INVESTIGAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO TOXICOGENÉTICA DOS ANTIPARASITÁRIOS NITAZOXANIDA E IVERMECTINA EM FIBROBLASTOS DE CAMUNDONGOS

Gabriel Henrique Destro Oliveira (PIBIC/CNPq), Gabrielle Aparecida Affonso, Mariane Aparecida Franco de Godoy (Coorientadora). Veronica Elisa Pimenta Vicentini (Orientadora). E-mail: vepvicentini@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas /Genética

Palavras-chave: Cultura de células; Citotoxicidade; Genotoxicidade.

RESUMO

Os medicamentos antiparasitários são utilizados no tratamento de infecções causadas por vermes, protozoários e ectoparasitas. Entre eles, destacam-se a nitazoxanida (NTZ) e a ivermectina (IVE), utilizadas na medicina humana e veterinária. Apesar da segurança estabelecida em condições terapêuticas, ainda existem lacunas sobre seus possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos. Assim, foram avaliados os efeitos de NTZ e IVE em células L-929, derivadas de fibroblastos de camundongo, por meio dos ensaios de MTT, exclusão por azul de trypan, cometa e micronúcleo, para avaliação da viabilidade celular, danos ao DNA e alterações cromossômicas, respectivamente. No MTT, ambos os fármacos promoveram alterações significativas na viabilidade celular. No ensaio com azul de trypan não houve diferença significativa. O ensaio do cometa evidenciou alterações nas classes de danos, na frequência de células danificadas e no escore de danos. E no micronúcleo, a NTZ apresentou alterações na frequência de células binucleadas e no total de micronúcleos. Portanto, os resultados indicam que NTZ e IVE podem interferir na viabilidade celular e na integridade do DNA, enquanto a NTZ também promoveu alterações cromossômicas, reforçando a importância da avaliação de seus efeitos toxicogenéticos.

INTRODUÇÃO

A ivermectina (IVE) e a nitazoxanida (NTZ) são fármacos utilizados no tratamento de infecções causadas por protozoários, parasitas e helmintos (AL-KURAISHY *et al*., 2022). Apesar do perfil de segurança estabelecido em condições terapêuticas, ainda existem lacunas quanto aos possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos desses fármacos, especialmente em situações de uso prolongado, superdosagem e indicações não aprovadas (GU *et al*., 2025). Estudos indicam que, em concentrações elevadas, NTZ e IVE podem estar relacionadas a

estresse oxidativo, alterações mitocondriais e danos ao material genético, levantando questões sobre seu potencial toxicogenético (WAGSTAFF *et al.*, 2012).

Diante da necessidade de investigar esses possíveis efeitos em nível celular, o cultivo *in vitro* torna-se uma ferramenta importante. Nesse sentido, a linhagem L-929, derivada de fibroblastos de camundongo, é utilizada em estudos de toxicidade e avaliação de efeitos celulares. Portanto, o presente estudo *in vitro* avaliou comparativamente os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos da NTZ e da IVE em células L-929, por meio dos ensaios do MTT, exclusão por azul de trypan, cometa e micronúcleo com bloqueio de citocinese, utilizando concentrações terapêuticas e supraterapêuticas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Tratamentos

Os fármacos Nitazoxanida ($C_{12}H_9N_3O_5S$) e Ivermectina ($C_{47}H_{72}O_{14}(H_2B_1b)$) foram obtidos de fontes comerciais e foram dissolvidos no momento de uso em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM).

Cultura de células

A linhagem L-929 derivada de fibroblasto de camundongo foi obtida do Banco Nacional de Células do Rio de Janeiro, e foram cultivadas até atingirem confluência de 70%. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO_2.

Ensaio do MTT

O ensaio do MTT foi realizado conforme Mosmann (1983), com adaptações. Células L-929 foram cultivadas em placas de 96 poços ($1x10^4$) e tratadas com NTZ e IVE nas concentrações de 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15, 20, 25 µg/mL, por 24, 48 e 72 horas. Após o tratamento, as células foram incubadas com o sal MTT (2 mg/mL) por 4 horas e, posteriormente, os cristais formados foram dissolvidos com dimetilsulfóxido. A absorbância foi determinada a 550 nm em leitor de microplacas, sendo calculada a viabilidade celular em relação ao controle.

Ensaio do cometa

Concomitante ao ensaio do cometa foi realizado o teste de exclusão com azul de trypan conforme Tice *et al.* (2000), com modificações. Células L-929 ($1x10^6$) foram tratadas com NTZ e IVE nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL, por 3 horas. Após a coleta, as células foram incorporadas em agarose, submetidas à lise e eletroforese alcalina e, posteriormente, coradas com brometo de etídio (0,002 mg/mL). A análise foi realizada por microscopia de fluorescência, sendo avaliadas 300 células por tratamento quanto ao grau de dano ao DNA, classificados de 0 a 3.

