura 2 - Estrutura química da Abamectina.

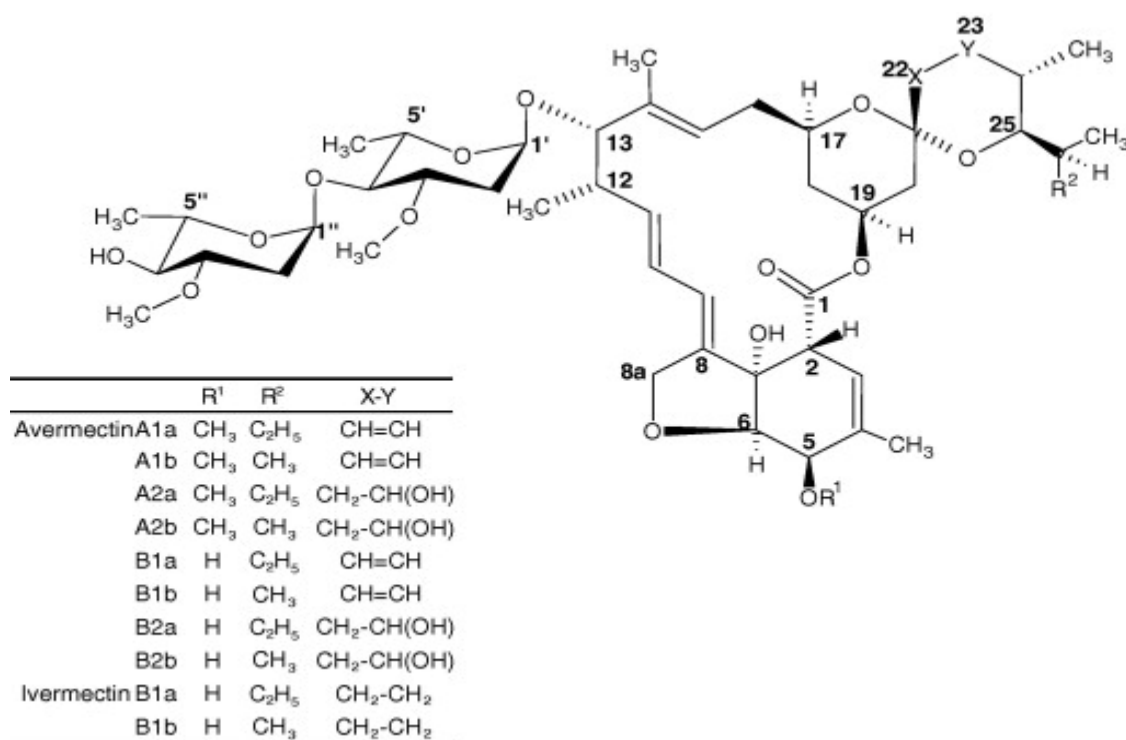


Fonte: www.elsevier.com/locate/toxinvit

3.2 Ivermectina

A ivermectina (22,23 dihydroavermectina B1) é um derivado semissintético da abamectina (avermectina B1) e apresenta como vantagens, menor toxicidade e efeitos adversos. Para a transformação da avermectina B1 em IVM, é necessário que a dupla ligação entre os carbonos 22 e 23 seja reduzida a uma ligação simples com a adição de um hidrogênio no carbono 22 e outro no carbono 23 (Figura 3). O processo para que essa reação química ocorra utiliza cloreto de ródio como catalisador, que apresenta como efeito colateral a poluição por metais pesados. Como alternativa, foram desenvolvidas cepas geneticamente modificadas da *Streptomyces avermitilis*, que produzem diretamente a IVM (LI *et al.*, 2008).

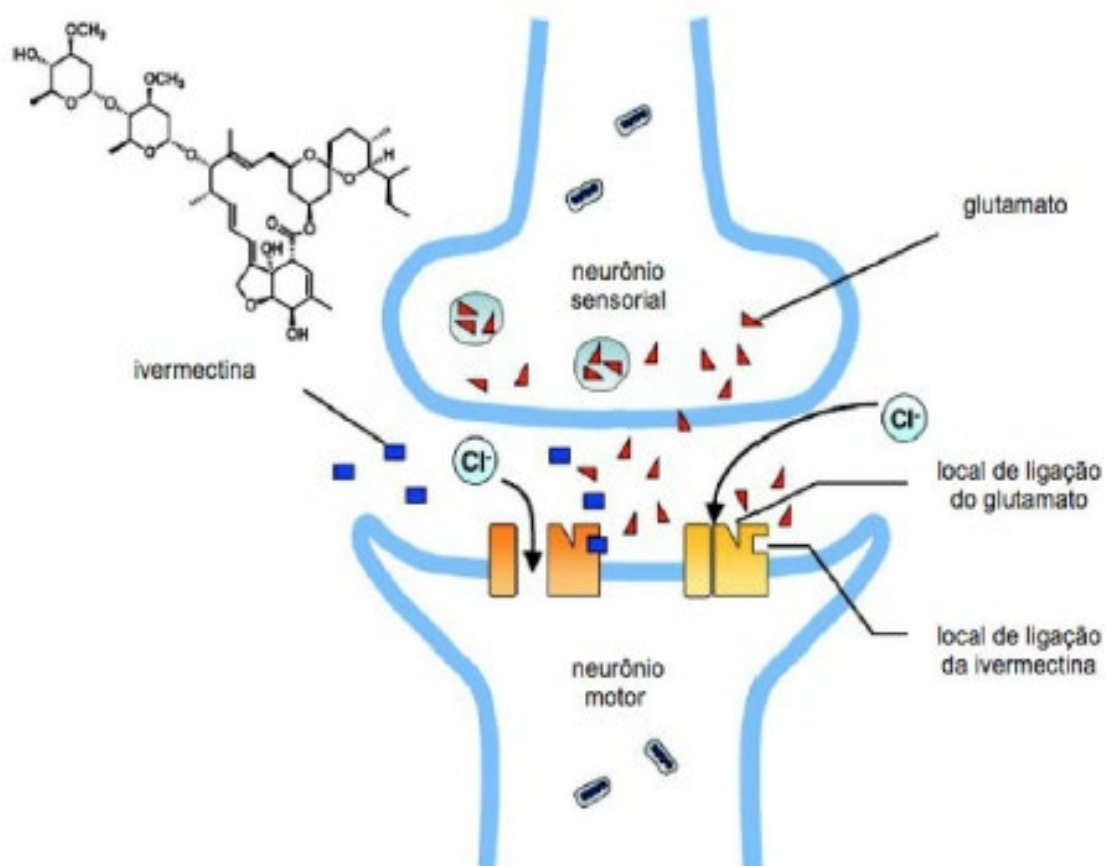
Figura 3 - Estrutura química das Avermectinas e da Ivermectina.



Fonte: Zanoli *et al.* (2012)

O mecanismo de ação da IVM (Figura 4) ocorre por meio da afinidade pelos receptores de glutamato e do ácido gama-aminobutírico (GABA). Em concentrações da ordem de nanomolar, a ivermectina se liga aos receptores glutamato abrindo os canais para a entrada de íons cloreto nas células de nervos e músculos de invertebrados, que levam à hiperpolarização, causando assim paralisia no sistema neuromuscular dos invertebrados. Quando em concentrações da ordem de micromolar, a IVM pode se ligar a outros receptores, como os do GABA, de glicina, histamina e acetilcolina, encontrados tanto em vertebrados quanto invertebrados, permitindo assim a entrada dos íons cloreto e consequentemente levando à hiperpolarização da membrana de nervos e músculos, podendo levar à morte por paralisia nestes grupos (LAING *et al.*, 2017; BATIHA *et al.*, 2020).

Figura 4 - Representação esquemática do mecanismo de ação da ivermectina. Receptores de glutamato abrindo os canais de cloro causando hiperpolarização do neurônio.



Fonte: [tesiando.files.wordpress.com 2010/11/modo-de-accic3b3n.jpg](https://tesiando.files.wordpress.com/2010/11/modo-de-accic3b3n.jpg)

A IVM é hidrofóbica e por ter alta afinidade orgânica ela pode se acumular no meio-ambiente. Ela também é lipofílica podendo se acumular em tecidos animais como, por exemplo, o tecido adiposo e órgãos como fígado e rins. Além disso a IVM apresenta alto peso molecular dificultando que a substância atravesse barreiras biológicas como por exemplo a barreira hemato-encefálica de mamíferos e por isto conferindo segurança no uso nesta classe de animais. No entanto, em altas dosagens pode ultrapassar essa barreira e causar efeitos tóxicos ao SNC desses animais (BATIHA *et al.*, 2020).

A IVM pode ser administrada por várias vias: oral, intramuscular, intravascular, subcutânea ou tópica. Após a absorção, a IVM se liga a proteínas plasmáticas como albumina e lipoproteínas para ser transportada e distribuída, podendo se acumular em tecido adiposo, fígado e rins. As maiores quantidades de IVM são encontradas no fígado e tecido adiposo e as menores no tecido cerebral (CANGA *et al.*, 2009). A biotransformação ocorre no fígado, pela via enzimática do citocromo P450 (CYP) por meio de reações de hidroximetilação e de desmetilação, sendo que os seus principais metabólitos são 24-hydroxymethyl-H2B1a e 3'-O-desmethyl-H2B1a (BATIHA *et al.*, 2020; RENDIC, 2021). Grande parte da IVM (cerca de 90%) é excretada na sua forma inalterada, sendo que sua excreção ocorre em maior parte nas fezes atingindo o intestino através dos ductos biliares pela bile. Apenas 1-2% é excretada pelas vias urinárias. Outra forma de excreção ocorre pelas glândulas mamárias por meio do leite (CANGA *et al.*, 2009). Como a IVM passa pelo fígado onde é metabolizada e excretada, além de se acumular, ela representa risco potencial de hepatotoxicidade (RENDIC, 2021).

A IVM é considerada bastante segura para mamíferos, porém foram descritos casos de intoxicação, geralmente relacionado a erros de dosagens que levam a alterações no SNC (CANGA *et al.*, 2009), por apresentarem afinidade aos receptores Glutamato e GABA (LAING *et al.*, 2017; BATIHA *et al.*, 2020). Também foram observadas alterações nos níveis sorológicos de enzimas hepáticas como as aminotransferases, gama-glutamil transferase (GAMA-GT) e desidrogenase láctica (DHL). Além disso foram relatados casos em que além das alterações laboratoriais foram também descritas alterações histopatológicas (VEIT *et al.*, 2006; SAQIB *et al.*, 2015).

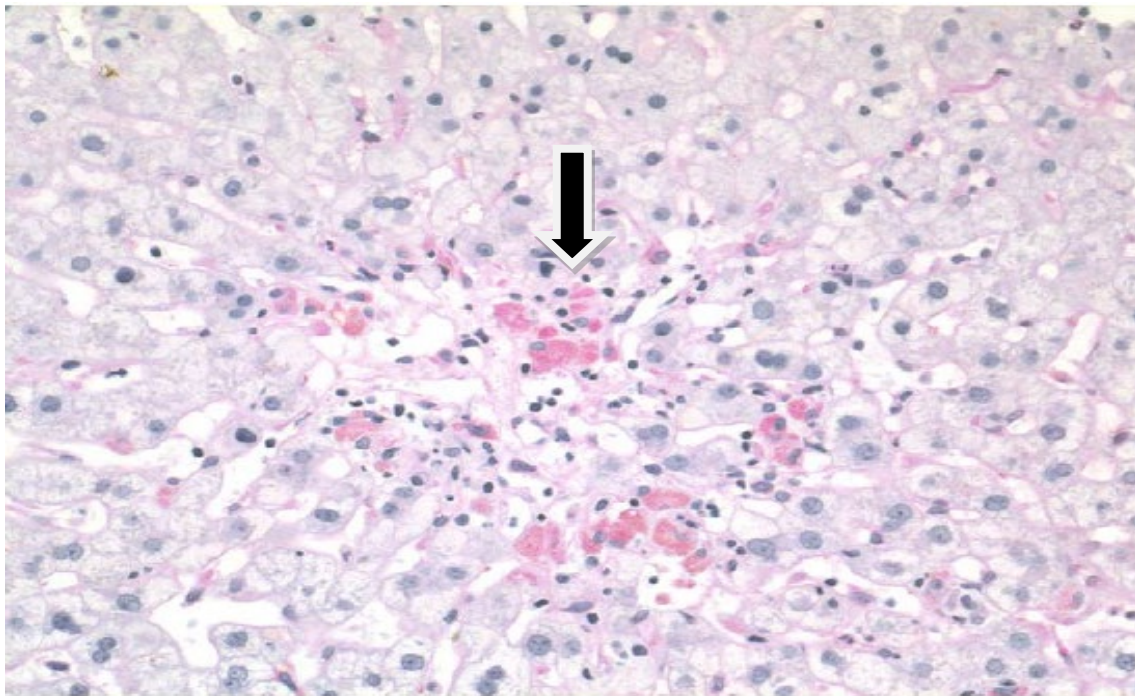
3.3 Toxicidade da Ivermectina

Saqib *et al.* (2015) relataram caso de intoxicação por administração de alta dose de IVM em um Leão Africano (*Panthera leo*), onde por erro na preparação da dose, foram administrados 3 mg/kg de peso quando a dose recomendada era 0,3 mg/kg de peso. O animal apresentou algumas alterações neurológicas como: ataxia, convulsões generalizadas, alucinações e cegueira bilateral. Foram observadas também alterações em exames laboratoriais entre elas, elevações de algumas enzimas hepáticas indicando comprometimento hepático. A atividade da fosfatase

alcalina (FA) foi de 210 U/L na apresentação (normal de 0 a 166 U/L), permanecendo elevada por 72 horas. A GAMA-GT também estava bastante elevada à apresentação, quando foram detectadas 108 U/L (normal de 0,1 a 10 U/L) permanecendo elevada até 2 semanas após a administração. Foram observadas também indicando comprometimento renal, elevação da creatinina sérica detectada de 403 $\mu\text{mol/L}$ (normal de 0 a 389 $\mu\text{mol/L}$) que permaneceu alterada até 72 horas da exposição, bem como aumento na dosagem da Uréia sérica, sendo detectado 109,8 mmol/L (normal de 4,64 a 25,35 mmol/L).

