

**UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE DOUTORADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**DOSES TERAPÊUTICAS AGUDAS DE IVERMECTINA
PREJUDICAM A ESPERMATOGÊNESE COM ÊNFASE NA
ESPERMIOGÊNESE EM RATOS ADULTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

FLORA CORDEIRO

**São Paulo
2018
UNIVERSIDADE PAULISTA**

PROGRAMA DE DOUTORADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL

**DOSES TERAPÊUTICAS AGUDAS DE IVERMECTINA
PREJUDICAM A ESPERMATOGÊNESE E
ESPERMIOGÊNESE EM RATOS ADULTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Área de Concentração: Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Maria Martha Bernardi e Coorientadora Prof.^a Dr.^a Leoni Villano Bonamin.

FLORA CORDEIRO

São Paulo

2018

Cordeiro, Flora.

Doses terapêuticas agudas de ivermectina prejudicam a espermatogênese e espermogênese em ratos adultos / Flora Cordeiro. - 2018.

60 f. : il. color. + CD-ROM.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Patologia ambiental e Experimental.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Martha Bernardi.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Leoni Villano Bonamin.

1. Avermectina.
 2. Níveis de testosterona.
 3. Exame histológico.
 4. Morfometria.
 5. Imunohistoquímica.
- I. Bernardi, Maria Martha (Orientadora). II. Bonamin, Leoni Villano (coorientadora). III. Título.

Ficha elaborada pelo Bibliotecário Rodney Eloy CRB8-6450

FLORA CORDEIRO

**DOSES TERAPÊUTICAS AGUDAS DE IVERMECTINA
PREJUDICAM A ESPERMATOGÊNESE E ESPERMIOGÊNESE
EM RATOS ADULTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

____ / ____
Prof.ª Dr.ª Maria Martha Bernardi
Universidade Paulista – UNIP

____ / ____
Prof.ª Dr.ª Ivana Barbosa Suffredini
Universidade Paulista – UNIP

____ / ____
Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten
Universidade Paulista - UNIP

____ / ____
Prof.ª Dr.ª Sandra Maria Miraglia Valdeolivas
Universidade Unifesp

____ / ____
Prof. Dr. Renato Fraietta
Universidade Unifesp
DEDICATÓRIAS

A DEUS, acima de todas as coisas.

*Ensina-nos a contar os nossos dias, de tal maneira que
alcancemos corações sábios. Salmo 90:12*

*A meus pais, Floriano Cordeiro e
Lygia Cordeiro (em memória)*

O início de tudo

AGRADECIMENTOS

À Universidade Paulista – UNIP e ao Excelentíssimo Reitor Prof. Dr. João Carlos Di Genio, pela confiança em mim depositada e pela oportunidade ímpar de ingressar no curso de Pós-Graduação e Pesquisa dessa Universidade.

Sinceros agradecimentos.

*A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Maria Martha Bernardi,
Por todo estímulo, dedicação, companheirismo, confiança em mim depositada, espírito de equipe e liderança, alegria contagiatante, disposição inabalável, brilhantismo e paciência, profundos agradecimentos.*

*A minha coorientadora Prof.^a Dr.^a Leoni Villano Bonamin,
Por toda dedicação, disposição, paciência, paz e tranquilidade na transmissão de seus conhecimentos e iluminação de novas ideias e revisão, profundos agradecimentos.*

*Ao Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan,
Na colaboração e dedicação da confecção das amostras de imunohistoquímica, auxílio na análise dos resultados e revisão, profundos agradecimentos.*

À Prof.^a Dr.^a Cideli de P. Coelho, pela participação efetiva nos procedimentos experimentais como veterinária responsável do biotério à

época, pela imensa colaboração na retirada dos encéfalos dos animais com extremado profissionalismo, bem como por sua contagiente alegria e parceria ao longo de nossa convivência no laboratório, profundos agradecimentos e grande estima.

*A meu amigo e colega de longa data, **Prof. Dr. Alexandre Queiróz**, que me estimulou a ingressar no curso de Pós-Graduação e sempre esteve presente, para me auxiliar e apoiar, profundos agradecimentos.*

*A todos os **docentes** e colegas do Programa de Pós-Graduação Ambiental e Experimental da UNIP, pelo conhecimento, sugestões, disciplinas ministradas e companheirismo no dia a dia, ao longo desses anos, sinceros agradecimentos.*

*A todos os **funcionários** do prédio de pesquisa e da Secretaria da Pós-Graduação, pela paciência, dedicação e apoio em todas as situações, bem como pelo extremado profissionalismo, sinceros agradecimentos.*

*Em especial, ao funcionário e querido amigo **Paulo Ailton Vedovato**, técnico em histopatologia e responsável pelo laboratório de Anatomia Patológica e apoio à Pesquisa e Pós-Graduação da UNIP, pela confecção do material histológico, realizada com extremado profissionalismo e zelo, bem como pela dedicação e paciência a mim conferidas durante todo o curso, profundos agradecimentos.*

*Em especial, ao funcionário e querido amigo, **Wilton Pereira dos Santos**, biomédico responsável pelos laboratórios de pesquisa da Pós-Graduação da UNIP, pela participação efetiva em todos os procedimentos experimentais, sempre com extremado profissionalismo e zelo, bem como pela dedicação e paciência a mim conferidas durante todo o curso, profundos agradecimentos.*

*Em especial, ao funcionário **Andson Abidias da Silva**, auxiliar de laboratório, pela dedicação e cuidados na limpeza e bem estar dos animais bem como de todo material utilizado, profundos agradecimentos.*

*Aos meus queridos alunos, **Nathalia de Andrade Galvão e João Iosif Slobodticov**, companheiros do meu dia a dia, cujo auxílio e dedicação ao meu trabalho foram incomensuráveis, profundos agradecimentos.*

À família e amigos, apoio fundamental em todas as horas.

RESUMO

As avermectinas e as milbemicinas, muitas vezes também referidas como lactonas macrocíclicas, são os medicamentos antiparasitários mais vendidos no mundo, dada sua ampla utilização tanto na medicina veterinária e humana, quanto na agricultura. Esse trabalho apresenta inicialmente uma revisão dos principais trabalhos do nosso grupo em vários aspectos da exposição às avermectinas e suas consequências no âmbito reprodutivo, tais como redução no comportamento sexual de ratos sem experiência sexual; redução do reflexo de lordose em fêmeas e ainda, incoordenação motora fina resultando em alteração de comportamento sexual em machos e fêmeas. A seguir, oferece uma revisão sobre os aspectos anatomo-fisiológicos do testículo humano e do rato, enfocando o desenvolvimento pré e pós-natal, bem como sua anatomia e funções. Enfocou-se também o testículo do rato como modelo experimental na validação de estudos de reprodução.