Ensaio do micronúcleo

O ensaio do micronúcleo foi realizado conforme Fenech (2000), com modificações. Células L-929 ($1x10^6$) foram tratadas com NTZ e IVE (5, 10 e 20 µg/mL), com adição de citocalasina B (5 µg/mL) para bloqueio da citocinese. Após a colheita, as células foram fixadas, as lâminas foram preparadas e coradas com Giemsa 5%. Foram analisadas 500 células por repetição em microscopia de luz, considerando células mono, bi, tri e polinucleadas, além da quantificação de 1.000 células binucleadas sem ou com micronúcleos, pontes e brotos nucleares.

Análises estatísticas

Os dados obtidos foram avaliados pela análise de variância ANOVA (*oneway*) e pelo teste de Dunnett, onde $\alpha=0,05$, $p<0,05$ e $n=3$, com auxílio do programa *GraphPad Prism* (versão 8.4.2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT demonstrou diferenças estatisticamente significativas após a exposição das células L-929 à NTZ e IVE. Para a NTZ, observou-se aumento da viabilidade em 0,5 e 1 µg/mL após 48 horas, enquanto as concentrações de 15 µg/mL, após 48 horas, 20 µg/mL, após 48 e 72 horas, e 25 µg/mL, nos três períodos avaliados, apresentaram redução da viabilidade celular. A IVE promoveu aumento da viabilidade em 0,5 µg/mL após 24 horas, enquanto as demais concentrações, 1, 2,5, 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL, apresentaram redução da viabilidade. De modo geral, ambos os fármacos apresentaram maior redução da viabilidade nas concentrações mais elevadas e nos maiores períodos de exposição, indicando maior efeito citotóxico nessas condições.

No ensaio do cometa, a NTZ apresentou aumento estatisticamente significativo de danos nas concentrações de 10 e 20 µg/mL, enquanto a IVE apresentou alterações nas concentrações de 5 e 10 µg/mL. Esses resultados indicam que ambos os fármacos podem comprometer a integridade do DNA em determinadas condições de exposição. No ensaio de azul de Trypan, não foram observadas diferenças significativas na viabilidade celular entre os tratamentos e o controle negativo.

No teste do micronúcleo, a NTZ apresentou alterações estatisticamente significativas no número total de micronúcleos e no número de células com mais de um micronúcleo na concentração de 10 µg/mL, indicando alterações cromossômicas e complementando os danos observados no ensaio do cometa. Na concentração de 20 µg/mL, a elevada redução no número de células impossibilitou a contagem das 1.000 células binucleadas, sendo analisadas apenas 500 células, resultado compatível com a elevada citotoxicidade observada no MTT.

Em conjunto, os resultados indicam que a exposição a concentrações elevadas de NTZ e IVE pode estar associada a alterações na viabilidade celular e na

integridade do material genético. Esses achados são consistentes com estudos que relacionam a exposição a concentrações elevadas desses fármacos a estresse oxidativo, alterações mitocondriais e danos ao material genético, reforçando a importância da investigação de seus potenciais efeitos toxicogenéticos (WAGSTAFF et al., 2012).

CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que NTZ e IVE apresentam efeitos sobre a viabilidade celular e a integridade do DNA em células L-929, enquanto a NTZ também promoveu alterações cromossômicas. A utilização conjunta dos ensaios permitiu uma avaliação complementar dos efeitos dos fármacos e contribuiu para a caracterização de seu potencial toxicogenético em células não tumorais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pelo financiamento e apoio, à Universidade Estadual de Maringá e ao Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental, pela estrutura e suporte, também aos meus colegas de laboratório, à minha orientadora e coorientadora, pela dedicação e contribuição para este trabalho.

REFERÊNCIAS

AL-KURAISHY, H. M.; BATIHA, G. E. S.; AL-GAREEB, A. I.; ELEKHNAWY, E. Nitazoxanide and COVID-19: a review. **Molecular Biology Reports**, v. 49, p. 11169–11176, 2022.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81–95, 2000.

GU, C.; ZHONG, H.; LUO, X.; YUAN, J.; GONG, G.; FENG, Y.; ZHANG, X.; FENG, X.; JIN, Y.; LI, J. Ivermectin induces oxidative stress and mitochondrial damage in *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 333, p. 110352, 2025.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single Cell Gel/Comet assay: Guideline for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206–221, 2000.

WAGSTAFF, K. M.; SIVAKUMARAN, H.; HEATON, S. M.; HARRICH, D.; JANS, D. A. Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β-mediated nuclear import. **Science**, v. 334, 2012.