Veit *et al.* (2006) relatou caso de hepatite aguda induzida por IVM em humano do sexo feminino, com 20 anos de idade, submetida a tratamento para microfilariose *Loa Loa* em olho direito com 15 mg de IVM em dose única (300 $\mu\text{g/kg}$ de peso). Dois meses após a administração a paciente apresentou quadro de dor abdominal difusa, elevação das aminotransferases, além de alterações histológicas hepáticas (esteatose, necrose, congestão vascular, fibrose e alargamento dos espaços porta) de graus leve a moderado, observadas em biópsias hepáticas, indicando moderado comprometimento hepático (Figura 5). A atividade da Alanina aminotransferase (ALT) detectada foi 907 UI/L (normal de 7 a 42 UI/L) permanecendo alterada por 2 meses após a administração. A Aspartato aminotransferase (AST) apresentou uma atividade de 279 UI/L (normal de 5 a 39 UI/L) permanecendo elevada por 1 mês após a utilização.

Figura 5 - Biópsia de fígado humano após administração de 300 µg/kg de peso de ivermectina mostrando infiltrado inflamatório intralobular, macrófagos carregados com material ceróide, necrose confluyente perivenular e apoptose intralobular (seta).



Fonte: Veit *et al.* (2006).

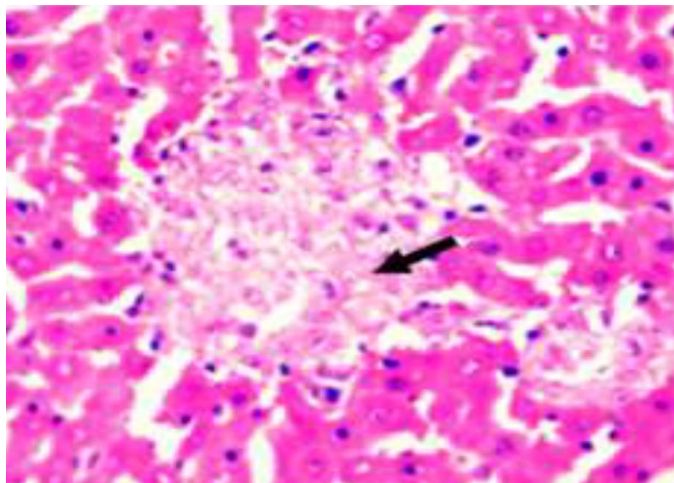
Outro relato de caso refere-se a um humano do sexo masculino com 72 anos de idade, que foi tratado para escabiose com IVM em dose única de 200 µg/kg de peso em associação com benzoato de benzila em aplicação tópica. Dois dias após a administração o paciente apresentou quadro de dor abdominal e náuseas, com alteração da função hepática (elevação das aminotransferases), que foi diagnosticado como hepatite relacionada ao uso de IVM (SPARSA *et al.*, 2006).

Gaballh *et al.* (2017) realizaram uma pesquisa experimental com 40 coelhos (sendo 30 machos e 10 fêmeas gestantes) que foram divididos em grupos e submetidos a tratamentos com dose terapêutica de IVM (0,4 mg/kg de peso) e com dose dobrada (0,8 mg/kg de peso), por períodos variados (semanalmente por 4 e por 8 semanas, no caso dos machos; e diariamente por 4 semanas nas fêmeas gestantes). Ao final do período foram colhidas amostras de vários órgãos, dentre eles o fígado, sendo submetidas a exame histopatológico. Nas amostras do fígado foram observadas lesões inflamatórias de graus leve a moderado como esteatose, fibrose, hiperplasia e congestão da veia centrolobular. O autor observou que as lesões eram

mais acentuadas nos grupos tratados com doses maiores (dobro da dose terapêutica) e por períodos mais longos (8 semanas).

Rabab *et al.* (2015) realizaram experimento com a utilização de 30 ratos machos albinos, divididos em 3 grupos (controle sem tratamento, tratamento com doses terapêuticas de IVM 0,2 mg/kg de peso e tratamento com doses contendo o dobro da dose terapêutica de IVM 0,4 mg/kg de peso) aos quais foram administradas doses semanais durante 8 semanas. Ao final do tratamento, foram avaliados parâmetros bioquímicos e histológicos de animais de cada grupo. Estes parâmetros foram avaliados 24 horas após e 1 semana após a última administração. Dentre os parâmetros analisados destaca-se elevação significativa das aminotransferases hepáticas que apresentavam valores cerca de 2 vezes acima dos valores normais, nas análises de 24 horas após a última administração, permanecendo elevada 1 semana após a última administração, porém em menor nível (cerca de 1 vez acima dos valores normais). Quanto às alterações histológicas, foram observadas alterações inflamatórias variando entre grau leve e acentuado como esteatose, fibrose e congestão da veia centrolobular, chegando inclusive a apresentar áreas de necrose (Figura 6), indicando lesão hepática.

Figura 6 - Biópsia de fígado de ratos machos albinos, 24 horas após a última dosagem (8ª semana) de ivermectina (0,4mg/Kg de peso), mostrando áreas focais de necrose, caracterizadas pela perda de detalhes celulares, com núcleos picnóticos ou ausência de núcleo



Fonte: Rabab *et al.* (2015).

Em outro estudo para análise da possibilidade de toxicidade hepática da IVM, foram selecionados 20 ratos Wistar machos albinos, divididos em 4 grupos com 5 animais, sendo grupo controle (solução salina intraperitoneal) e grupos tratados com 5, 10 e 15 mg de IVM/kg de peso via intraperitoneal. Após 24 h os animais foram eutanasiados e foram medidos parâmetros bioquímicos plasmáticos (ALT, AST, triglicérides, colesterol e DHL). Foram colhidas amostras de tecido hepático para quantificação de proteínas, ácidos nucleicos, quantificação de glutathione (potente antioxidante) e malondialdeído (MDA, marcador de estresse oxidativo). Os resultados mostraram aumento estatisticamente significativo de todos parâmetros bioquímicos analisados a partir das doses de 10 e 15 mg/kg de peso. Os ácidos nucleicos apresentaram-se com diminuição significativa para as mesmas dosagens, porém as proteínas não apresentaram alterações significativas. Com relação à glutathione observou-se diminuição significativa já a partir do tratamento com 5 mg/kg de peso. O MDA apresentou elevação significativa a partir de 10 mg/kg de peso. As elevações das enzimas hepáticas e diminuição dos ácidos nucleicos (que indicam diminuição da proliferação celular) são sinais de toxicidade hepática. Já a diminuição da glutathione associada ao aumento do MDA são indicadores de estresse oxidativo, também refletindo sinais de toxicidade hepática (QURESCHI, 2013).

3.4 Fígado e Biotransformação de Xenobióticos

O fígado é um órgão sólido que faz parte do sistema digestivo, sendo considerado como glândula anexa a este sistema. O parênquima hepático é organizado em lóbulos e as suas unidades funcionais celulares são os hepatócitos (GONZÁLES-PONCE *et al.*, 2018). É o principal órgão a metabolizar, armazenar, liberar na corrente circulatória e excretar grande parte das substâncias que circulam nos organismos, sejam elas oriundas do metabolismo interno (endógenas) ou substâncias externas (exógenas) que são absorvidas pelo organismo principalmente pelo sistema digestivo, também conhecidas como xenobióticos. Portanto, o fígado é o principal órgão envolvido na biotransformação dessas substâncias por meio da capacidade de converter substâncias hidrofóbicas (lipossolúveis) em hidrofílicas (hidrossolúveis), facilitando assim sua excreção (GUILLOUZO, 1998; CARVALHO *et al.*, 2013).

Uma grande parte dos xenobióticos e de seus metabólitos apresentam potencial hepatotóxico pela ação de hepatotoxinas, as quais reagem com os componentes básicos das células (proteínas, lipídeos, DNA, RNA) induzindo praticamente todos os tipos de lesões do fígado, sendo a esteatose a mais frequente. Independentemente do agente causador da injúria, as reações apresentadas pelo fígado envolvem as mesmas sequências de eventos que podem ser avaliadas nos diferentes níveis, molecular, celular e tissular. A maioria dos estudos relacionados às lesões hepáticas induzidas por substâncias químicas são realizados em modelos experimentais com a utilização de animais de pesquisa. Devido às desvantagens dos estudos em modelos *in vivo*, como por exemplo a influência de várias substâncias endógenas sobre as exógenas, os sistemas hepáticos *in vitro* representam uma melhor abordagem experimental para rastrear potenciais compostos hepatotóxicos e investigar mecanismos pelos quais as substâncias químicas induzem as lesões hepáticas (GUILLOUZO, 1998; CARVALHO *et al.*, 2013).

As drogas, dentre elas a IVM, são também consideradas xenobióticos sendo que a principal via metabólica utilizada pelo fígado para a metabolização é a via enzimática do Citocromo P450 (P450 CYP), por meio de reações de hidroximetilação e de desmetilação, sendo que os seus principais metabólitos são 24-hydroxymethyl-H2B1a e 3'-O-desmethyl-H2B1a (BATIHA *et al.*, 2020; RENDIC, 2021).

3.5 Estresse Oxidativo, Radicais Livres e Sistemas Antioxidantes

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes, seja por um aumento na produção das substâncias oxidantes ou pela diminuição dos sistemas antioxidantes. O desequilíbrio dá origem então, ao aumento dos radicais livres, seja por aumento na geração ou diminuição dos sistemas neutralizantes. Este processo promove a oxidação de biomoléculas como: proteínas, lipídeos, carboidratos e material genético, que leva à perda das funções biológicas e da homeostase, levando ao dano oxidativo de células e tecidos, denominado estresse oxidativo (BARBOSA *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2015; MASARONE *et al.*, 2018).

Os radicais livres são átomos ou moléculas que apresentam elétrons não pareados e os principais mecanismos que dão origem a estes radicais ocorrem geralmente nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. A mitocôndria é a principal organela envolvida na geração dos radicais livres, o que ocorre preferencialmente por meio da cadeia transportadora de elétrons (LI *et al.*, 2015).

Os principais radicais livres são as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. Dentre as espécies reativas de oxigênio, as principais são os radicais superóxido (O_2^-) e hidroxila ($OH^\bullet$), além do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que apesar de não ser um radical livre por não possuir elétrons desemparelhados, é uma molécula com alto potencial reativo que participa na geração de $OH^\bullet$ que é a espécie mais reativa sendo o principal fator na peroxidação lipídica dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular. As reações de geração de $OH^\bullet$ são catalisadas pelos íons Ferro e Cobre por meio das reações de Fenton (entre H_2O_2 e os íons ferro e cobre) e de Haber-Weiss (entre H_2O_2 e o radical O_2^-). Dentre as espécies reativas de nitrogênio encontramos o óxido nítrico (NO), o peroxinitrito (ONOO $^\bullet$) e dióxido de nitrogênio ($NO_2^\bullet$). A enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH Oxidase) é outro importante fator na geração de radicais livres. Ela tem a função de transportar elétrons através da membrana celular sendo que o receptor dos elétrons é o oxigênio formando então o radical O_2^- (BARBOSA *et al.*, 2010; MASARONE *et al.*, 2018).

A produção de radicais livres é necessária para o organismo e sua neutralização ocorre pelos sistemas antioxidantes. Esse sistema de defesa age por três principais mecanismos: inibindo a geração dos radicais livres, impedindo a ação desses radicais e favorecendo reparo e reconstituição das estruturas lesadas. Os

sistemas antioxidantes são divididos em enzimáticos e não enzimáticos (LI *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2010).

Os sistemas enzimáticos incluem as enzimas catalase (CAT), glutational peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), que agem impedindo ou controlando a formação de radicais livres dificultando assim seu acúmulo e consequentemente o estresse oxidativo. Já os sistemas não enzimáticos incluem principalmente antioxidantes originários da dieta como: minerais (cobre, magnésio, selênio e zinco), vitaminas (ácido ascórbico, α -tocoferol e β -caroteno) e outros compostos fenólicos (BARBOSA *et al.*, 2010; MASARONE *et al.*, 2018).