Finalmente, foi apresentado trabalho publicado “Cordeiro F, Gonçalves V Jr, Moreira N, Slobodticov JI, de Andrade Galvão N, de Souza Spinosa H, Bonamin LV, Bondan EF, Ciscato CHP, Barbosa CM, Bernardi MM. Ivermectin acute administration impaired the spermatogenesis and spermiogenesis of adult rats. Res Vet Sci. 2018 Apr;117:178-186. doi:10.1016/j.rvsc.2017.12.013”. Neste foram estudados os efeitos temporais das doses terapêuticas da ivermectina na morfometria e histologia do testículo para verificar se a administração aguda do medicamento prejudicaria a espermatogênese e a espermogênese de ratos adultos e, se esses efeitos seriam reversíveis. Além disto, os níveis de testosterona e a de ivermectina plasmáticos foram avaliados. Os resultados mostraram que a exposição aguda à ivermectina:1) reduziu o volume testicular, o diâmetro tubular e a altura do epitélio germinativo principalmente na dose mais alta; 2) não interferiu na frequência de células de Leydig; 3) na histologia verificou-se que as seções tubulares continham diversas alterações histológicas indicativas de interrupção da espermatogênese, como desorganização do epitélio germinativo, degeneração vacuolar das células germinativas e descamação das células no lúmen tubular; 4) não houve diferenças nos níveis de testosterona; 5) Os níveis plasmáticos da ivermectinas foram reduzidos significativamente às 72 h após a dose de 0,2 mg / kg. Concluiu-se que a ivermectina administrada agudamente prejudicou a espermatogênese e

espermiose de ratos. Provavelmente, esses efeitos não foram consequência da ivermectina nas células de Leydig porque nenhum efeito foi observado nesse nível. Finalmente, nossos resultados sugerem que alguns efeitos testiculares são reversíveis e correlacionados com os níveis plasmáticos de ivermectina.

Estes trabalhos em conjunto, mostram que doses terapêuticas de diferentes avermectinas causam inúmeros danos na esfera reprodutiva dos animais, incluindo prejuízos comportamentais e testiculares, como desorganização celular em diferentes estágios do ciclo do epitélio seminífero e reduções de parâmetros morfométricos testiculares, sugere-se que as avermectinas não sejam empregadas no período da reprodução.

Palavras chaves: Antiparasitários. Avermectinas. Reprodução. Testículo. Comportamento animal.

ABSTRACT

Avermectins and milbemycins, often also referred to as macrocyclic lactones, are the world's best selling antiparasitic medicines and are widely used in veterinary and human medicine and agriculture. In this study, initially it was reviewed the main studies of our group about the different aspects of exposure to avermectins and their consequences in the reproductive scope such as reduction in the sexual behavior of rats without sexual experience; reduction of lordosis reflex in female and reduction of fine motor coordination resulting in changing sexual behavior in males and females. A review of the anatomical and physiological aspects of the human testis and the rats was carried out, focusing on aspects of pre and postnatal development, and the testis anatomy and functions. Finally, it was presented a paper published: Cordeiro F, Gonçalves V Jr, Moreira N, Slobodticov JI, Andrade Galvão N, Souza Spinosa H, Bonamin LV, Bondan EF, Ciscato CHP, Barbosa CM, Bernardi MM. Ivermectin acute administration impaired the spermatogenesis and spermiogenesis of adult rats. *Res Vet Sci.* 2018 Apr; 117: 178-186. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.12.013 ". The results show: 1) IVM acute exposure, mainly in the higher dose, reduced the testicular volume, the tubular diameter and the germinal epithelium height; 2) no interferences on Leydig cells frequency; 3) histological studies show that tubular sections containing several histological changes indicative of spermatogenesis interruption, such as disorganization of germinal epithelium, vacuolar degeneration of the germ cells and sloughing of cells into the tubular lumen; 4) no differences in testosterone levels; 5) The IVM plasmatic levels were significantly reduced at 72 h after the 0.2 mg/kg. It was concluded that acute IVM impaired the spermatogenesis and spermiogenesis of rats. Probably these effects were not consequence of IVM at the Leydig cells because no effects were observed at this level. Finally, our results suggest that some testicular effects are reversible and correlated with the plasmatic levels of IVM. As general conclusion, it was suggested that avermectins are not used in the reproduction period because, even in therapeutic doses, avermectins cause numerous damages in the reproductive sphere of the animals, including behavioral and testicular damages, as cellular disorganization at different stages of the seminiferous epithelium cycle and reduction of testicular morphometric parameters.

Key words: Antiparasitics. Avermectins. Reproduction. Testis. Animal behavior.

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA	10
1.1 Avermectinas	10
1.2 Testículo – Aspectos Anatomofisiológicos	32
1.3 Testículo de rato como modelo experimental.....	41
1.4 Referências bibliográficas	44
2 ARTIGO	47
3 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
ANEXOS	58
ANEXO 1 – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais .	58
ANEXO 2 – Certificado de Revisão Ortográfica e Gramatical	59
ANEXO 3 – Aceite de publicação em capítulo de livro	60

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Avermectinas

Nota: essa revisão é capítulo de livro enviado e aceito para publicação sobre o tema: Carrapaticitas: Toxicologia, Resíduos e alternativas.

Avermectinas e Reprodução: Estudos em Animais de Laboratório

Maria Martha Bernardi, Flora Cordeiro, Thiago Berti Kirsten

**Universidade Paulista, Pós-Graduação em Patologia
Ambiental e Experimental, Área Medicina Veterinária**
maria.bernardi@docente.unip.br

Resumo

Avermectinas e Reprodução: Estudos em Animais de Laboratório

Palestrante: Prof. Dra. Maria Martha Bernardi

Universidade Paulista

As avermectinas e as milbemicinas, muitas vezes também referidas como lactonas macrocíclicas, são os medicamentos antiparasitários mais vendidos no mundo, devido a sua ampla utilização tanto na medicina veterinária e humana, quanto na agricultura. Esse trabalho apresenta os efeitos das avermectinas no espectro reprodutivo. Diversos estudos de nosso grupo têm revelado que as ivermectina, doramectina e moxidectina reduzem o comportamento sexual em ratos machos e fêmeas mesmo quando administradas em doses terapêuticas. Essa redução tem sido atribuída à incoordenação motora e não à motivação sexual. Além dos danos comportamentais, estudamos o sistema reprodutivo, especialmente os testículos. Doses terapêuticas também causaram redução no peso testicular e no volume testicular, bem como aumentaram o número de células na luz dos túbulos seminíferos. Desde que doses terapêuticas de diferentes avermectinas causam inúmeros danos na esfera reprodutiva dos animais, incluindo prejuízos comportamentais e testiculares, sugerimos que as avermectinas não sejam empregadas nos períodos de reprodução.

