

EFEITOS DA IVERMECTINA SOBRE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO

Gabriel Conti Souto (PIBIC/CNPq), Evelyn Silva Moreira (Coorientador), Livia Bracht (Orientador). E-mail: lbracht@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Ciências Biológicas II/Bioquímica

Palavras-chave: avermectinas; toxicidade; respiração mitocondrial.

RESUMO

A ivermectina é um antiparasitário frequentemente utilizado na medicina veterinária e na clínica humana. Durante a pandemia de COVID-19, a ivermectina foi usada como medida tanto profilática quanto de tratamento para a COVID-19, apesar de não haverem confirmações de sua eficácia clínica para o tratamento da doença. Sinais e sintomas médicos foram observados em pacientes que fizeram o uso irracional ou inadvertido do medicamento. Portanto, com o intuito de avaliar as possíveis consequências hepáticas relacionadas a isso, a metodologia adotada pelo presente trabalho foi o isolamento de mitocôndrias intactas e rompidas de ratos e a avaliação do seu consumo de oxigênio na presença de diferentes substratos e concentrações de ivermectina. Os resultados obtidos através da respiração de mitocôndrias intactas, na presença de ivermectina e com o succinato como substrato, demonstraram que a partir da concentração de 5 μ M o fármaco causou diminuição no consumo de oxigênio do Estado III da respiração mitocondrial. Todavia, quando o substrato utilizado fora o glutamato, não só houve alteração no consumo de O₂ do Estado III, mas também do Estado Basal e IV. A análise do consumo de oxigênio, através da respiração de mitocôndrias rompidas, teve como seu propósito determinar em qual complexo mitocondrial estaria havendo a inibição do transporte de elétrons pela ação da ivermectina. Os resultados mostraram que a inibição está ocorrendo entre os complexos I e III e II e III. Logo, através dos resultados obtidos, conclui-se que a ivermectina provoca inibição na respiração mitocondrial de fígado de rato.

INTRODUÇÃO

A ivermectina é um antiparasitário conhecido por ser frequentemente utilizado na medicina veterinária e na clínica humana. Quimicamente é uma lactona macrocíclica produzida através de fermentação por actinomicetos do gênero *Streptomyces avermitilis* e é usualmente prescrita para o tratamento de diversas infecções internas por nematódeos e ectoparasitoses.

Durante a pandemia de COVID-19, a ivermectina foi objeto de grande polêmica devido ao seu uso como medida tanto profilática quanto de tratamento para a

COVID-19. A polêmica também estava relacionada com a publicação de estudos, os quais demonstravam que a ivermectina apresentava atividade antiviral (*in vitro*) contra o vírus SARS-CoV-2 em células infectadas experimentalmente. Todavia, a eficácia clínica desse medicamento para o tratamento da COVID-19 não foi confirmada (REIS et al., 2022). Sinais e sintomas médicos foram observados em pacientes como consequência do uso irracional e inadvertido do medicamento. O mecanismo mais direto de toxicidade hepática é a interação específica do tóxico com um componente celular, como por exemplo mitocôndrias, e subsequente modulação de sua função. As mitocôndrias realizam uma variedade de processos bioquímicos, mas sua função principal está relacionada a bioenergética, sendo ela produzir a maioria do ATP celular (CASTANHA ZANOLI et al., 2012). Levando em consideração todas as questões apresentadas anteriormente, o objetivo do presente projeto foi realizar um estudo sistemático dos efeitos da ivermectina na bioenergética de mitocôndrias de fígado de rato.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos machos albinos Wistar, pesando entre 180 a 220 g. Os animais foram alimentados com ração balanceada e receberam água *ad libitum*. Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEM (CEUA nº 5226031121). As mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial em meio constituído de manitol 200 mM, sacarose 75 mM, TRIS 2 mM e etileno glicol ácido tetra-acético (EGTA) 0,2 mM e albumina de soro bovino 50 mg%, pH 7,4 (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003). O consumo de oxigênio foi medido polarograficamente usando um eletrodo de platina revestido de teflon (VOSS; CAMPELLO; BACILA, 1961). As mitocôndrias (1 mg proteína/mL) foram incubadas na câmara fechada do oxígrafo em meio contendo manitol 250 mM, KCl 10 mM, etilenoglicol ácido tetra-acético (EGTA) 5 mM, TRIS 10 mM (pH 7.4) e fosfato de potássio 5 mM.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas mitocôndrias intactas que utilizaram o succinato (10mM) + rotenona (5µM) como seu substrato, a adição da ivermectina no meio, dentro da câmara fechada do oxígrafo, fez com que o consumo de oxigênio pela mitocôndria diminuísse drasticamente no Estado III. O efeito sobre a respiração do Estado III foi bifásico, sendo observado um rápido declínio do consumo de oxigênio até 25 µM, alcançando 74% de inibição. A partir desta concentração, contudo, houve uma estabilização do efeito nas maiores concentrações (Figura 1A). Por outro lado, nas mitocôndrias intactas que tiveram como seu substrato o glutamato (10mM) + malato (10mM), a adição de ivermectina ao meio fez com que houvesse um aumento de 127% no consumo de O₂ do Estado Basal até a concentração de 50 µM. Um aumento significativo no consumo de oxigênio também ocorreu no Estado IV até a concentração de 50 µM. Todavia, no Estado III houve uma diminuição no consumo