O estresse oxidativo promove a oxidação das biomoléculas gerando então metabólitos específicos relacionados às substâncias que foram oxidadas, que são os marcadores do estresse oxidativo. Os marcadores podem ser relacionados à oxidação de lipídeos como o malondialdeído (MDA) que é o principal marcador da peroxidação lipídica que ocorre na oxidação dos lipídeos da bicamada lipídica das membranas celulares. Existem outros marcadores da oxidação de lipídeos como etano e pentano (hidrocarbonetos voláteis) e lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox), secundário a dano oxidativo das lipoproteínas (moléculas transportadoras de colesterol). Os marcadores podem ser ainda, derivados da oxidação de proteínas como os carbonilos e 3-nitrotirosina e derivados da oxidação de DNA como o 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG), derivada da oxidação da guanina e 5-hidroximetildeoxiuridina (5-HMdU), derivada da oxidação de uracila. Para se detectar o estresse oxidativo, todos esses marcadores podem ser dosados (BARBOSA *et al.*, 2010; MASARONE *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2015).

3.6 Células HepG2

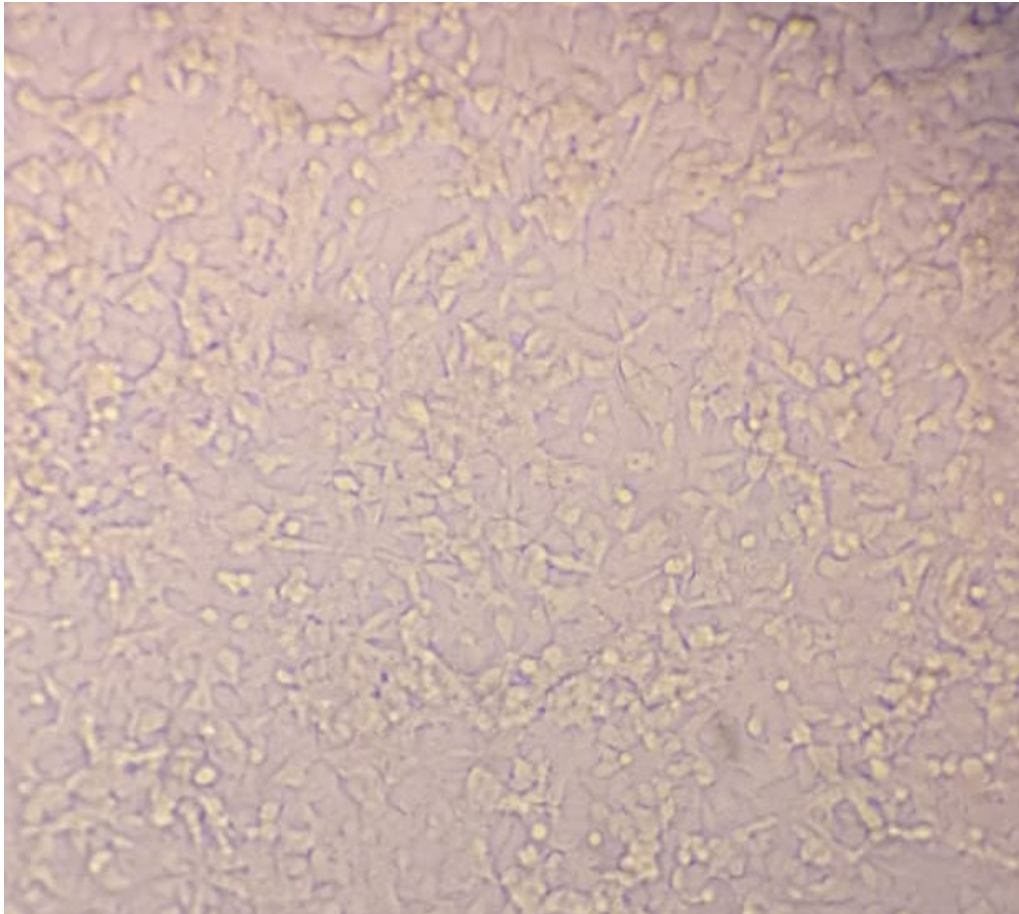
Para avaliação das doenças hepáticas e dos possíveis efeitos hepatotóxicos de substâncias, *in vitro*, existem diversos modelos celulares (hepatócitos isolados, culturas primárias de hepatócitos e linhagens celulares hepáticas). Os modelos celulares hepáticos ideais disponíveis comercialmente são os que envolvem hepatócitos isolados e culturas primárias de hepatócitos, porém apresentam grande variação entre os lotes, o que pode representar grandes problemas na realização dos procedimentos, além de serem caros, representando outro problema para os pesquisadores. Outra desvantagem seriam os processos éticos relacionados à

obtenção das células primárias de hepatócitos. Além de tudo isso, as culturas de células primárias apresentam um curto período em que podem ser cultivadas o que restringe sua utilização, tornando-as inadequadas a muitos trabalhos. Já as linhagens celulares derivadas de hepatomas como HepG2 (Figura 7) e Huh-7 apesar de apresentarem limitações genéticas por serem derivadas de carcinomas, são facilmente disponíveis, têm fácil manuseio e são largamente utilizadas em modelos hepáticos.

Em trabalho realizado para avaliação da toxicidade hepática causada pelo vírus da dengue (DENV), os autores utilizaram comparativamente, Hepatócitos Humanos Primários (PHH) e células imHC (linhagem celular imortalizada semelhante aos hepatócitos, derivada de células tronco mesenquimais humanas) com células HepG2 e Huh-7 (linhagens celulares derivadas dos hepatocarcinomas). Em algumas das análises realizadas os autores observaram que as células HepG2 foram muito mais efetivas do que em outras linhagens na produção de citocinas como a interleucina 8 (IL-8) e fator de necrose tumoral (TNF). Foi concluído que esse aumento excepcionalmente alto na produção das citocinas pelas células HepG2 podem estar relacionadas às taxas, também extremamente elevadas, nas alterações dos ensaios de proliferação celular e morte celular apoptótica, induzidas pelo DENV (KONGMANAS *et al.*, 2020).

Em outro estudo, realizado para comparar a indução de CYP entre as linhagens HepG2, Huh-7, NKNT-3 e NKNT-3 invertida, Choi *et al* (2014) observaram que as células HepG2 comparando a produção de proteínas celulares hepáticas (albumina, hGSTA, hGSTP1 e HNF4a), apresentaram-se mais semelhantes com a função do fígado humano do que as outras linhagens. As células Huh-7 exibiram maior atividade do CYP1A2 e CYP3A4, enquanto que as células HepG2 maior atividade do CYP2B6. Ainda comparando entre as linhagens celulares, as células HepG2 apresentaram alta responsividade a indutores de CYP como o fenobarbital para CYP2B6 e CYP3A4 e o metilcolantreno para o CYP1A2 e concluíram que apesar de haver baixa responsividade basal, as células HepG2 apresentam-se adequadas para a avaliação, *in vitro*, na indução de CYP1A2, CYP3A4 e CYP2B6 e sendo assim, parecem ser comparáveis aos hepatócitos ou ligeiramente menos sensíveis.

Figura 7 - Visão microscópica das células HepG2 (utilizando objetiva com aumento 10x). As células estão aderidas à placa de cultivo após incubação a 37°C e sob atmosfera com 5% de CO₂.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

A ivermectina com 100% de pureza (Merck - Código I8898) foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Os outros reagentes químicos utilizados nas análises experimentais deste estudo foram adquiridos com o mais alto nível de pureza e confiabilidade encontrados no mercado. Na preparação das soluções para os ensaios foi utilizada água ultra-filtrada em sistema de purificação Millipore DirectQ-3® (Milli-Q®).

4.2 Cultura das Células HepG2

O cultivo das células HepG2 (American Type Culture Collection, nº HB8065), entre a 10ª e 15ª passagens, foi realizado em meio *Minimum Essential Medium* (MEM) composto por aminoácidos não-essenciais 0,1 mM, piruvato de sódio 1 mM, L-glutamina 2 mM e sais de Earle, com a suplementação com 10% de soro bovino fetal, estreptomicina 100 µg/ml e penicilina G 100 UI/ml em frascos de cultura acomodadas em estufa climatizada mantendo temperatura de 37°C e sob atmosfera com 5% de CO₂. Após o cultivo, com o preenchimento do recipiente (garrafa) pelas células HepG2 aderidas (que ocorre entre 4 e 5 dias de cultivo em média) avaliou-se a viabilidade das células através do teste de exclusão com azul de tripan 0,25% e contagem em câmara de Neubauer com a utilização de microscópio (CARL ZEISS, Germany) com objetiva para aumento de 10x. Apenas quando foi observada viabilidade das células $\geq 90\%$ é que foram realizados os plaqueamentos com quantidades de células adequadas para cada análise e então incubadas em estufa com 5% de CO₂ e 37°C durante 24 h para assegurar uma boa adesão das células antes de iniciarem-se os experimentos (STROBER, 2015).

4.3 Ensaios de Citotoxicidade

4.3.1 Ensaio de Proliferação Celular

Neste ensaio, para avaliar a proliferação das células HepG2, foi utilizado o teste com o corante Sulforodamina B (SRB), conforme descrito por Skehan (1990). Para este estudo, foram plaqueadas cerca de 5×10^4 células/mL em meio “MEM” completo, em placas com 24 poços. Em seguida procedeu-se à incubação em estufa climatizada com atmosfera com 5% de CO₂ a 37°C de temperatura durante 24 h. As células HepG2 foram então, expostas às diferentes concentrações de IVM (1; 2,5; 5; 7,5; 10 e 25 µM) e controles negativo (dimetilsulfóxido a 0,1% v/v) e positivo (terc-butil hidroperóxido 100 µM). Posteriormente, foram incubadas pelos tempos de 24 h e 48 h em estufa climatizada com 5% de CO₂ à 37°C de temperatura. Após os supracitados períodos de incubação, foi removido o meio de cultura e as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS 10 mM, pH 7,4). As células que estavam aderidas foram fixadas com metanol absoluto durante 2 horas, posteriormente lavadas com PBS estéril e então coradas com SRB 0,5% (m/v) dissolvida em solução contendo ácido acético a 1% (v/v) e então foram incubadas durante 60 minutos. Procedeu-se então a lavagem com a solução de ácido acético a 1% (v/v) até a retirada completa do excesso do corante. O corante que ficou aderido às membranas celulares, foi solubilizado em solução tampão Tris 10 mM pH 10 e nesse corante solubilizado foi medida a absorbância na faixa de 540 nm em espectrofotômetro leitor de placas (EZ Read 2000, Biochrom, Cambridge, USA). Os resultados foram expressos como a diminuição porcentual das absorbâncias obtidas em relação à absorbância controle.

4.3.2 Ensaio de Atividade Metabólica Celular

Na avaliação da atividade metabólica das células HepG2, foi utilizado o corante brometo de 3 - (4,5 dimetiltiazol-2il) - 2,5 difeniltetrazólio (MTT), conforme descrito por Denizot e Lang (1986). Foram plaqueadas cerca de 10^3 células/mL em 200 µL do meio MEM completo em placas de 96 poços, submetidas às diferentes concentrações de IVM (1; 2,5; 5; 7,5; 10 e 25 µM) durante os tempos de 24 h e 48 h e incubadas em estufa climatizada com 5% de CO₂ à 37°C de temperatura. Foi adicionada solução de MTT 0,5% (5 mg/mL) e as células foram incubadas por mais 3 h. Após estas 3 h, o meio contido nos poços foi descartado e os cristais de formazan formados, foram então dissolvidos em 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 25 µL de tampão glicina

0,2 M, pH 10,2. A absorbância final foi então medida em faixa de 570 nm de comprimento de onda em espectrofotômetro leitor de placas (EZ Read 2000, Biochrom, Cambridge, USA). Os resultados obtidos foram então expressos como a diferença porcentual das absorbâncias obtidas para a absorbância do grupo controle.

4.3.3 Ensaio para Avaliação da Integridade da Membrana Celular

Neste ensaio é mensurada a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), uma enzima presente no citosol das células que catalisa a reação reversível de transformação do piruvato a lactato no final da glicólise. Com a perda da integridade da membrana celular, a enzima LDH é liberada no meio de cultivo e sua atividade é então mensurada. Se a atividade da LDH está aumentada no meio, significa que há perda de integridade da membrana celular e consequentemente está diminuída a viabilidade das células HepG2.