Palavras chaves: antiparasitários, comportamento sexual, testículos, apoptose.

INTRODUÇÃO

A descoberta das avermectinas foi um evento importante na pesquisa de novas drogas para o tratamento de verminoses, pela sua versatilidade, segurança e efeitos benéficos na saúde animal e humana. Dada essa importância, os doutores Satoshi Omura e William Cecil Campbell, descobridores das avermectinas, foram agraciados com o Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina, em 2015 (Tambo et al., 2015).

Segundo Almeida et al., (2017) as avermectinas e milbemicinas, também denominadas lactonas macrocíclicas, são os medicamentos antiparasitários mais amplamente utilizados, na medicina veterinária, para o tratamento de verminoses gastrointestinais e para o controle de ectoparasitos. Algumas delas também são empregadas, na agricultura, para controle de infecções por pragas. As milbemicinas diferem das avermectinas pela ausência de um grupo dissacarídeo no C-13 do anel lactônico.

Em 1987 a ivermectina foi aprovada para uso humano, no tratamento de oncocercose. No entanto, a eficácia da ivermectina não se restringe ao tratamento da oncocercose, sendo também efetiva para o tratamento de infecções por filarias produzidas pela *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Loa loa*, *Mansonella perstans*, e *Mansonella ozzardi* (Ottesen and Campbell, 1994). Ela também erradica parasitas gastrointestinais, incluindo *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiuria*, e *Ancylostoma duodenale* (Ottesen and Campbell, 1994).

As avermectinas são produtos de fermentação natural de actinomicete *Streptomyces avermitilis*, encontrado nos solos, sendo pouco solúvel em água, mas

facilmente solúvel em solventes orgânicos (Campbell et al., 1984). A fermentação do *Streptomyces avermitilis* gera uma série de compostos similares, classificados com “A” e “B”, dependendo da presença dos grupos metoxi (avermectina A) ou hidróxi (avermectina B) no carbono 5 (C-5). Esses compostos “A” e “B” podem ter uma ligação dupla entre o C-22 e C-23 (A₁ e B₁) ou uma ligação simples e substituinte hidróxi no C-23 (A₂ e B₂). São classificados ainda em “A” e “B”, quando apresentam, no C-25, o grupo butil (A_{1a}, A_{2a}, B_{1a} e B_{2a}) ou isopril (A_{1b}, A_{2b}, B_{1b} e B_{2b}). Das oito avermectinas resultantes do processo de fermentação, quatro, designadas A_{1a}, A_{2b}, B_{1a} e B_{2a}, são obtidas em maiores quantidades. Os componentes “B” não apresentam mais do que 20% da mistura total. A avermectina B₁ é conhecida como abamectina, composta por menos de 80% de avermectina B_{1a} (5-O-dimetil avermectina A_{1a}) e mais de 20% de avermectina B_{1b} (5-O-dimetil-25-di-(1-metilpropil)-25-(2-metiletil) avermectina A_{1a}). Esses dois componentes, B_{1a} e B_{1b} têm propriedades biológicas e toxicológicas similares (Hotson, 1982).

A hidrogenação da avermectina B₁, nas ligações duplas entre C-22 e C-23, produz a 22,23 diidroavermectina B₁, conhecida como ivermectina. A presença de um grupo ciclo-hexílico, na posição C-25 do anel lactônico central, origina a doramectina (Goudie et al., 1993).

Atualmente, encontram-se disponíveis, no comércio, quatro avermectinas:

- Ivermectina: 22,23-dihidroavermectina B_{1a} (>80%) e 22,23-diiforavermectina B_{1b} (<20%);
- Doramectina: 25-ciclohexil-5-O-dimetil-25-de(1-metilpropil) avermectina A_{1a};
- Epionmectina: 4-epi-acetilamino-4-deoxi-avermectina B₁;

-Selamectina:ciclohexil-525-de(1-metilpropil)-5deoxi-22,23-diidro-5 (hidroximino)-avermectina B₁.

A ivermectina apresenta atividade em estágios adultos e imaturos em desenvolvimento de nematódeos gastrointestinais e pulmonares de equinos, ruminantes, suínos e, em alguns casos, de cães (Almeida and Ayres, 2017). Como acaricida, é efetivo contra carrapatos e outros ácaros, embora já se relate o desenvolvimento de resistência (Shoop et al., 1995). Em humanos, tem largo emprego no tratamento da oncocercose e filariose linfática (Kircik et al., 2016).

Mecanismo de ação e efeitos farmacológicos

As avermectinas atuam como agonistas de alta afinidade, na subunidade alfa de canais iônicos seletivos de cloro dos parasitos (Estrada-Mondragon and Lynch, 2015). Em invertebrados, o ligante desses canais iônicos são o glutamato e seus receptores, denominados GluCl (Wolstenholme and Rogers, 2005). Eles se localizam em células musculares somáticas, particularmente, da bomba faríngea e do útero. Sob a ação das avermectinas, o canal de cloro é aberto, aumentando a condução intracelular do neurotransmissor, o que altera a membrana do neurônio, hiperpolarizando-a, e leva à paralisia motora do tipo flácida, resultando na eliminação do parasito. Nos nematódeos, as avermectinas interferem na transmissão dos impulsos nervosos entre células nervosas, enquanto, nos artrópodes, isso ocorre entre células nervosas e musculares (Cully et al., 1994).

Enquanto, em invertebrados, os sítios de ligação das avermectinas localizam-se no tecido periférico, nos mamíferos, ocorrem no sistema nervoso central (Bloomquist, 2003).

Em mamíferos, diversas evidências indicam que as avermectinas interagem com canais de cloro mediados por outros neurotransmissores, como o ácido gama-aminobutírico (GABA) e a glicina. O estudo comparativo entre a avermectina B1a e moduladores de receptores GABAérgicos em membranas neuronais sugeriu que os sítios para avermectina B1a, benzodiazepínicos, pentobarbital e picrotoxina estão acoplados, alostericamente, ao receptor GABAérgico/ canal de cloro e que os sítios ligantes para a avermectina B1a podem ser compartilhados, parcialmente, com os da picrotoxina e barbituratos. Ainda, outras evidências indicam que as avermectinas podem não só interagir diretamente com sítios receptores do GABA, mas também causar aumento na liberação de GABA (Turner and Schaeffer, 1989; Shoop et al., 1995).