de oxigênio de 45% até a concentração de 25 μM . Em todos os estados a partir da concentração de 50 μM , houve estabilização do efeito (Figura 1B).

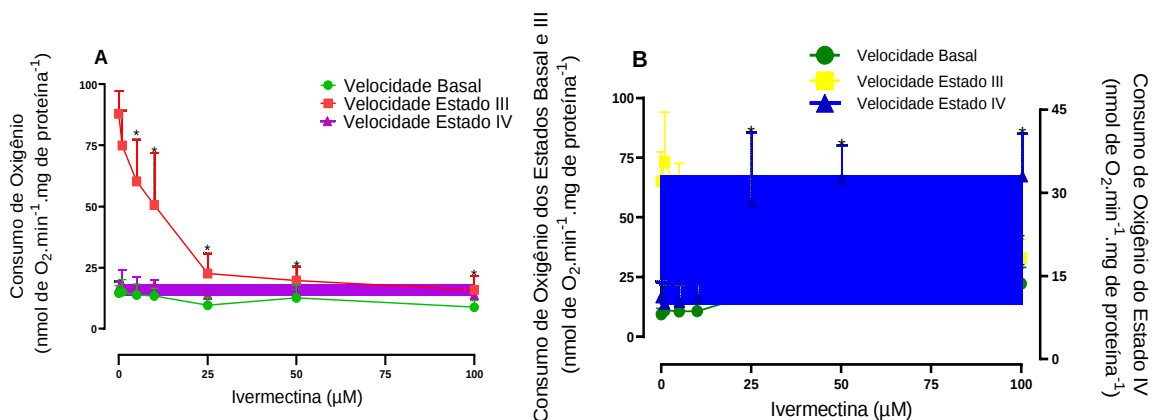


Figura 1 - Efeitos da ivermectina sobre a respiração de mitocôndrias intactas. Painel A) substrato succinato (10 mM) + rotenona (5 μM). Painel B) substrato glutamato (10 mM) + malato (10 mM). Os dados mostrados representam a média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). * denotam diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) em relação ao controle.

Com o intuito de esclarecer os efeitos da ivermectina sobre o consumo de oxigênio demonstrado, foram investigados os efeitos do fármaco sobre a atividade dos segmentos da cadeia respiratória. Quando o substrato utilizado foi o NADH, houve diminuição do consumo a partir da concentração de 25 μM e quando o substrato utilizado foi o succinato, houve diminuição a partir da concentração de 10 μM , significando que houve inibição no transporte de elétrons entre os complexos I e III e II e III, respectivamente. Quando se utilizou TMPD + ascorbato, não se observou diminuição no consumo, mostrando que não houve ação no complexo IV (Figura 2).