Para se avaliar a atividade da LDH liberada no meio, foram cultivadas cerca de 1×10^5 células HepG2/mL de meio de cultura, tratadas com as diferentes concentrações de IVM (1; 2,5; 5; 7,5; 10 e 25 μM) e incubadas pelos períodos de 24h e 48h. Após o tratamento, a atividade da LDH presente no meio foi determinada com a utilização do kit comercial disponível no mercado (Bioclin, Brasil). Foi pipetada alíquota de 50 μL do sobrenadante, acondicionado em gelo e adicionados à cubeta previamente aquecida a 37°C, contendo 1 mL do substrato do Kit comercial. A leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 340 nm durante 4 minutos em Espectrofotômetro DU800 (Beckman-Couter, Fullerton, CA, USA) sendo que a atividade da LDH foi mensurada a partir da diminuição da absorbância em relação ao controle inicial e convertida em valores de atividade da LDH utilizando-se da fórmula de conversão determinada pelo kit:

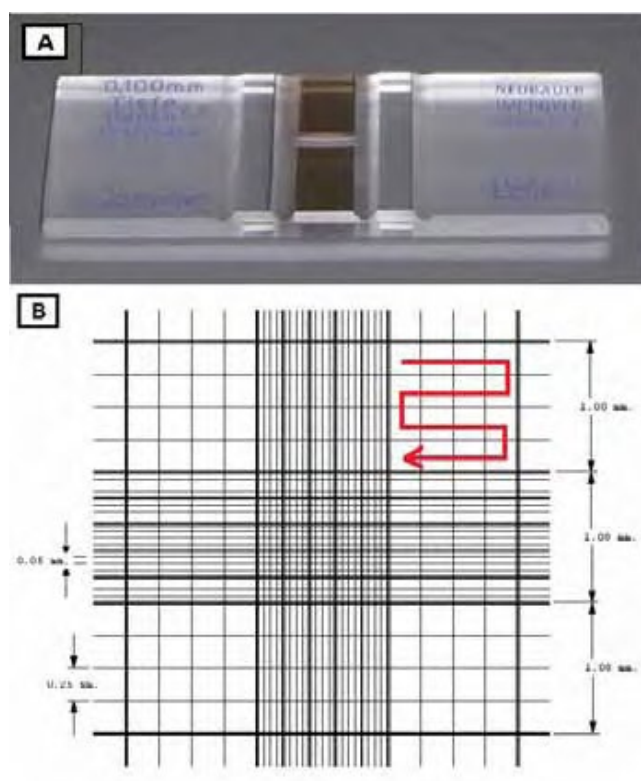
$$\text{Atividade (LDH)} = [(\text{Abs}_{\text{inicial}} - \text{Abs}_{\text{final}}) / \text{tempo de leitura}] \times \text{fator de conversão}$$

4.3.4 Ensaio de Viabilidade Celular pelo Teste de Exclusão do Azul de Tripán

Neste ensaio o azul de tripan que atravessa a membrana celular é expulso pelas células que estão viáveis que, portanto, não ficam coradas pelo azul. Já as células não viáveis não conseguem expulsar o azul de tripan, ficando coradas de azul. Para realização deste ensaio, as células HepG2 aderidas nas placas, foram lavadas e tripsinizadas por cerca de 6 minutos na incubadora climatizada com 5% de CO_2 à

37°C de temperatura. As células foram então centrifugadas em 1500 rpm durante 6 minutos e após foram ressuspensas. Retirou-se 50 µL da suspensão e adicionou-se 50 µL da solução de azul de tripan 0,5%. Transferiu-se 10 µL dessa mistura para cada lado da câmara de Neubauer (Figura 8). O número de células viáveis (não coradas) e de células inviáveis (coradas) foi verificado e quantificado por contagem na câmara utilizando-se de um microscópio (CARL ZEIS, Germany) com objetiva de 10x (ALTMAN, 1993).

Figura 8 - Imagens representativas da câmara de Neubauer, utilizada para o teste de exclusão do azul de tripan. (A) imagem macroscópica da câmara. (B) imagem microscópica demonstrando a divisão dos quadrantes (superior direito, superior esquerdo, inferior direito e inferior esquerdo) que são utilizados para contagem das células. A marcação vermelha indica o sentido sugerido para contagem no quadrante superior direito.



Fonte: Maioli (2012, p. 48)

4.4 Atividade Mitocondrial

4.4.1 Potencial de Membrana Mitocondrial

Neste ensaio, para se avaliar o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), após o cultivo à proporção de cerca de 1×10^5 células/mL, as células HepG2 foram, em seguida, expostas às diferentes concentrações de IVM (1; 2,5; 5; 7,5; 10 e 25 µM)

e incubadas pelos períodos de 24 h e 48 h. Após estes períodos, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e então foram incubadas com solução de tetrametilrodamina metil éster (TMRM) 6,6 μM a 37°C por 30 minutos, conforme descrito por Imberti *et al* (1993). As amostras celulares foram então lisadas com a utilização de solução de Triton X-100 a 0,1% (v/v) e a TMRM que havia sido capturada e retida pelas mitocôndrias foi medida nos comprimentos de onda de excitação e emissão 485 nm e 590 nm, respectivamente, utilizando o espectrofluorímetro modelo RFPC 5301 (Shimadzu, Tóquio, Japão). Os resultados das fluorescências foram apresentados como a porcentagem em relação à fluorescência do grupo controle (DMSO).

4.4.2 Determinação dos Níveis Celulares de ATP

Para se determinar os níveis de ATP nas células HepG2, utilizou-se o sistema luciferina-luciferase (que consome ATP e libera energia na forma de luz) por meio do Kit “ATP BIOLUMINESCENT ASSAY KIT” (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), seguindo as recomendações da fabricante. Nesta análise foram cultivadas cerca de 1×10^6 células HepG2 por placa e então tratadas com diferentes concentrações de IVM (1; 2,5; 5; 7,5; 10 e 25 μM) e incubadas pelos tempos de 24 h 48 h. Ao completar-se esses períodos as culturas celulares foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. Foi descartado o sobrenadante e então procedeu-se ao tratamento com 1 mL de HClO_4 1 M a 4°C. A mistura foi centrifugada a 2000 g por 10 minutos a 4°C e foi retirada uma alíquota de 100 μL do sobrenadante. Em seguida foi neutralizada com 2 M de KOH e foi acrescentado 100 mM de solução de Tris-HCl, pH 7,8 (q.s.p. 1 mL). Neutralizou-se a amostra novamente e procedeu-se a centrifugação a 15000 g durante 10 minutos. Em seguida foi retirada alíquota de 100 μL e foi determinada por Bioluminescência, a quantidade de ATP, utilizando um Luminômetro (Sirius I, Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante do Kit. Os resultados foram apresentados em nmol de ATP x 10^6 células⁻¹.

4.5 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERON)

Para se avaliar a produção de ERON, foi utilizada uma sonda fluorescente 5,6-clometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, acetil éster (CM-H₂DCFDA),

segundo a descrição de CHERNYAK *et al* (2006). Foram cultivadas uma quantidade de cerca de 1×10^5 células/ml e após incubação por 24 h, foram tratadas com diferentes concentrações de IVM (1; 2,5; 5; 7,5; 10 e 25 μM) e então as células foram incubadas por períodos de 24 h e 48 h. Após a incubação, foi adicionada, em ambiente protegido da luz, solução de 2mM de CM-H₂DCFDA e então realizada incubação a 37 °C por 1 h. Em sequência, a fluorescência do CM-H₂DCFDA foi medida utilizando-se o Espectrofluorímetro (RFPC 5301, Shimadzu, Tóquio, Japão) nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 503 nm e 528 nm, respectivamente. Os resultados foram apresentados como sendo a diferença percentual em relação ao grupo controle.

4.6 Análise Estatística

Para avaliação da significância estatística dos dados experimentais utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett, comparando as médias $\pm$ Erro Padrão da Média de 3 repetições dos tratamentos com o controle, sendo que os resultados que se apresentaram com valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. As análises foram realizadas no programa GraphPad Prism, versão 4.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, USA 03/04/2003).

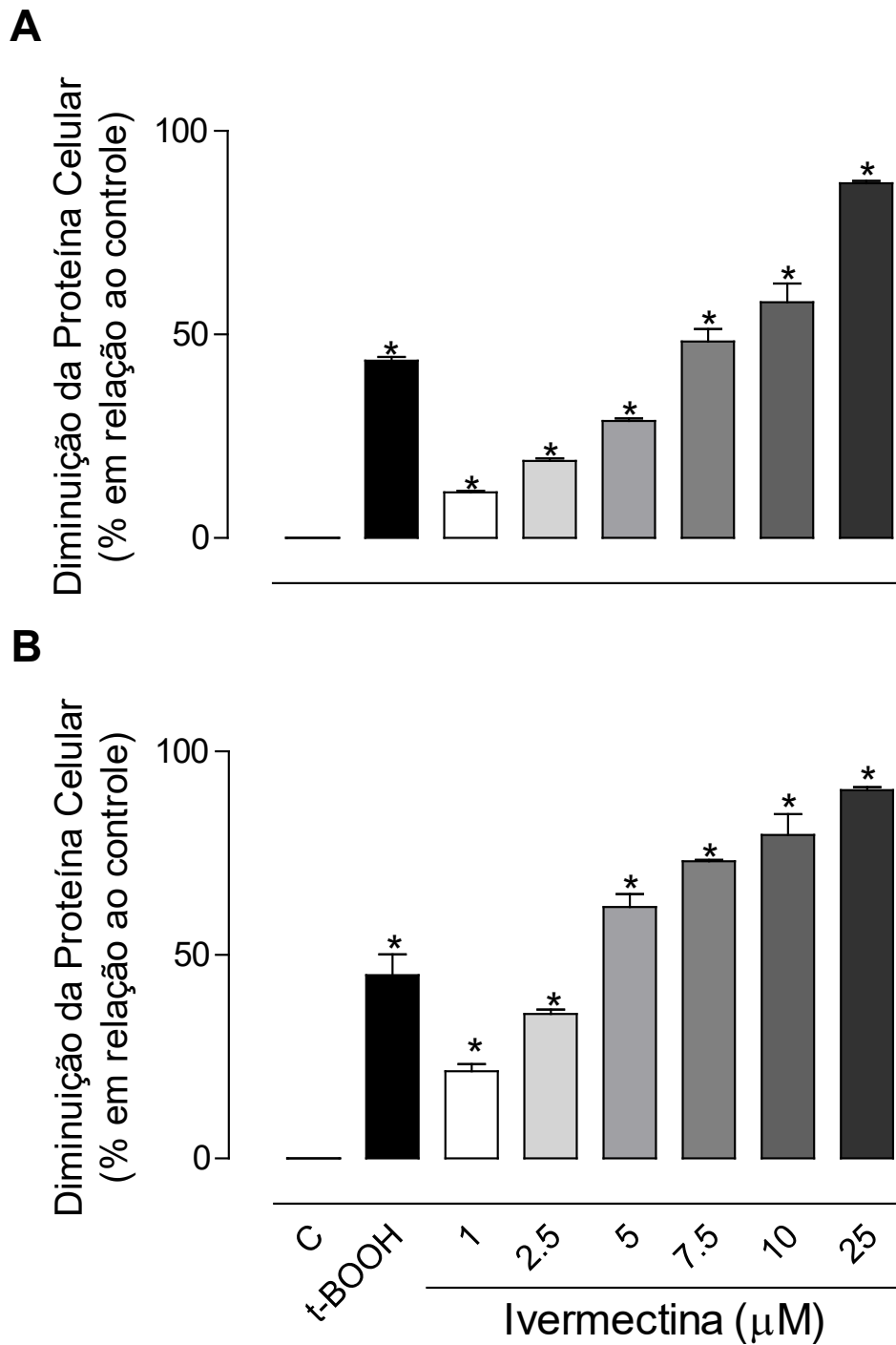
5. RESULTADOS

5.1 Ensaios de Citotoxicidade

5.1.1 Efeito da Ivermectina Sobre a Proliferação Celular

A capacidade de proliferação das células HepG2 foi avaliada com a mensuração da quantidade de proteína celular, que é diretamente proporcional à quantidade de células. Portanto se há diminuição da quantidade de proteína celular, há também diminuição proporcional da quantidade de células. Neste ensaio, foi observada que a IVM afetou a proliferação das células HepG2, medida pela diminuição da quantidade de proteína celular, tanto após 24 h quanto após 48 h de exposição. Esse efeito ocorreu já a partir da dose de 1 μ M e aumentou progressivamente de maneira dose e tempo-dependentes, chegando próximo à 100% de diminuição em relação ao controle nas maiores dosagens e com maior tempo de exposição, conforme observado na Figura 9.

Figura 9 - Diminuição da quantidade de proteína nas células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina (1; 2,5; 5; 7,5; 10 e 25 μM) por 24 h (A) e 48 h (B). Os gráficos representam a média $\pm$ EPM de 3 repetições do experimento com diferentes culturas de células. * Estatisticamente significativo em relação ao controle ($P < 0,05$). C = controle, apenas 0,1% (v/v) de DMSO; t-BOOH = controle positivo com adição de terc-butil hidroperóxido 100 μM .