Quanto à toxicidade em mamíferos, as avermectinas, em doses recomendadas, apresentam larga margem de segurança, pelo fato de os receptores GABAérgicos serem restritos ao sistema nervoso central, em mamíferos e da baixa penetrabilidade desses medicamentos na barreira hematoencefálica. Além disso, os nervos e músculos de mamíferos não apresentam canais de cloro controlados pelo glutamato (Ritter et al., 2015). Exceções são observadas em certas raças de cães, bezerros e gatos. Nesse sentido, o mecanismo de neurotoxicidade, em cães, está associado às mutações no gene MDR1 (resistência a múltiplas drogas) que resulta em transcrição de uma proteína truncada da glicoproteína –P, a qual não é funcional (Roulet et al., 2003). Essa é uma proteína da membrana celular que atua na absorção e excreção de medicamentos no intestino, fígado rins e barreira hematoencefálica, afetando a distribuição do medicamento no sistema nervoso central (Edwards, 2003). Em bezerros, a abamectina e a moxidectina têm uso restrito, pois já se verificou a ocorrência de depressão e ataxia (Almeida and Ayres, 2017).

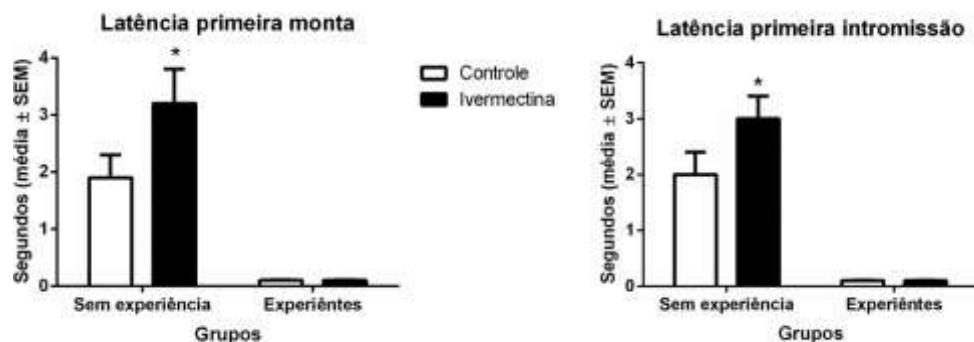
Avermectinas e comportamento em animais de laboratório

Comportamentos modulados pelo sistema GABAérgico são afetados por lactonas macrocíclicas, ivermectina, doramectina e moxidectina. Os estudos realizados por nosso grupo sugerem que a administração de doses terapêuticas de ivermectina apresenta, em modelos animais, efeitos ansiolíticos e sedativos similares ao diazepam (de Souza Spínosa et al., 2002). Da mesma forma, verificou-se que a doramectina apresenta tanto propriedades ansiolíticas como anticonvulsivantes (De Souza Spínosa et al., 2000).

Como o sistema GABAérgico inibe a expressão do comportamento sexual (Bitran and Hull, 1987), diversos estudos foram realizados por nosso grupo investigando os efeitos das avermectinas na esfera sexual.

Nesses trabalhos, observou-se que a administração de doses terapêuticas de ivermectina reduziu o comportamento sexual de ratos sem experiência sexual, mas não de animais sexualmente experientes (Bernardi et al., 2011) (Figura 1).

Figura 1 Latência para primeira monta e primeira intromissão do comportamento sexual de ratos sem experiência sexual e ratos experientes, tratados com 1,0 mg/kg de ivermectina. Dados mostrados como médias e erros-padrão da média. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle. Os demais parâmetros podem ser vistos em: Bernardi MM, Kirsten TB, Spínosa HS, Manzano H (2011) *Ivermectin impairs sexual behavior in sexually naïve, but not sexually experienced male rats*. Res Vet Sci 91:77-81



Resultados similares foram observados com a doramectina, porém a experiência sexual não reduziu a inibição do comportamento sexual (Ferri et al., 2013). Além disso, em fêmeas, a administração de doses terapêuticas de ivermectina reduziu a intensidade de lordose e a execução desse reflexo (Moreira et al., 2014)(Figura 2).

Mais recentemente, Moreira et al. (2017) verificaram que essa redução do comportamento sexual poderia ser consequência da incoordenação motora fina induzida pelo medicamento e não por diminuição da motivação sexual. Nesse sentido, trabalho em andamento, empregando a vocalização ultrassônica como medida da motivação sexual, confirma esses resultados, uma vez que, frente a uma fêmea no estro, ratos vocalizam mais ou estão mais motivados, porém, tem maior latência para primeira monta (Figura 3).

Figura 2. Comportamento sexual de ratas em estro e tratadas com 0,2 e 1,0 mg/kg de ivermectina ou solução de controle (1 ml/kg). (A). Quociente de lordose, (B) intensidade de lordose, (C) Porcentagem de fêmeas que apresentaram lordose exagerada. (D) Porcentagem de fêmeas que apresentaram lordose. Testes de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn ou teste exato de Fisher. n = 8-10 / grupo. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 em comparação com o grupo controle. Moreira N, Bernardi MM, Spinosa HS. Ivermectin reduces sexual behavior in female rats. Neurotoxicol Teratol. 2014;43:33-8. doi:10.1016/j.ntt.2014.03.003.

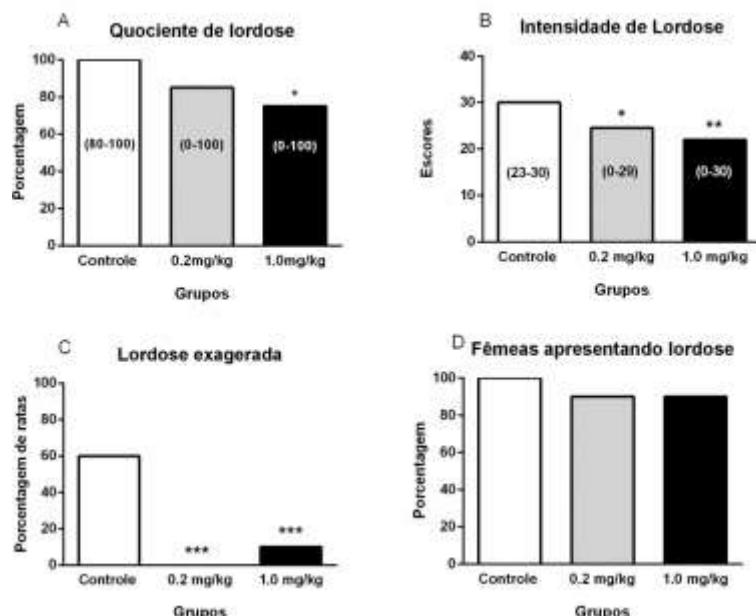
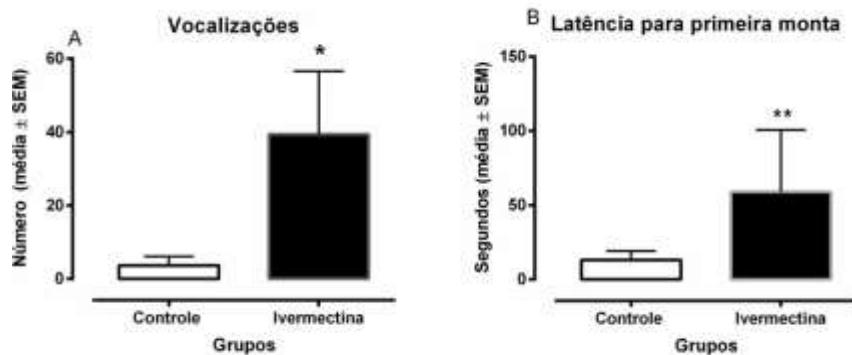


