# AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO FÁRMACO SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA EM FIBROBLASTO DE CAMUNDONGOS

Lukas Demori Oliveira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Mariane Aparecida Franco de Godoy, Renan Felipe Moreira Soterio, Michele Cristina Heck (Coorientadora), Veronica Elisa Pimenta Vicentini (Orientador). E-mail: vepvicentini@uem.br.

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

**Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas /Genética**

**Palavras-chave:** Plaquenil®; imunossupressores; viabilidade celular.

## RESUMO

A hidroxicloroquina é um fármaco imunossupressor amplamente utilizado no tratamento de doenças autoimunes e, apesar de seu uso terapêutico consolidado, ainda existem preocupações quanto aos seus possíveis efeitos tóxicos em nível celular. Este estudo avaliou, *in vitro,* os efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico do sulfato de hidroxicloroquina em fibroblastos de camundongo, linhagem L-929. As células foram expostas a diferentes concentrações do fármaco e analisadas pelos ensaios do MTT, exclusão por Azul de Trypan, Cometa e micronúcleo com bloqueio de citocinese. Os resultados do MTT demonstraram redução significativa da viabilidade celular, principalmente nas maiores concentrações e em diferentes períodos de exposição, indicando efeito citotóxico. No teste com Azul de Trypan não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações avaliadas e o controle. No ensaio do Cometa, foram observadas alterações significativas nos parâmetros de danos ao DNA, evidenciando efeito genotóxico. No teste do micronúcleo, foi observada redução do índice de proliferação com bloqueio de citocinese, com diminuição progressiva da proliferação celular conforme o aumento da concentração do fármaco. Em conjunto, os resultados demonstram que o sulfato de hidroxicloroquina pode interferir na viabilidade, proliferação celular e integridade do DNA, reforçando a importância da avaliação de seu potencial toxicogenético em diferentes condições de exposição.

## INTRODUÇÃO

A hidroxicloroquina (Plaquenil®) é um fármaco imunossupressor utilizado principalmente no tratamento de doenças autoimunes, como artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico, além de apresentar atividade antimalárica (Zhao *et al*., 2023). Apesar de seu uso terapêutico consolidado, o medicamento pode causar diferentes reações adversas, especialmente em situações de sensibilidade individual ou superdosagem (SANOFI-AVENTIS, 2006).

Durante a pandemia de COVID-19, o aumento expressivo do consumo de hidroxicloroquina e seu uso fora das indicações estabelecidas intensificaram as preocupações sobre seus possíveis efeitos tóxicos (Rasul, 2020; Pereira *et al*., 2021). Nesse contexto, estudos *in vitro* são importantes para investigar alterações celulares e genéticas associadas à exposição ao fármaco. Assim, o presente estudo avaliou os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do sulfato de hidroxicloroquina em fibroblastos de camundongos da linhagem L-929, por meio dos ensaios de MTT, Exclusão com Azul de Trypan, Cometa e Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese.

## MATERIAIS E MÉTODOS

*Solução de tratamento*

O sulfato de hidroxicloroquina (SH) foi obtido comercialmente e preparado a partir de um comprimido de 400 mg, com diluições sucessivas em meio de cultura até obtenção da solução de 4.000 µg/mL. A partir dela, foram preparadas as concentrações de uso: 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15; 20 e 25 µg/mL.

*Cultivo de fibroblasto de camundongo*

Devido à interrupção do crescimento da linhagem NIH/3T3, esta foi substituída pela linhagem L-929 derivada de fibroblasto de camundongo, obtida do Banco Nacional de Células do Rio de Janeiro, 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 $CO_2$.

*Teste de citotoxicidade (MTT)*

Conforme Mosmann (1983), com modificações, para o ensaio do MTT, $1\times10^4$ células/mL foram semeadas em placas de 96 poços e após 24 horas de estabilização, o meio foi descartado e substituído por 100 µL de meio completo contendo os tratamentos. As células foram expostas as diferentes concentrações de SH por 24, 48 e 72 horas. Após incubação, os tratamentos foram substituídos por meio com MTT (2 mg/mL) por 4 horas, seguido da solubilização dos cristais de formazan com DMSO e leitura da absorbância a 550 nm em leitor de microplacas. A viabilidade celular foi calculada pela razão entre a absorbância do tratamento e a do controle, expressa em porcentagem.