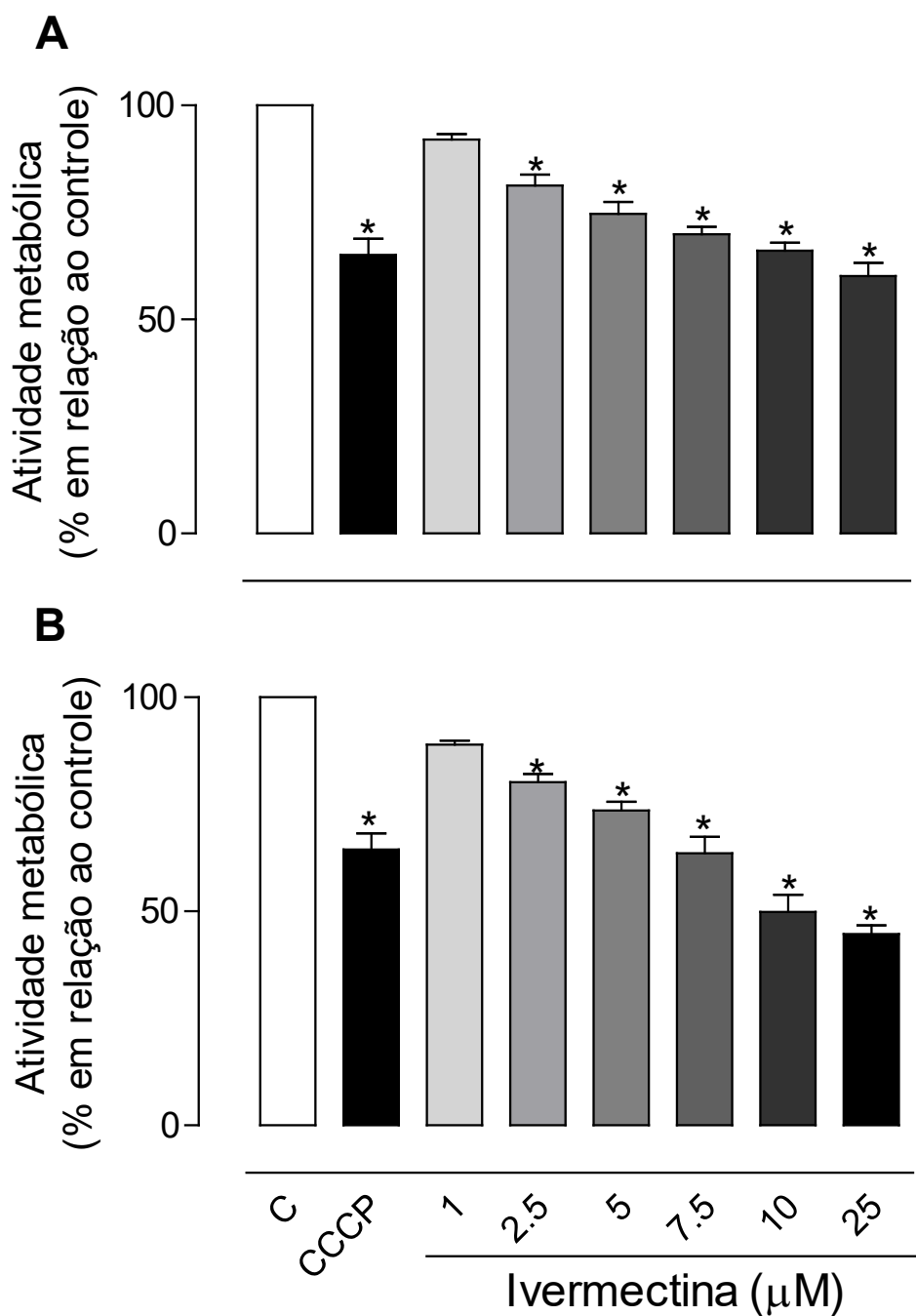


Fonte: Elaborado pelo autor usando o programa GraphPad Prism 4.0.

5.1.2 Efeito da Ivermectina Sobre a Viabilidade das Células HepG2

O princípio deste ensaio consiste na medição da capacidade das células HepG2 em reduzirem o corante MTT convertendo-o em sais de formazan. As células viáveis mantêm sua capacidade metabólica e conseguem realizar a conversão, ao contrário das células inviáveis que não a realizam. Portanto a mensuração da quantidade dos sais de formazan indica se as células são viáveis ou não, sendo que a diminuição deste sal indica proporcionalmente a diminuição da viabilidade das células. Neste ensaio observou-se que a IVM diminui a capacidade metabólica das células HepG2, sugerindo diminuição da atividade mitocondrial, e consequentemente, refletindo na diminuição da viabilidade das células. Neste estudo, foi observado que houve diminuição da viabilidade das células que se torna estatisticamente significativa a partir da dose de 2,5 μM , tanto após 24 h (Figura 10A) quanto após 48 h de exposição (Figura 10B), aumentando progressivamente com o incremento da dosagem indicando, portanto, relação dose e tempo-dependentes.

Figura 10 - Atividade metabólica das células HepG2, avaliada por meio da capacidade em reduzir o corante MTT, após exposição a diferentes concentrações de ivermectina (1; 2,5; 5; 7,5; 10 e 25 μM) por 24 h (A) e 48 h (B). Os gráficos representam a média $\pm$ EPM de 3 repetições do experimento com diferentes culturas de células. * Estatisticamente significativa em relação ao controle ($P < 0,05$). C = controle, apenas 0,1% (v/v) de DMSO; CCCP = controle positivo com adição de cianeto de carbonil m-clorofenil-hidrazona 10 μM .



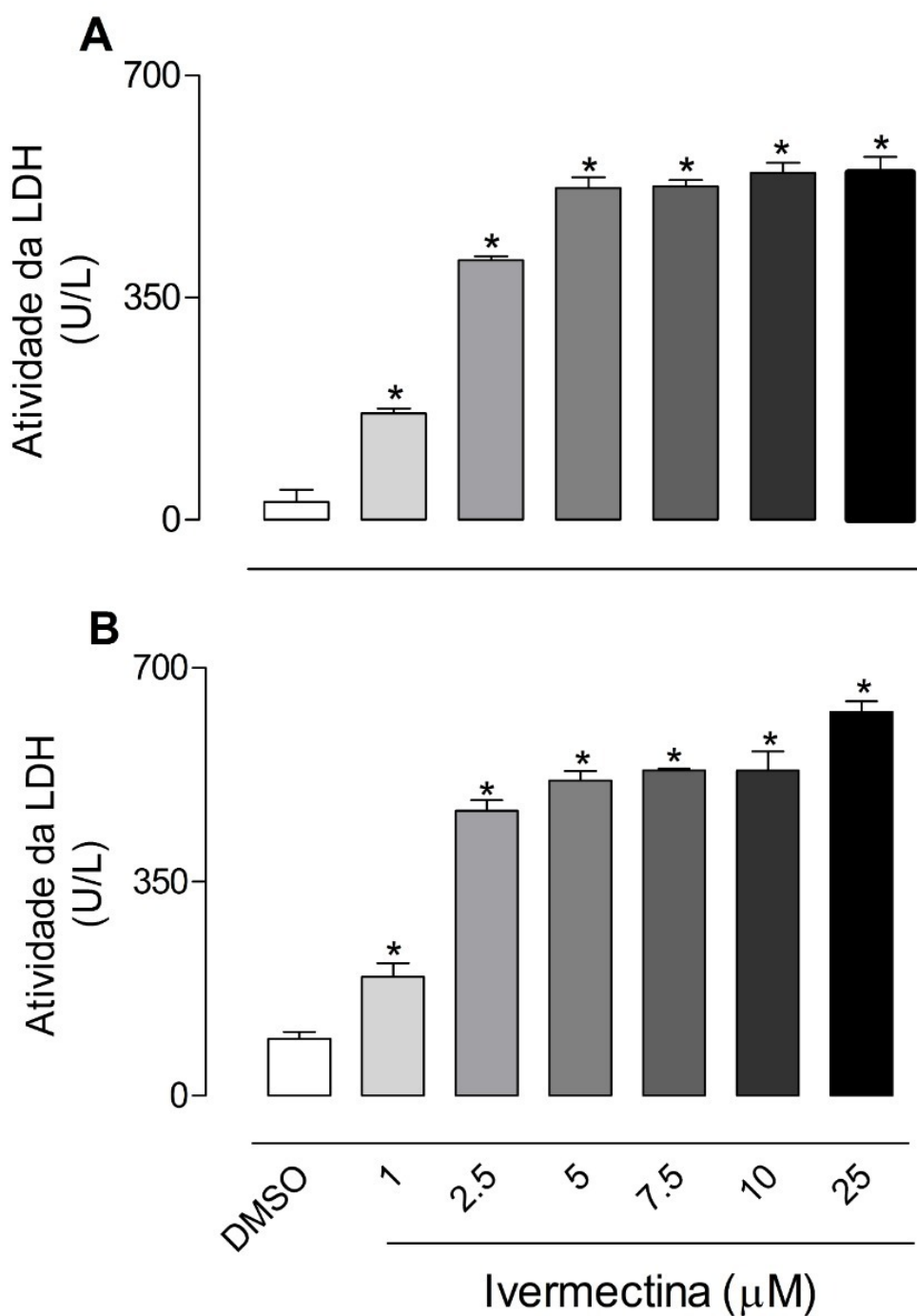
Fonte: Elaborado pelo autor usando o programa GraphPad Prism 4.0.

5.1.3 Efeito da Ivermectina Sobre a Integridade da Membrana Celular

O princípio deste ensaio consiste na medição da atividade da enzima LDH no meio de cultura. Quando há perda da integridade da membrana, a LDH é liberada no meio extracelular e sua atividade é mensurada. Assim, um aumento na atividade da LDH no meio indica perda de integridade da membrana.

Neste estudo observou-se que houve aumento da atividade da enzima LDH no meio de cultivo, em todas as dosagens testadas tanto para o tempo de 24 h (Figura 11A) quanto para o tempo de 48 h (Figura 11B), aumentando progressivamente com o aumento da dose e do tempo de tratamento.

Figura 11 - Aumento da atividade da LDH (U/L) no meio de cultivo (extracelular) das células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina (1; 2,5; 5; 7,5; 10 e 25 μM) por 24 h (A) e 48 h (B). Os gráficos representam a média $\pm$ EPM de 3 repetições do experimento com diferentes culturas de células. * Estatisticamente significativo em relação ao controle ($P < 0,05$). C = controle, apenas 0,1% (v/v) de DMSO; CCCP = controle positivo com adição de cianeto de carbonil m-clorofenil-hidrazona 10 μM .

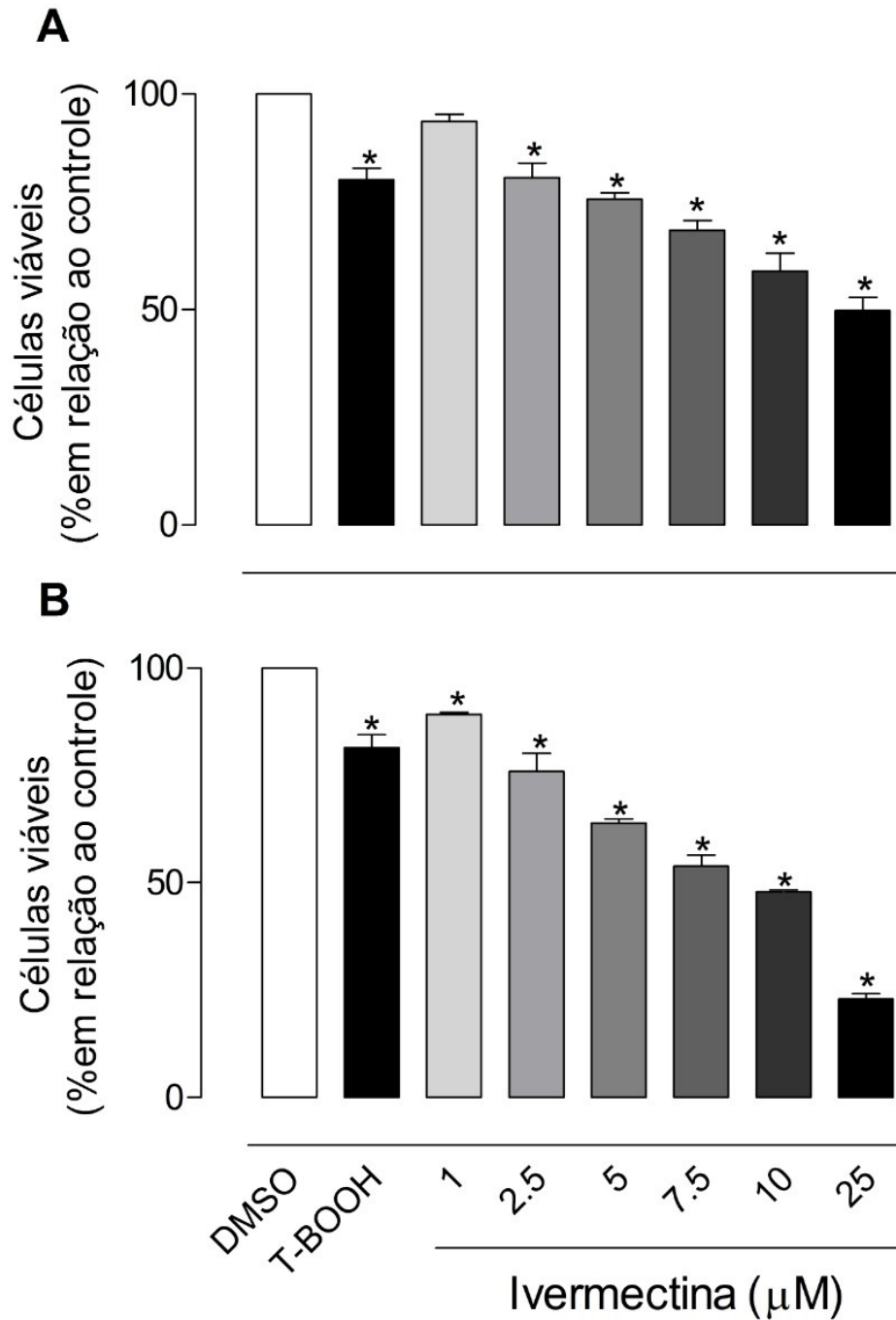


Fonte: Elaborado pelo autor usando o programa GraphPad Prism 4.0.