Figura 3. Vocalizações e latência para primeira monta de ratos machos tratados com 1,0 mg/kg de ivermectina, 24 horas antes das observações. Dados mostrados como médias e erros-adrão da média. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle, teste t de Student. Estudos em andamento não publicados.



Portanto, diversos estudos de nosso grupo têm demonstrado que a administração de doses terapêuticas de avermectinas, como ivermectina e doramectina, induzem diversos danos comportamentais, que refletem em prejuízos reprodutivos para machos e fêmeas.

Ivermectina e função testicular

Além de ser encontrado no sistema nervoso central, o GABA ocorre nas gônadas e órgãos reprodutivos acessórios, tendo sido descrito um efeito direto sobre a esteroidogênese, a viabilidade e motilidade do espermatozóide (Erdo et al., 1983). O GABA pode imitar e potenciar a ação da progesterona no início da reação do acrosoma em espermatozóides de mamíferos (He et al., 2001). Ainda, há receptores para GABA dos tipos GABA_A, GABA_B e GABA_C em testículos e espermatozóides de ratos (He et al., 2003; He et al., 2001; Li et al., 2008).

O sistema GABAérgico pode desempenhar papel modulador na espermiogênese, porque a expressão de mRNA da glutamato descarboxilase,

enzima sintética de GABA, foi observada em espermátides precoces e maduras (Kanbara et al., 2005). Além disso, o sistema GABAérgico, localizado nas células de Leydig de testículos de roedores e de humanos, regula a síntese de esteroides por meio de receptores locais de GABA_A (Geigerseder et al., 2004; Hauet et al., 2005).

Dessa forma, no escopo dos efeitos das avermectinas na reprodução, tornou-se importante investigar seus efeitos, focalizando a função testicular. Nesse sentido, os dados da literatura acerca dos efeitos testiculares da ivermectina mostram-se controversos. Moura et al. (2006), avaliando a histomorfometria do parênquima testicular através da produção espermática diária e a eficiência da espermatogênese de ratos tratados com diferentes doses de ivermectina (0,1, 0,4 e 0,6 mg/kg), não mostraram qualquer efeito deletério. No entanto, El-Sawy et al. (2015) mostraram que a administração de 0,56 mg/kg de ivermectina, em ratos, induziu uma série de efeitos colaterais sobre a reprodução: redução de testículos, epidídimos e pesos de órgãos sexuais acessórios; alteração nos caracteres espermáticos; diminuição da contagem de esperma e motilidade; aumento das anormalidades espermáticas. Além disso, na prática clínica veterinária, o esperma de animais recentemente tratados com ivermectina não é considerado de boa qualidade para realizar fertilização.

Cordeiro et al. (2018) investigaram os efeitos da administração aguda de doses terapêuticas de ivermectina na morfometria e histologia do testículo de ratos adultos, com o intuito de verificar se esse tratamento prejudicaria a espermatogênese e a espermiogênese. Outra questão levantada foi se esses efeitos seriam reversíveis. Os níveis de testosterona e de ivermectina também foram avaliados. A possível participação do sistema nervoso central foi investigada por meio da expressão da proteína glial fibrilar (GFAP), um marcador de astrócitos, no

côrrix e hipotálamo. Com relação aos níveis de testosterona, não foram observadas diferenças entre os grupos, sugerindo que esse hormônio não participou das alterações testiculares relatadas abaixo. Também não foram observadas diferenças entre a expressão de GFAP, revelando que os efeitos testiculares da ivermectina parecem ocorrer independentemente da presença de neuroinflamação.

No testículo, os resultados mostraram que a exposição aguda à ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg), principalmente na dose terapêutica mais alta, reduziu o volume testicular, o diâmetro tubular e a altura do epitélio germinativo (Figura 4). Além disso, essas reduções deixaram de ocorrer 72 horas após o tratamento, indicando uma reversão temporal dos efeitos da ivermectina. Concorda com esses dados a observação de que os níveis plasmáticos de ivermectina foram significativamente reduzidos 72 horas após a administração do medicamento (Figura 5).

Figura 4. Peso testicular relativo (g), volume testicular (mm^3), diâmetro tubular (μM) e epitélio tubular (μM) de ratos tratados com 1,0 mg/kg de ivermectina, observados 24, 48 e 72 horas após o tratamento. N=10. ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey's.* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Os resultados dos demais parâmetros podem ser vistos em: Cordeiro F, Gonçalves V, Moreira N, Slobodticov JI, de Andrade Galvão N, de Souza Spinosa H, Bonamin LV, Bondan EF, Ciscato CHP, Barbosa CM, Bernardi MM (2018) Ivermectin acute administration impaired the spermatogenesis and spermogenesis of adult rats. Res Vet Sci 117.