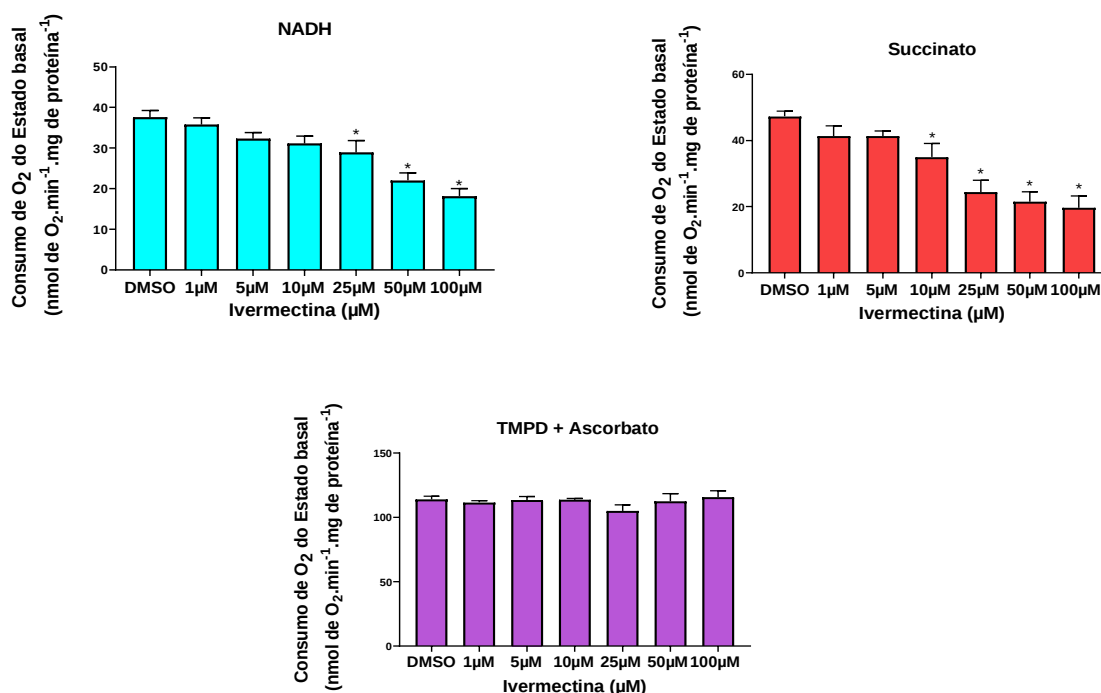


Figura 2 – Efeitos da ivermectina sobre a respiração de mitocôndrias rompidas tendo como substratos NADH, succinato e TMPD + ascorbato. Os dados representam média $\pm$ erro padrão. * denotam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Foram avaliados o segmento da NADH oxidase, que compreende toda a cadeia do NADH ao oxigênio; o segmento da succinato oxidase, que corresponde ao transporte de elétrons do complexo II ao oxigênio e a oxidação do TPMD + ascorbato, que corresponde à atividade do complexo IV.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho contribuem para um melhor entendimento sobre os efeitos da ivermectina no metabolismo energético mitocondrial. Podemos concluir que os mecanismos envolvidos com a interferência da ivermectina sobre a bioenergética mitocondrial são a inibição da transferência de elétrons entre os complexos I e III e II e III e possível efeito desacoplador em altas concentrações. Estes resultados podem contribuir com o esclarecimento em relação aos efeitos tóxicos da ivermectina.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo fomento e incentivo dados à pesquisa.

REFERÊNCIAS

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. **Métodos de laboratório em bioquímica**. Manole, 2003.

CASTANHA ZANOLI, J. C. *et al.* Abamectin affects the bioenergetics of liver mitochondria: A potential mechanism of hepatotoxicity. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n.1, p. 51–56, 1 fev. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22024101/>. Acesso em: 29 agosto 2023.

REIS, G. *et al.* Effect of Early Treatment with Ivermectin among Patients with Covid-19. **The New England Journal of Medicine**, v. 386, p. 1721-1731, 5 maio 2022. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa2115869>. Acesso em: 29 agosto 2023.

VOSS, D. O.; CAMPELLO, A. P.; BACILA, M. The respiratory chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. **Biochemical e biophysical research communications**, v. 4, p. 48-51, 25 jan. 1961. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13782159/>. Acesso em 29 agosto 2023.