5.1.4 Ensaio de Viabilidade Celular pelo Teste de Exclusão do Azul de Tripán

Neste ensaio, as células viáveis conseguem expulsar o azul de tripan que se interioriza às células, enquanto as células inviáveis (mortas) não conseguem ficando coradas pelo azul. Foi observado que a IVM provocou diminuição da viabilidade das células no tempo de 24 h iniciando a partir da dosagem de 2,5 μM , aumentando progressivamente com o aumento da dose, ultrapassando 50% de diminuição das células viáveis na dose de 25 μM (Figura 12A). Já no tempo de 48 h de tratamento, o efeito ocorreu para todas as dosagens testadas, aumentando progressivamente com o incremento da dose, chegando a superar 50% de diminuição de células viáveis nas dosagens de 10 μM e 25 μM , indicando efeito dose e tempo dependentes (Figura 12 B).

Figura 12 - Diminuição da viabilidade das células HepG2 verificada pelo teste de exclusão do azul de tripan, após exposição a diferentes concentrações de ivermectina (1; 2,5; 5; 7,5; 10 e 25 μM) por 24 h (A) e 48 h (B). Os gráficos representam a média $\pm$ EPM de 3 repetições do experimento com diferentes culturas de células. * Estatisticamente significativa em relação ao controle ($P < 0,05$). C = controle, apenas 0,1% (v/v) de DMSO; CCCP = controle positivo com adição de cianeto de carbonil m-clorofenil-hidrazona 10 μM .



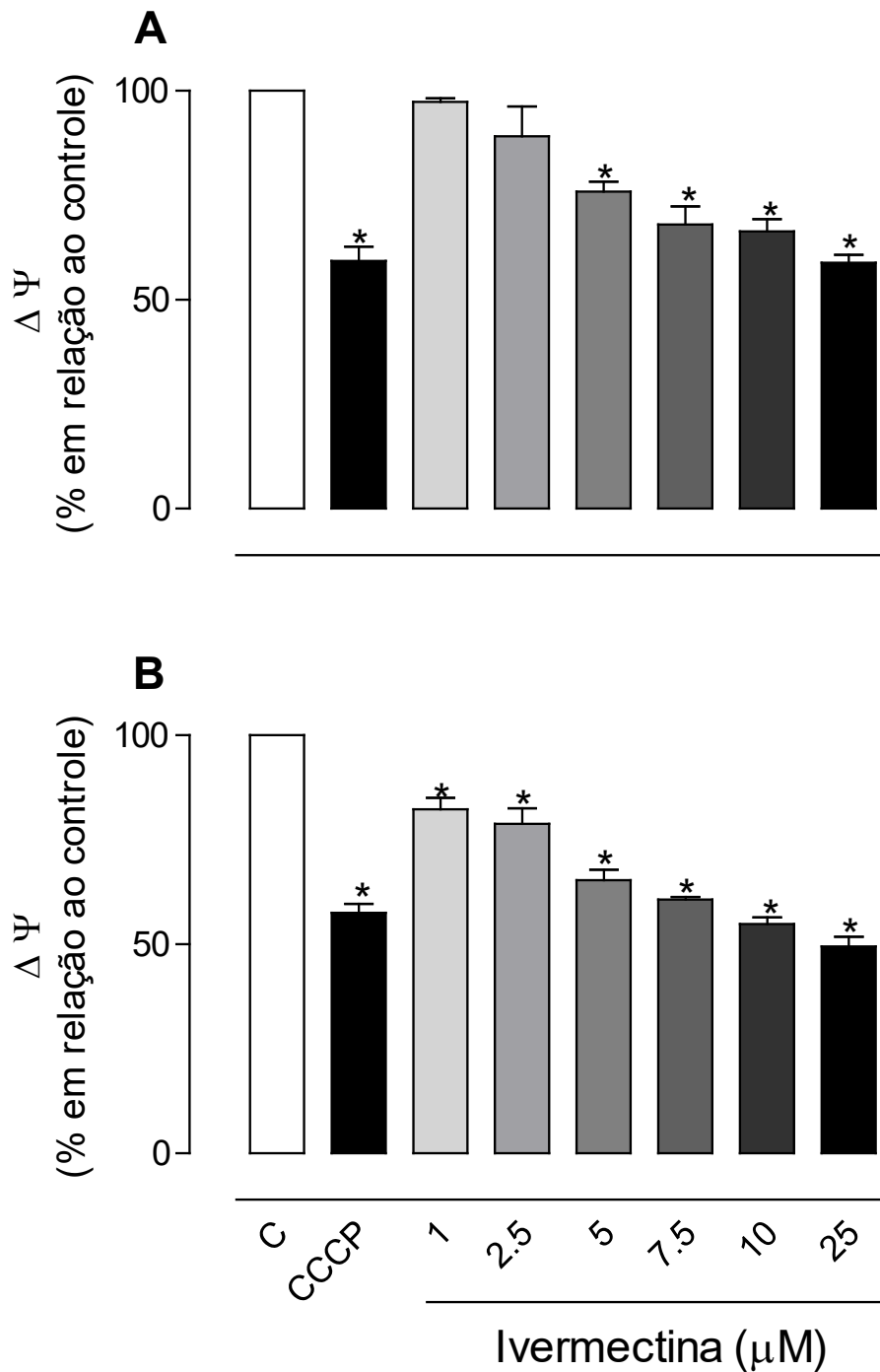
Fonte: Elaborado pelo autor usando o programa GraphPad Prism 4.0.

5.2 Ensaio de Atividade Mitocondrial

5.2.1 Efeito da Ivermectina Sobre o Potencial de Membrana Mitocondrial

Foram observadas alterações no potencial de membrana mitocondrial das células HepG2 expostas às diferentes concentrações de IVM. Nota-se que após 24 h de exposição houve diminuição estatisticamente significativa a partir da concentração de 5 μ M de ivermectina (Figura 13A). Para o tempo de 48 h, nota-se que houve diminuição significativa em todas as dosagens testadas aumentando progressivamente com o aumento da dose chegando a cerca de 50% de diminuição nas maiores dosagens testadas (Figura 13B).

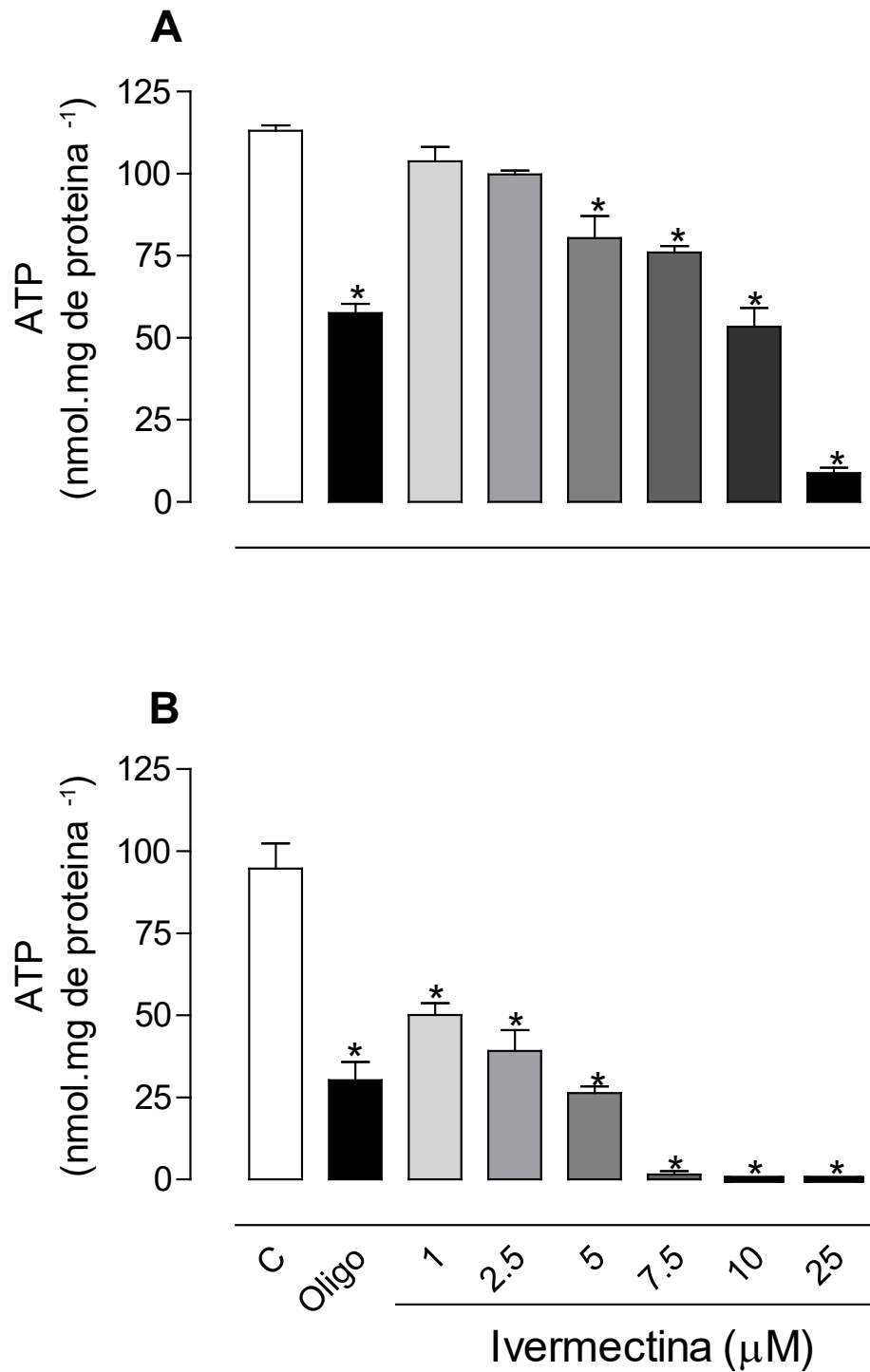
Figura 13 - Potencial de membrana mitocondrial nas células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina (1; 2,5; 5; 7,5; 10 e 25 μM) por 24 h (A) e 48 h (B). Os gráficos representam a média $\pm$ EPM de 3 repetições do experimento com diferentes culturas de células. * Estatisticamente significativa em relação ao controle ($P < 0,05$). C = controle, apenas 0,1% (v/v) de DMSO; CCCP = controle positivo com adição de cianeto de carbonil m-clorofenil-hidrazona 10 μM .



5.2.2 Efeito da Ivermectina na Concentração Celular de ATP

A ivermectina afetou a concentração de ATP nas células HepG2, provocando diminuição significativa a partir da concentração de 5 μM após 24 h de exposição (Figura 14A). Após 48 h de exposição o efeito se acentua, observando-se diminuição significativa da concentração de ATP em todas as dosagens testadas. Nota-se ainda que a partir da dosagem de 7,5 μM o efeito de diminuição leva a concentração de ATP a níveis muito baixos, próximos a 0 nmol/mg de proteína (Figura 14B).