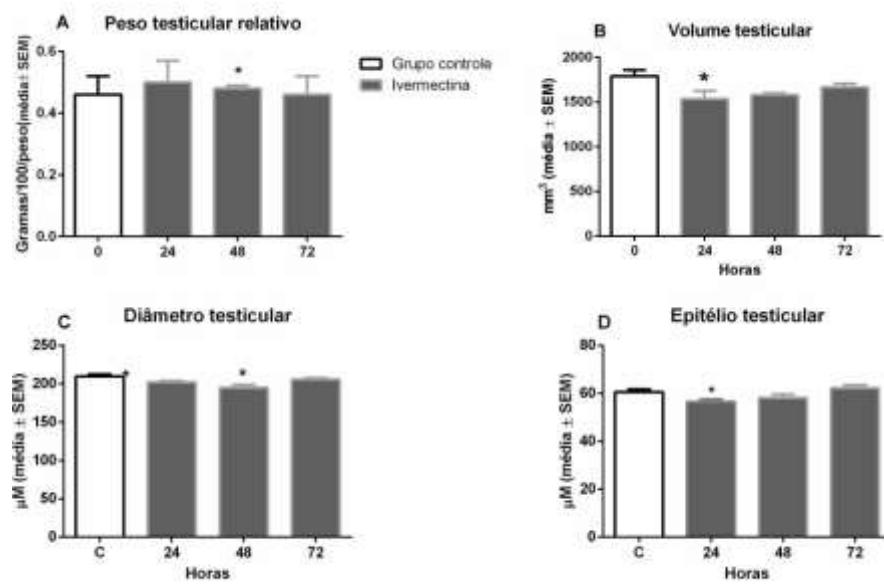
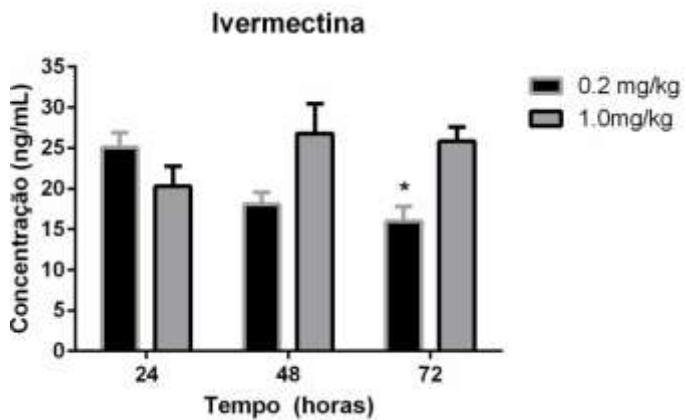


Figura 5. Níveis plasmáticos de ivermectina em ratos tratados com 0,2 ou 1,0 mg/kg e avaliados 24, 48 e 72 horas após os tratamentos. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros-padrão. Cordeiro F, Gonçalves V, Moreira N, Slobodtico JI, de Andrade Galvão N, de Souza Spinosa H, Bonamin LV, Bondan EF, Ciscato CHP, Barbosa CM, Bernardi MM (2018) *Ivermectin acute administration impaired the spermatogenesis and spermigenesis of adult rats*. Res Vet Sci 117.



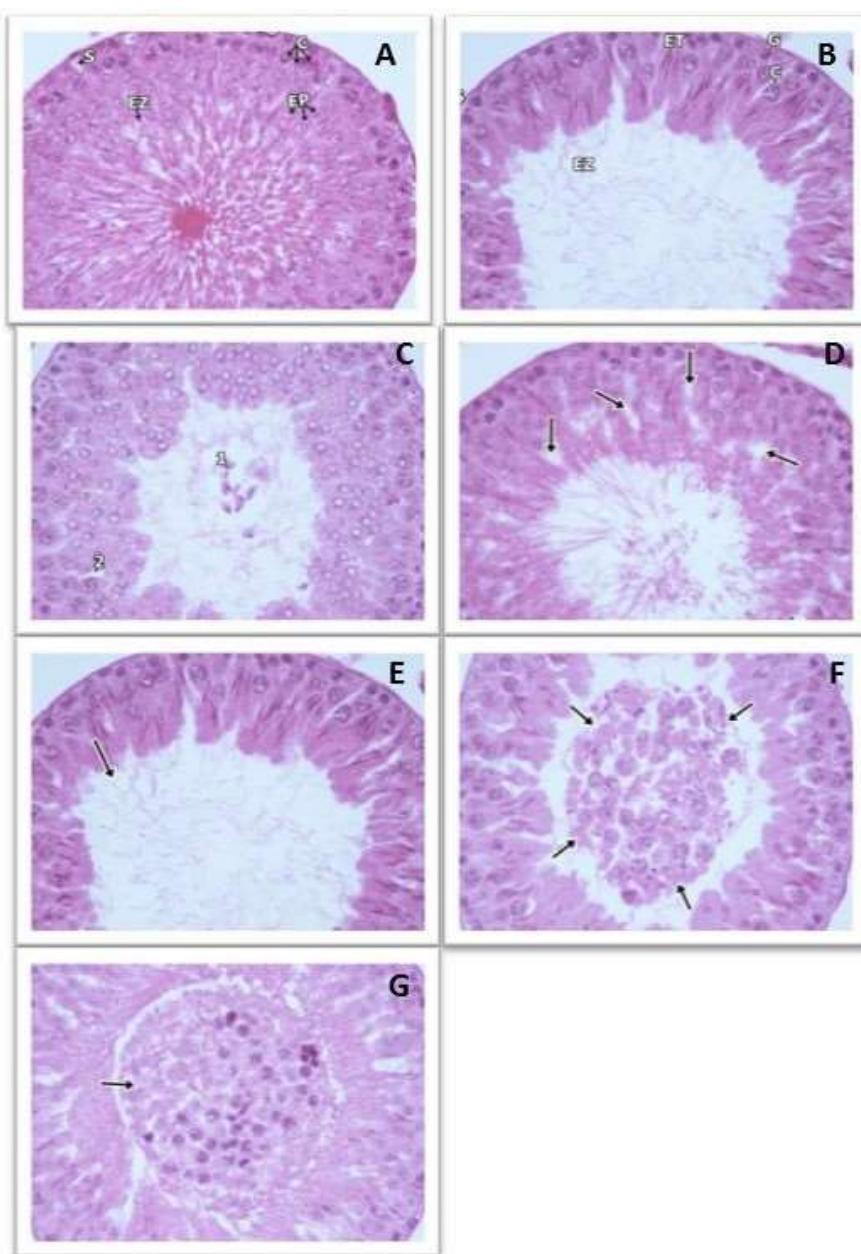
Classicamente, utilizam-se o peso e o volume do testículo como um indicador quantitativo de normalidade, a menos que hajam outras circunstâncias para aumentar o peso do testículo como tumores, edemas ou inflamações (Russel et al., 1990). Além disso, também existe uma forte correlação entre o peso do testículo e o número de células germinativas nele presentes (Hikim et al., 1989). Os dados desse trabalho sugerem uma atrofia do testículo até 48 horas de tratamento, com reversão após 72 horas. Interessante observar que os níveis plasmáticos de ivermectina estão reduzidos nesse último momento.

A análise do diâmetro tubular é um parâmetro importante para determinar se as alterações de volume ocorreram no epitélio germinativo e não no intersticial. A revisão sobre a avaliação da toxicidade testicular (Creasy, 1997) demonstra a importância de quantificar as mudanças testiculares por meio de parâmetros como o diâmetro tubular, para a determinação da perda de células de epitélio germinativo em testículos. Os presentes resultados da análise do diâmetro tubular estão de acordo com a diminuição do peso e do volume testicular. O peso testicular foi reduzido de forma significativa, às 48 horas, na dose de 1,0 mg/kg. O volume

também mostrou diminuição significativa às 24 e 48 horas, nessa mesma dose, com recuperação às 72 horas. Esses efeitos resultaram provavelmente da diminuição do diâmetro tubular em consequência da redução de células germinativas (Hikim et al., 1989).