*Teste de genotoxicidade (Cometa) e ensaio de exclusão por azul de Trypan*

Concomitante ao Ensaio do Cometa foi realizado o teste de Exclusão com Azul de Trypan. As células, $1\times10^6$ células/mL por poço, foram expostas aos tratamentos por 3 horas de SH (5, 10 e 20 µg/mL). Para o ensaio Cometa, segundo Tice et al. (2000), com modificações, as células foram incorporadas em agarose,

submetidas à lise e eletroforese alcalina e analisadas em microscopia de fluorescência. Foram avaliadas 300 células por tratamento, classificadas em classes de dano de 0 a 3 para cálculo do escore de dano ao DNA.

*Teste de mutagenicidade (Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese)*

Após 44 horas do início da cultura, as células, $1\times10^6$ células/mL por poço, foram expostas aos tratamentos de SH (5, 10 e 20 µg/mL). Transcorridas 4 horas, foi adicionado citocalasina B (5 µg/mL) para bloqueio da citocinese, e as culturas foram mantidas a 37 °C até 72 horas. As células foram submetidas à centrifugação, tratamento hipotônico com KCl, fixação com metanol:ácido acético, preparação das lâminas e coloração com Giemsa 5%, sendo analisadas em microscópio de luz. Foram avaliadas 500 células por repetição para determinação do CBPI, e em 1.000 células binucleadas quantificados micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares como indicadores de genotoxicidade e mutagenicidade (FENECH, 2000).

*Análise estatística*

Os dados foram analisados por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Dunnett, considerando $p<0,05$ e $n=3$, com auxílio do programa GraphPad InStat 3.02.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação pelo MTT demonstrou redução significativa da viabilidade celular após 24 horas nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL de SH. Após 48 horas, apenas 2,5 µg/mL não diferiu significativamente do controle negativo, enquanto os demais tratamentos reduziram a viabilidade. Em 72 horas, as concentrações de 10 a 25 µg/mL apresentaram viabilidade inferior a 65%, enquanto 0,5 e 1,0 µg/mL promoveram aumento da viabilidade. Assim, o SH apresentou atividade citotóxica, com viabilidade inferior a 70% a partir da concentração de 10 µg/mL.

No ensaio do Cometa o controle positivo apresentou aumento significativo no índice de danos, confirmando a responsividade do ensaio. O SH na concentração de 10 µg/mL aumentou significativamente o total de células danificadas e o escore de danos em relação ao controle negativo, indicando a indução de lesões no DNA. Em relação a viabilidade pela exclusão com Azul de Trypan, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo.

Por sua vez, para o teste do micronúcleo o controle positivo apresentou elevada citotoxicidade, impossibilitando a contagem adequada de células binucleadas e a avaliação dos danos celulares. Entre os tratamentos com SH, a concentração de 10 µg/mL apresentou maior citotoxicidade. As concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL diferiram significativamente do controle quanto ao CBPI, com redução gradual conforme o aumento da concentração, indicando diminuição da proliferação celular, semelhante ao resultado do controle positivo.

## CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que o sulfato de hidroxicloroquina apresentou efeitos citotóxicos e genotóxicos em células L-929, promovendo alterações na viabilidade, sem comprometer a integridade da membrana plasmática, e na proliferação celular, além de induzir lesões passiveis de reparo no DNA. Em conjunto, os achados indicam que o fármaco pode interferir em diferentes parâmetros celulares, reforçando a importância da avaliação de seu potencial toxicogenético e da investigação de seus efeitos em diferentes condições de exposição.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Araucária pelo financiamento e apoio ao desenvolvimento deste projeto. Agradeço à Universidade Estadual de Maringá, ao Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, ao Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental, pela estrutura e suporte disponibilizados ao longo da realização deste trabalho, aos meus colegas de laboratório, agradeço pela parceria e pelas contribuições durante o desenvolvimento do projeto. Em especial, agradeço à Profª Drª Veronica Elisa Pimenta Vicentini e à Profª Drª Michele Cristina Heck, pela orientação, dedicação e contribuição essencial para a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

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

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

PEREIRA, S. J. C.; CARVALHO, A. R.; ARAÚJO NETO, J. F. O uso irracional de medicamentos na pandemia da COVID-19 e o papel do farmacêutico na sua prevenção. **Revista Artigos.Com**, v. 31, p. 9118-9118, 2021.

RASUL, C. H. Indiscriminate use of antimicrobials during COVID-19 pandemic. **Bangladesh Medical Journal Khulna**, v. 53, n. 1-2, p. 1-2, 2020.

SANOFI-AVENTIS U.S. LLC. *Plaquenil®* – **Hydroxychloroquine Sulfate, USP: bula do profissional de saúde**. Bridgewater, NJ: Sanofi-Aventis U.S. LLC, 2006.

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: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–221, 2000.