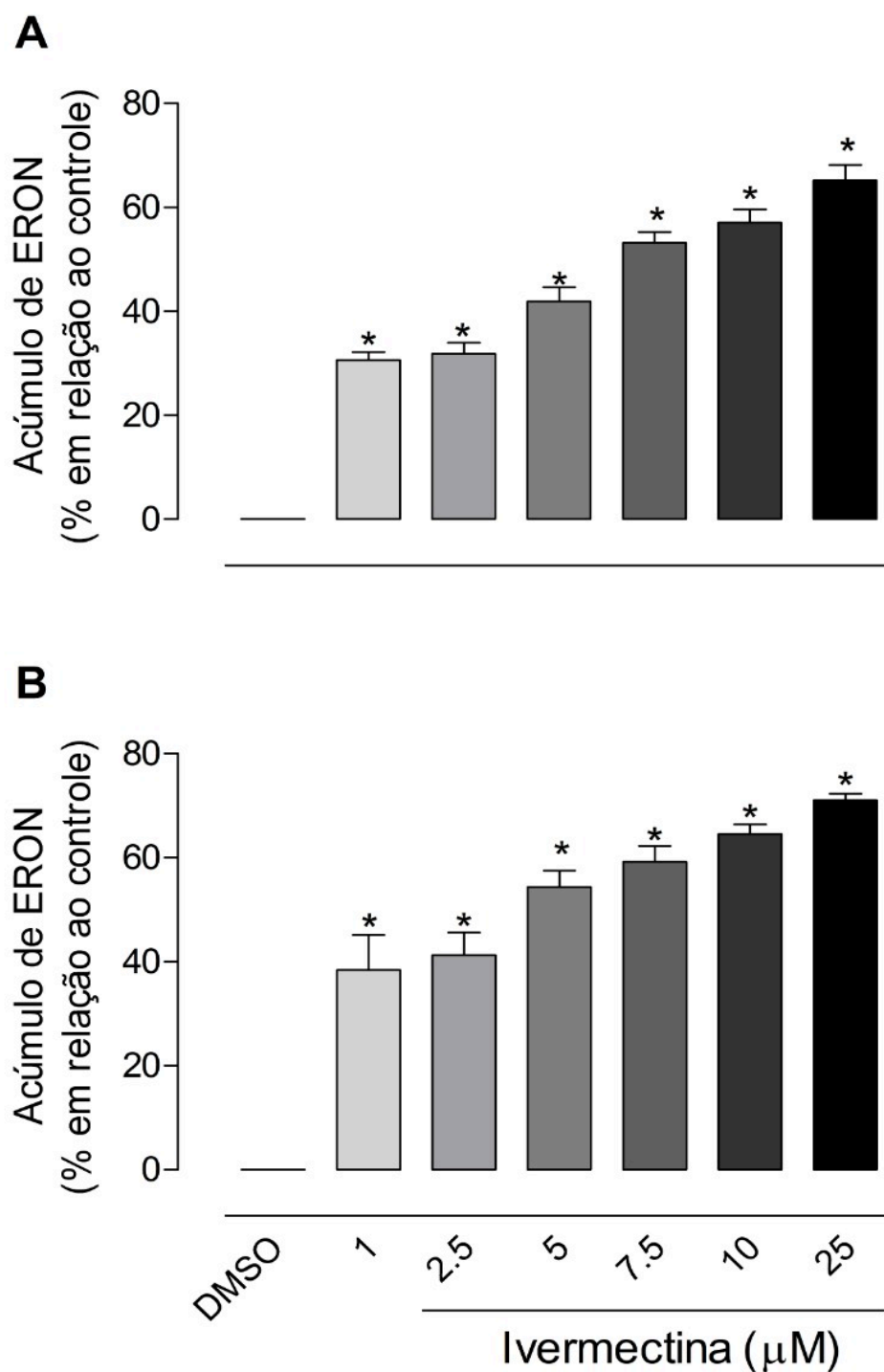
Figura 14 - Concentração de ATP nas células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina (1; 2,5; 5; 7,5; 10 e 25 μM) por 24 h (A) e 48 h (B). Os gráficos representam a média $\pm$ EPM de 3 repetições do experimento com diferentes culturas de células. * Estatisticamente significativo em relação ao controle ($P < 0,05$). C = controle, apenas 0,1% (v/v) de DMSO; Oligo = controle positivo com adição de oligomicina 1 $\mu\text{g/mL}$.



5.3 Efeito da Ivermectina Sobre a Produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio

A ivermectina induziu o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) levando ao acúmulo dessas substâncias nas células HepG2 de maneira dose e tempo-dependentes (Figura 15). Nota-se que houve aumento estatisticamente significativo da produção de ERON nos dois tempos de exposição ao antiparasitário (24 h e 48 h) já a partir da menor dosagem testada, sendo que este aumento superou 50% a partir de 7,5 μ M no tempo de 24 h (A) e a partir de 5 μ M no tempo de 48 h (B).

Figura 15 - Acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) nas células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina (1; 2,5; 5; 7,5; 10 e 25 μM) por 24 h (A) e 48 h (B). Os gráficos representam a média $\pm$ EPM de 3 repetições do experimento com diferentes culturas de células. * Estatisticamente significativa em relação ao controle ($P < 0,05$). C = controle, apenas 0,1% (v/v) de DMSO; t-BOOH = controle positivo com adição de terc-butil hidroperóxido 100 μM .



Fonte: Elaborado pelo autor usando o programa GraphPad Prism 4.0.

6 DISCUSSÃO

Para avaliar a citotoxicidade da ivermectina às células HepG2, foram utilizados os ensaios de proliferação celular, viabilidade celular e integridade da membrana celular. A IVM diminuiu a proliferação celular já a partir da dosagem de 1 μM tanto para o tempo de 24 h quanto para 48 h de exposição, aumentando progressivamente com o incremento da dosagem e do tempo. Esse efeito de diminuição da proliferação indica citotoxicidade pois demonstra a dificuldade das células HepG2 em se multiplicar. Park, Song e Lim (2020) trabalhando com células de epitélio mamário bovino (MAC-T), também observaram que após tratamento por 24 h, a IVM diminuiu a proliferação celular, iniciando na dosagem de 0,5 μM , aumentando progressivamente com o incremento da dosagem até 2 μM , onde se observou diminuição de cerca de 50% da proliferação celular. Os autores observaram ainda, que a parada do ciclo celular ocorreu no estágio sub-G1, suprimindo o crescimento e proliferação das células.

A IVM diminuiu a viabilidade celular, constatada pelo teste de exclusão do azul de tripan, onde se observou, no tempo de 24 h de tratamento, diminuição significativa da porcentagem de células viáveis iniciando a partir da dosagem de 2,5 μM , aumentando progressivamente com o aumento da dose, ultrapassando 50% de diminuição das células viáveis na dose de 25 μM . Já no tempo de 48 h de tratamento, o efeito ocorreu para todas as dosagens testadas, aumentando progressivamente com o incremento da dose, chegando a superar 50% de diminuição de células viáveis nas dosagens de 10 μM e 25 μM , indicando efeito dose e tempo dependentes.

No ensaio do teste do corante MTT, estuda-se a capacidade metabólica das células, demonstrada pela diminuição da capacidade de redução do corante MTT a sais de formazan. A diminuição da capacidade metabólica dificulta a realização dos vários processos metabólicos, incluindo a atividade mitocondrial e consequentemente a capacidade de produção de ATP. Neste estudo, foi observada a diminuição da viabilidade celular avaliada pelo teste do MTT, a partir da dose de 2,5 μM , tanto após 24 h quanto após 48 h de exposição, aumentando progressivamente com o incremento da dosagem e do tempo, sendo que nas dosagens de 10 μM e 25 μM em 48 h de tratamento a redução supera os 50% de diminuição da viabilidade. Jia, Han e Wang (2022) trabalhando com células H9c2 (cardiomiócitos de rato), também observaram em seu estudo (que utilizou o Kit CCK-8, o qual utiliza outro tipo de tetrazolium que será transformado a sal de formazan) que a IVM diminuiu a

capacidade metabólica das células após tratamento por 6 h, a partir da dosagem de 1 μ M, aumentando progressivamente com o aumento da dose até a dose 8 μ M. Observaram ainda que o efeito supera os 50% de diminuição, a partir da dosagem de 2 μ M. Resultados similares aos observados em nossa pesquisa.

A IVM levou à perda da integridade da membrana das células HepG2 que foi mensurada através da medida da atividade da enzima LDH que é uma enzima citosólica que quando aumentada no meio de cultivo (extracelular) indica a perda da integridade da membrana, provocada neste caso pela ação citotóxica da IVM. Na análise realizada, observou-se o aumento da atividade da enzima LDH no meio de cultivo, em todas as dosagens testadas tanto para o tempo de 24 h quanto para o tempo de 48 h, aumentando progressivamente com o aumento da dose e do tempo de tratamento. Isso indica que houve perda da integridade da membrana celular permitindo que a LDH saísse do meio intracelular para o extracelular.

Outras análises igualmente importantes para se avaliar os mecanismos de toxicidade da ivermectina nas células HepG2 são os ensaios de atividade mitocondrial (avaliação do efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial e a produção de ATP). A mitocôndria é a principal organela envolvida no metabolismo celular e na produção de energia por meio da síntese de ATP, que ocorre por meio das reações de oxidação das coenzimas NADH e FADH₂ na cadeia de transporte de elétrons. Em conjunto com isso, ocorre a ativação da bomba de prótons (H⁺) que os bombeia da matriz mitocondrial para o espaço entre as membranas mitocondriais, gerando o potencial de membrana mitocondrial (que é um gradiente eletroquímico gerado pelos íons H⁺). Posteriormente os íons H⁺ retornam à matriz propiciando a ação da enzima F₀F₁-ATP sintase formando o ATP (MAIOLI *et al.*, 2013).

Quando a atividade das mitocôndrias é afetada, sua capacidade na produção de energia cai, impossibilitando a realização das atividades básicas celulares, inclusive de manutenção da homeostase, levando a célula a desencadear mecanismos de morte celular (como apoptose e necrose). A apoptose pode ocorrer por duas formas diferentes, sendo uma pela via extrínseca (citoplasmática) e a outra pela via intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca é desencadeada pela ativação dos receptores para os fatores de necrose tumoral (rTNF) por substâncias ligantes específicas que ativam a cascata das caspases resultando em morte celular por apoptose. A via intrínseca é ativada por fatores estressantes intra e extracelulares como diminuição dos fatores de crescimento, danos ao DNA, hipóxia ou ativação de

oncogenes. Quando esses estímulos deletérios atingem a mitocôndria, levam ao colapso do potencial de membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi_m$), e ao aumento da permeabilidade mitocondrial fazendo com que a água do espaço intermembranas chegue à matriz mitocondrial levando à ruptura da organela por aumento de volume causado pelo excesso de água e por consequência, ocorre a liberação para o citoplasma, de substâncias pró-apoptóticas. Essas alterações levam à diminuição da síntese de ATP e à produção e acúmulo de ERON mitocondrial que levam a eventos que dão início ao processo de apoptose como dano oxidativo e ativação de caspases (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Neste estudo, no ensaio para avaliar o potencial de membrana mitocondrial, observou-se que após 24 horas de exposição, a IVM promoveu diminuição estatisticamente significativa do potencial de membrana, a partir da concentração 5 μM aumentando progressivamente. Já para o tempo de 48 h foi observado que houve diminuição significativa em todas as concentrações testadas, mantendo relação dose e tempo dependentes. O efeito indica que houve ruptura do potencial de membrana mitocondrial, ativando a via mitocondrial para a apoptose, que poderia ser confirmado com a mensuração de proteínas pró-apoptóticas.

Esse resultado foi corroborado por outros estudos utilizando diferentes linhagens celulares como células de epitélio mamário bovino (MAC-T), células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), células de trofoblasto (pTr) e de epitélio luminal uterino de suínos (pLE), onde a IVM levou à despolarização da membrana mitocondrial por aumento da concentração de Ca^{2+} mitocondrial que leva à abertura dos canais de poro de permeabilidade mitocondrial liberando proteínas apoptóticas (Bax, Caspase-3, Caspase-9, PARP-1 e Citocromo C) e diminuindo a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 além de promover o acúmulo de ERON levando a estresse oxidativo, importantes vias de ativação da morte celular por apoptose pela via mitocondrial (PARK; SONG; LIM, 2020; ZHANG *et al.*, 2022; LEE *et al.*, 2019).

Zhou *et al.* (2021) encontrou resultados similares corroborando com nossa pesquisa, ao trabalhar com linhagens celulares de câncer colorretal (CRC SW480 e SW1116). Ele observou que a IVM levou à diminuição da proliferação celular através da promoção de apoptose celular, aumentando a expressão da proteína apoptótica Bax, diminuindo a proteína antiapoptótica Bcl-2 e ativando a Caspase-3, enzima também envolvida na ativação do processo de apoptose.

O colapso da membrana mitocondrial provocado pela IVM, desencadeia os processos de mitofagia e apoptose levando à queda brusca da concentração de ATP celular, impedindo a realização dos processos metabólicos celulares levando à diminuição da proliferação e viabilidade das células HepG2. No estudo realizado, foi observado que a IVM promoveu diminuição significativa na concentração de ATP das células HepG2 após 24 h de tratamento, a partir de 5 μM , efeito que se acentuou progressivamente até a concentração de 25 μM . No tempo de 48 h foi observado efeito bem mais intenso, iniciando a partir da dosagem de 1 μM , sendo que a partir de 7,5 μM o efeito se torna praticamente máximo com níveis muito baixos na concentração de ATP (próximos a 0 nmol.mg de proteína⁻¹). Como o ATP é uma molécula necessária para o fornecimento de energia e realização de diversos processos celulares, sua falta desencadeia processo de morte celular por necrose. Efeito semelhante foi observado por Zhang *et al.* (2020) em pesquisa realizada com linhagem celular HeLa, derivada de um carcinoma cervical humano, tratada com IVM.

Também corroborando com os resultados desta pesquisa, Jia, Han e Wang (2022) em estudo utilizando uma linhagem celular de cardiomiócitos de rato (H9c2) observaram que a IVM provocou mitofagia, levando a diminuição dos níveis de ATP mitocondrial e despolarização da membrana mitocondrial, levando por sua vez a dano das mitocôndrias por aumento da permeabilidade após abertura dos canais de poro de transição de permeabilidade mitocondrial. As mudanças na permeabilidade mitocondrial estão provavelmente relacionadas ao processo de mitofagia, associadas ao aumento da expressão das proteínas PINK1 e Parkin. Com a lesão mitocondrial e o processo de mitofagia há então importante diminuição da produção do ATP mitocondrial relacionada com morte celular por necrose ou apoptose.

Outro mecanismo de toxicidade é o estresse oxidativo causado pelas ERON, que são compostas principalmente por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion radical superóxido e o radical hidroxila. O estresse oxidativo ocorre por desequilíbrio entre os sistemas antioxidantes celulares e o aumento excessivo da produção de ERON, que pode induzir a importantes alterações moleculares nas células como desnaturação de proteínas, peroxidação lipídica e alterações na atividade das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido desmutase, glutathione peroxidase e glutathione reductase), resultando em lesões celulares que podem inclusive levar à morte celular (OGUEJI *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2022).