Quanto à análise histopatológica, os testículos dos animais do grupo controle exibiram características normais (Figura 6-A). Os túbulos seminíferos apresentaram-se organizados em associações celulares bem definidas, representando os 14 estágios do ciclo do epitélio seminífero, bem como secções tubulares contendo de 4 a 6 camadas concêntricas, características de células germinativas da espermatogênese. O apoio das células do epitélio seminífero (células de Sertoli) e as células intersticiais (células de Leydig) exibiram aspecto e localização nucleares compatíveis com o normal. Às 24 horas após 1,0 mg/kg com ivermectina, verificaram-se, em algumas secções tubulares, várias alterações histológicas características de interrupção quantitativa da espermatogênese, tais como desorganização do epitélio germinativo, vacuolização, degeneração das células germinativas e descamação de células para a luz tubular (Figura 6 B-, C, D, E, F e G). As observações, às 48 e 72 horas, foram similares àquelas observadas às 24 horas (Cordeiro et al., 2018).

Figura 6 -. Fotomicrografias de testículo de ratos adultos do grupo controle (A) e tratados 24 horas antes, com 1, 0 mg/kg de ivermectina (B-G), H.E. (X400). A- Secção de túbulo seminífero (estágio II) com morfologia normal. S = célula de Sertoli; G = espermatogônias; C = espermatócitos; EP = espermátides precoces; EZ = espermatozóides. H.E. (X400); B- Secção de túbulo seminífero (estágio XII) mostrando baixa frequência de células da linhagem germinativa e um aumento da luz tubular. S = célula de sertoli; G = espermatogônia; C = espermatócito; ET = espermátides tardias; EZ = espermatozóides.;C- Secção de túbulo seminífero (estágio VIII). Uma descamação está ocorrendo (2) com epitélio altamente desorganizado e células germinativas presentes na luz tubular (1); D- Secção de túbulo seminífero (estágio II) com túbulos seminíferos, apresentando vacuolizações do epitélio germinativo (setas); E- Secção de túbulo seminífero (estágio XII). Aumento da luz tubular (seta); F- Secção de túbulo seminífero (estágio X). Células do epitélio germinativo na luz dos túbulos (setas); G- Secção de túbulo seminífero (estágio II). Células germinativas na luz tubular com núcleos picnóticos (seta).



De acordo com Russel et al. (1990), quatro causas podem levar à diminuição no número de espermatozoides produzidos pelo testículo: 1) interrupções do padrão de divisão de células tronco precursoras, as chamadas “stem cells”; 2) degeneração e fagocitose das células germinativas; 3) destruição ou atraso da espermatogênese e 4) descamação de células germinativas. As células germinativas podem ser liberadas dos contatos com outras células germinativas do mesmo tipo por ruptura de pontes intercelulares. Elas também podem ser liberadas das células de Sertoli por desligamento das junções-celulares que conectam as células germinativas às células de Sertoli, sendo descamadas, individualmente ou em grupo, para o interior da luz tubular (Russell and Peterson, 1985). Esta condição frequentemente ocorre quando a degeneração das células germinativas é maciça, mas também foi vista, quando apenas alterações menores no testículo ocorreram. Encontramos essas alterações histológicas em todos os grupos, às 24, 48 e 72 horas com a dose de 1,0 mg/kg de ivermectina (Cordeiro et al., 2018).

A avaliação histológica levou-nos a concluir que, embora houvesse semelhanças histológicas significativas entre os grupos controle e experimental, os túbulos seminíferos continham grandes quantidades de células anormais presentes na luz tubular. Dessa forma, outras alterações histológicas encontradas no epitélio germinativo nos animais do grupo experimental, tais como desorganização e perdas celulares do epitélio germinativo tubular, levaram-nos a empreender novas análises, para compreender qual mecanismo de ação estaria desencadeando essas alterações.

Du et al.(2013) mostraram que o GABA age como regulador negativo da proliferação celular das células tronco espermatogoniais, para manter a homeostase da espermatogênese testicular. Assim, foi feita a marcação por imunohistoquímica,

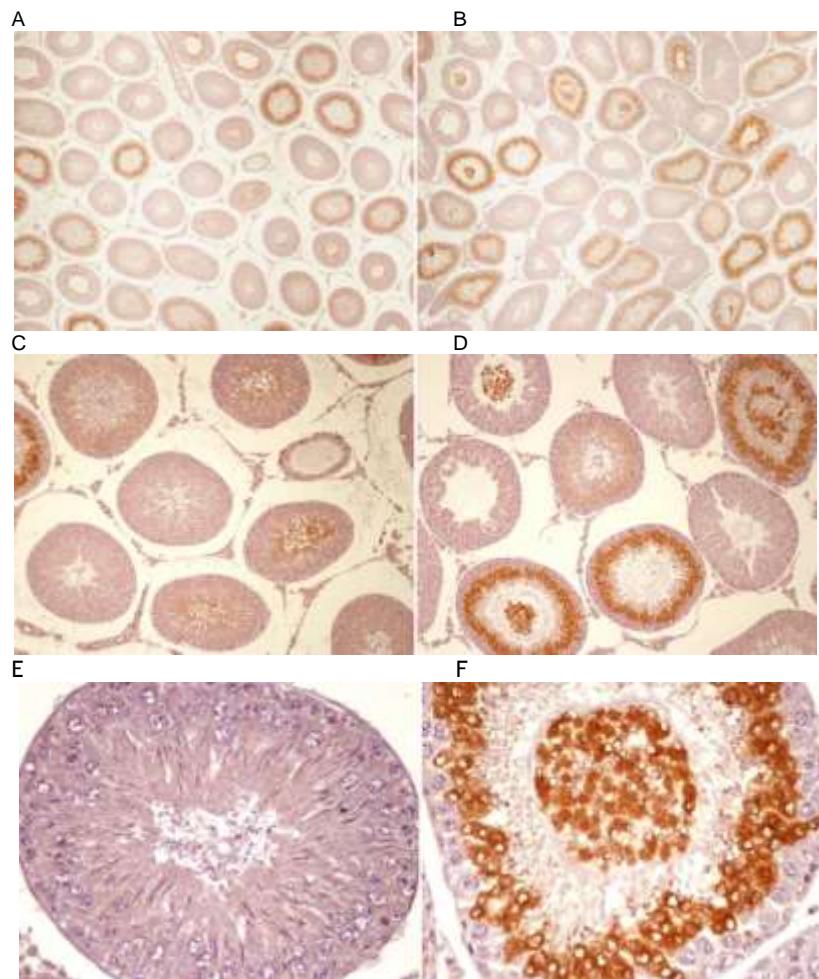
utilizando o kit Caspase-3, para verificar morte celular em testículos de animais tratados com ivermectina 1,0 mg/kg, administrada 24 horas antes da eutanásia de seu grupo controle. Verificou-se a expressão da caspase-3 em túbulos seminíferos dos testículos dos ratos experimentais e controles que ocorrem em resultado de um processo de homeostase normal da espermatogênese, conforme mostra a Figura 7.