Zhang *et al.* (2017), trabalhando com células HepG2, observou que a avermectina B₁ diminuiu a viabilidade das células e o potencial de membrana mitocondrial, além de induzir a apoptose mediada pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. Eles demonstraram que a avermectina induziu alterações apoptóticas típicas como fragmentação de DNA além de condensação de cromatina. Essas alterações levaram ao aumento da proteína apoptótica Bax e diminuição proteína antiapoptótica Bcl-2, ativando as caspases 9 e 3 além de liberação do Citocromo C que estão envolvidos com o processo de apoptose.

Lee *et al.* (2019) observou que a IVM levou a aumento da concentração de Ca²⁺ mitocondrial e dos níveis de ERON intracelular que levam à abertura dos canais de poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP), levando ao colapso da membrana mitocondrial estimulando o aumento do citocromo C no citosol que por sua vez desencadeia o processo de apoptose. Além disso, o aumento das ERON leva ao estresse oxidativo, contribuindo para o aumento da disfunção mitocondrial. Concluiu ainda, que o processo de disfunção das mitocôndrias, causada pela IVM, leva ao aumento do Ca²⁺ e das ERON, induzindo então, morte celular por apoptose.

Neste estudo observou-se que a IVM provocou aumento estatisticamente significativo na produção de ERON nas células HepG2 para todas as dosagens testadas nos dois tempos de exposição (24 h e 48 h). Observou-se ainda que a produção foi maior que 50% a partir da dose de 7,5 µM após 24 h e a partir da dose de 5 µM após 48 h de exposição. Entende-se, portanto, que o aumento observado na produção de ERON induzido pela IVM pode representar um dos mecanismos envolvidos na toxicidade da IVM sobre as células HepG2.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto, que a ivermectina é tóxica às células HepG2 induzindo o colapso do potencial de membrana mitocondrial, que leva à diminuição da produção de ATP, além do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que podem levar ao estresse oxidativo. A toxicidade aumenta com aumento da dose e com o tempo de exposição indicando que sua utilização deve ser criteriosa. Sugerimos estudos futuros para avaliar substâncias antioxidantes que apresentem potencial efeito protetor contra a ação da ivermectina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTMAN, D. G. Construction of age-related reference centiles using absolute residuals. **Statistics in medicine**, Oxford, v. 12, n. 10, p. 917-924, 1993.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O. D.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios **Revista de Nutrição**, [s.l.], v. 23, n. 4, p. 629-643, ago. 2010.

BATIHA, G. E. S.; ALQAHTANI, A.; ILESANMI, O. B.; SAATI, A.A.; EL-MLEE, A.; HETTA, H.F.; BESHBIHY, A.M. Avermectin derivatives, pharmacokinetics, therapeutic and toxic dosages, mechanism of action, and their biological effects. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 13, n. 8, p. 196-232, 2020.

CANGA, A. G.; PRIETO, A. M. S.; LIÉBANA, M. J. D.; MARTÍNEZ, N. F.; VEGA, M. S.; VIEITEZ, J. J. G. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. **The Veterinary Journal**, London, v. 179, n. 1, p. 25-37, 2009.

CARVALHO, W. L. D.; MAIOLI, M. A.; MENDES, L. C. N.; ROZZA, D. B.; INGATTO, F. E. Mecanismos da intoxicação do fígado de rato causada pelo gossipol. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 339-344, 2013.

CHERNYAK, B. V.; IZYMOV, D. S.; LYAMZAEV, K. G.; PASHKOVSKAYA, A. A.; PLETJUSHKINA, O.Y.; ANTONENKO, Y. N.; SAKHAROV, D. V.; WIRTZ, K. W. A.; SKULACHEV, V. P. Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1757, p. 525-534, 2006.

CHOI, J. M.; OH, S. J.; LEE, S. Y.; IM, J. H.; OH, J. M.; RYU, C. S.; KWAK, H. C.; LEE, J.Y.; KANG, K. W.; KIM, S. K. HepG2 cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics. **Archives Of Pharmacal Research**, Seoul, v. 38, n. 5, p. 691-704, 2014.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid Colorimetric Assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reability. **Immunol. Methods**, [s.l.], v. 22, p. 271-277, 1986.

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. 2021. Disponível em: <https://www.fao.org/brasil/pt/>. Acesso em: 13 fev. 2023.

GABALLH, M.; EL-MASHAD, A. B.; AMIN, A.; DARWEISH, M. Pathological studies on effects of ivermectin on male and female rabbits. **Banha Veterinary Medical Journal**, Alcherqah, v. 32, n. 1, p. 104-112, 2017.

GERENUTTI, M.; SPINOSA, H. S. Avermectinas: revisão do uso e da ação sobre o SNC. **Biotemas**, Florianópolis, v. 10, n. 2, p. 7-27, 1997.

GONZÁLEZ-PONCE, H.; RINCÓN-SÁNCHEZ, A.; JARAMILLO-JUÁREZ, F.; MOSHAGE, H. Natural Dietary Pigments: potential mediators against hepatic

damage induced by over-the-counter non-steroidal anti-inflammatory and analgesic drugs. **Nutrients**, Basel, v. 10, n. 2, p. 117-216, 2018.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. D. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUILLOUZO, A. Liver cell models in vitro toxicology. **Environmental Health Perspectives**, [s.l.], v. 106, n. 2, p. 511-532, 1998.

HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RAVELO-PÉREZ, L. M.; HERNÁNDEZ-SUÁREZ, E. M.; CARNERO, A.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Analysis of abamectin residues in avocados by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], v. 1165, n. 1-2, p. 52-57, 2007.

IMBERTI, R.; NIEMINEN, A.-L.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J.J. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporine A and trifluoperazine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Rockville, v.265, p.392-400, 1993.

JIA, Y.; HAN, B.; WANG, R. Ivermectin induces mitophagy in H9c2 cells via activation of the PINK1/Parkin pathway. **Food Science and Technology**, San Jose, v. 42, p. 1-8, 2022.

JUAREZ, M.; SCHCOLNIK-CABRERA, A.; DUEÑAS-GONZALEZ, A. The multitargeted drug ivermectin: from an antiparasitic agent to a repositioned cancer drug. **American Journal of Cancer Research**, Madison, v. 8, n. 2, p. 317-331, 2018.

KONGMANAS, K.; PUNYADEE, N.; WASUWORAWONG, K.; SONGJAENG, A.; PROMMOOL, T.; PEWKLIANG, Y.; MANOCHEEWA, S.; THIEMMECA, S.; PUTTIKHUNT, C.; AVIRUTNAN, P. Immortalized stem cell-derived hepatocytelike cells: an alternative model for studying dengue pathogenesis and therapy. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, p. 1-32, 2020.

LAING, R.; GILLAN, V.; DEVANEY, E. Ivermectin – Old Drug, New Tricks? **Trends In Parasitology**, Cambridge, v. 33, n. 6, p. 463-472, 2017.

LASOTA, J. A.; DYBAS, R. A. Avermectins, a novel class of compounds: implications for use in arthropod pest control. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, p. 91-117. 1991.

LEE, J. Y.; LIM, W.; HAM, J.; KIM, J.; YOU, S. SONG, G. Ivermectin induces apoptosis of porcine trophectoderm and uterine luminal epithelial cells through loss of mitochondrial membrane potential, mitochondrial calcium ion overload, and reactive oxygen species generation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 159, p. 144-153, 2019.

LI, M.; CHEN, Z.; LIN, X.; ZHANG, X.; SONG, Y.; WEN, Y.; LI, J. Engineering of avermectin biosynthetic genes to improve production of ivermectin in *Streptomyces avermitilis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 18, n. 20, p. 5359-5363, 2008.

LI, S.; TAN, H. Y.; WANG, N.; ZHANG, Z. J.; LAO, L.; WONG, C. W.; FENG, Y. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, n. 11, p. 26087-26124, 2 nov. 2015.

MAIOLI, M. A.; MEDEIROS, H. C.D. de; GUELFI, M.; TRINCA, V.; PEREIRA, F. T.V.; MINGATTO, F. E. The role of mitochondria and biotransformation in abamectin-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. **Toxicology In Vitro**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 570-579, 2013.

MASARONE, M.; ROSATO, V.; DALLIO, M.; GRAVINA, A. G.; AGLITTI, A.; LOGUERCIO, C.; FEDERICO, A.; PERSICO, M. Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, London, v. 2018, p. 1-14, 11 jun. 2018.

OGUEJI, E. I.; NWANI, C.; MBAH, C.; IHEANACHO, S.; NWEKE, F. Oxidative stress, biochemical, lipid peroxidation, and antioxidant responses in *Clarias gariepinus* exposed to acute concentrations of Ivermectin. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 27, n. 14, p. 16806-16815, 5 2020.

ONU – ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. Disponível em: <https://news.un.org/pt/story/2022/11/1805342>. Acesso em: 13 fev. 2023.

PARK, H.; SONG, G.; LIM, W. Ivermectin-induced programmed cell death and disruption of mitochondrial membrane potential in bovine mammary gland epithelial cells. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 163, p. 84-93, 2020.

QURESHI, S. Biochemical Toxicity of Ivermectin in Wistar Albino Rats. **American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences**, Dubai, v. 1, n. 5, p. 15-19, 2013.

RABAB, R. E.; AZIZA, A.; AHLAM, F. H.; ABDEL, F. A. Toxicological and pathological studies of Ivermectin on male albino rats. **Journal of American Science**, Dubai, v. 11, n. 3, p. 73-83, 2015.

RENDIC, S. P. Metabolism and interactions of Ivermectin with human cytochrome P450 enzymes and drug transporters, possible adverse and toxic effects. **Archives of Toxicology**, Heidelberg, v. 95, n. 5, p. 1535-1546, 2021.

SAQIB, M.; ABBAS, G.; MUGHAL, M. N. Successful management of ivermectin-induced blindness in an African lion (*Panthera leo*) by intravenous administration of a lipid emulsion. **BMC Veterinary Research**, London, v. 11, n. 1, 2015.

SKEHAN, P.; SORENG, R.; SCUDEIRO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENEY, S.; BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Nat. Cancer Inst.**, [S.l.], v. 82, p. 1107-1112, 1990.

SPARSA, A.; BONNETBLANC, J. M.; PEYROT, I.; LOUSTAUD-RATTI, V.; VIDAL, E.; BÉDANE, C. Effets secondaires de l'ivermectine utilisée dans le traitement de la gale. **Annales de Dermatologie et de Vénéréologie**, [S.l.], v. 133, n. 10, p. 784-787, 2006.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, Hoboken, v. 111, p. A3.B1-A3B3, 2015

TOLOSA, L.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; PÉREZ-CATALDO, G.; CASTELL, J. V.; DONATO, M. T. HepG2 cells simultaneously expressing five P450 enzymes for the screening of hepatotoxicity: identification of bioactivable drugs and the potential mechanism of toxicity involved. **Archives of Toxicology**, Heidelberg, v. 87, n. 6, p. 1115-1127, 9 fev. 2013.

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/reporthandler.ashx?reportId=2738&templateId=23&format=html&fileName=Beef%20and%20Veal%20Production%20-%20Selected%20Countries%20Summary>. Acesso em: 14 fev. 2023.

VEIT, O.; BECK, B.; STEUERWALD, M.; HATZ, C. First case of ivermectin-induced severe hepatitis. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 100, n. 8, p. 795-797, 2006.

ZANOLI, J. C. C.; MAIOLI, M. A.; MEDEIROS, H.C.D.; MINGATTO, F. E. Abamectin affects the bioenergetics of liver mitochondria: a potential mechanism of hepatotoxicity. **Toxicology In Vitro**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 51-56, 2012.

ZHANG, P.; NI, H.; ZHANG, Y.; XU, W.; GAO, J.; CHENG, J.; TAO, L. Ivermectin confers its cytotoxic effects by inducing AMPK/mTOR-mediated autophagy and DNA damage. **Chemosphere**, Oxford, v. 259, p. 127448-127457, 2020.

ZHANG, Y.; SUN, T.; LI, M.; LIN, Y.; LIU, Y.; TANG, S.; DAI, C. Ivermectin-Induced Apoptotic Cell Death in Human SH-SY5Y Cells Involves the Activation of Oxidative Stress and Mitochondrial Pathway and Akt/m TOR-Pathway-Mediated Autophagy. **Antioxidants**, Basel, v. 11, n. 5, p. 908-926, 2022.

ZHANG, Y.; WU, J.; XU, W.; GAO, J.; CAO, H.; YANG, M.; WANG, B.; HAO, Y.; TAO, L. Cytotoxic effects of Avermectin on human HepG2 cells in vitro bioassays. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 220, p. 1127-1137, jan. 2017.

ZHOU, S.; WU, H.; NING, W.; WU, X.; XUM X.; MA, Y.; LI, X.; HU, J.; WANG, C.; WANG, J. Ivermectin has New Application in Inhibiting Colorectal Cancer Cell Growth. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 12, 2021.