Foi observada, em ambos os grupos, a presença de apoptose nas células que se encontravam na luz de vários túbulos seminíferos e, com maior frequência, nos túbulos seminíferos do grupo experimental. Prosseguimos, então, com uma comparação quantitativa do número de túbulos contendo células apoptóticas na luz em ambos os grupos. Foi observado, nos testículos do grupo experimental, a presença de túbulos contendo células redondas em apoptose, na luz tubular, em quantidade显著mente maior, quando comparada com o grupo controle, sugerindo uma extensão do processo apoptótico no grupo experimental.

Em conclusão, a administração de doses terapêuticas de ivermectina prejudicou a espermatogênese e a espermogênese dos ratos, por levar a uma desorganização celular em diferentes estágios dos ciclos do epitélio seminífero, independentemente da inflamação central do sistema neural, uma vez que não foram observadas diferenças na expressão do GFAP no córtex e hipotálamo. Atribui-se, até o momento, que os prejuízos testiculares produzidos pela ivermectina podem ser devidos, pelo menos em parte, ao aumento da apoptose. Esta apoptose pode ter sido causada por maior atividade GABAérgica no testículo induzida pela ivermectina. Os dados da morfometria testicular sugerem que os efeitos da ivermectina são parcialmente reversíveis e correlacionados com os níveis plasmáticos.

Figura 7. Fotomicrografias das secções de túbulos seminíferos de ratos adultos marcados com caspase-3 em marrom. A- túbulos seminíferos do grupo controle marcados 40x; B- túbulos seminíferos tratados com 1,0 mg/kg de ivermectina, 24 horas antes da observação. Note-se uma

maior quantidade de túbulos marcados em relação ao controle e presença de células em apoptose na luz, 40x.C- grupo controle D- tratados com ivermectina, aumento 100x; E- grupo controle F- tratados com ivermectina, aumento 400x.



CONCLUSÃO

Considerando que doses terapêuticas de diferentes avermectinas causam inúmeros danos na esfera reprodutiva dos animais, incluindo prejuízos comportamentais e testiculares, sugerimos que as avermectinas não sejam empregadas nos períodos de reprodução.

Agradecimentos

Apoio pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- processos nº 303701/2014-5 e 441580/2014-9).

REFERÊNCIAS

- Almeida MA., Ayres MCC (2017) Agentes antinematódeos. In: Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária, 6th ed. (Spinosa H, Górnica S, Bernardi M, eds), pp 570–573. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Almeida M, Ayres M, Santarem V, Lambert S (2017) A. Agentes empregados no controle de ectoparasitos. In: Spínola HS, Górnjak SL, Bernardi MM, editors. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p. 567–83. In: Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária, 6th ed. (Spinosa H, Górnjak S, Bernardi M, eds), pp 553–576. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Bernardi MM, Kirsten TB, Spínola HS, Manzano H (2011) Ivermectin impairs sexual behavior in sexually naïve, but not sexually experienced male rats. Res Vet Sci 91:77–81 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20800249> [Accessed October 24, 2011].
- Bitran D, Hull EM (1987) Pharmacological analysis of male rat sexual behavior. Neurosci Biobehav Rev 11:365–389.
- Bloomquist JR (2003) Chloride channels as tools for developing selective insecticides. In: Archives of Insect Biochemistry and Physiology, pp 145–156.
- Campbell WC, Burg RW, Fisher MH, Dybas RA (1984) The discovery of ivermectin

and other avermectins. In: Pesticide synthesis through rational approaches, pp 5–20.

Cordeiro F, Gonçalves V, Moreira N, Slobodticov JI, de Andrade Galvão N, de Souza Spinosa H, Bonamin LV, Bondan EF, Ciscato CHP, Barbosa CM, Bernardi MM (2018) Ivermectin acute administration impaired the spermatogenesis and spermiogenesis of adult rats. *Res Vet Sci* 117.

Creasy DM (1997) Review Article: Evaluation of Testicular Toxicity in Safety Evaluation Studies: The Appropriate Use of Spermatogenic Staging. *Toxicol Pathol* 25:119–131 Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9125770> %5Cn<http://tpx.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/019262339702500201>.

Cully DF, Vassilatis DK, Liu KK, Paress PS, Van der Ploeg LHT, Schaeffer JM, Arena JP (1994) Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 371:707–711 Available at:
<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/371707a0>.

De Souza Spinosa H, Gerenutti M, Martha Bernardi M (2000) Anxiolytic and anticonvulsant properties of doramectin in rats: Behavioral and neurochemistic evaluations. *Comp Biochem Physiol - C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 127:359–366.

de Souza Spinosa H, Stilck SRANRAN, Bernardi MMM (2002) Possible anxiolytic effects of ivermectin in rats. *Vet Res Commun* 26:309–321.

Du Y, Du Z, Zheng H, Wang D, Li S, Yan Y, Li Y (2013) GABA exists as a negative

regulator of cell proliferation in spermatogonial stem cells. *Cell Mol Biol Lett* 18:1–14 Available at: <http://www.degruyter.com/view/j/cmble.2013.18.issue-2/s11658-013-0081-4/s11658-013-0081-4.xml> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23430456>.

Edwards G (2003) Ivermectin: does P-glycoprotein play a role in neurotoxicity? *Filaria J* 2 Suppl 1:S8 Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14975065> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2147658/>

El-Sawy A., El-Maddawy Zk, El-Sawy A. (2015) Adverse Effects of Ivermectin in comparison with Rafoxanide on Male Rats. *Alexandria J Vet Sci* 47:119–128.

Erdo SL, Nemet L, Szporny L (1983) The occurrence of GABA in vas deferens, prostate, epididymis, seminal vesicle and testicle of the rat. *Acta Biol Hung* 34:435–437 Available at: 6237538.

Estrada-Mondragon A, Lynch JW (2015) Functional characterization of ivermectin binding sites in $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABA(A) receptors. *Front Mol Neurosci* 8:55.

Ferri R, Todón E Silva AFS, Cabral D, Moreira N, Spinosa HS, Bernardi MM (2013) Doramectin reduces sexual behavior and penile erection in male rats. *Neurotoxicol Teratol* 39:63–68 Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0892036213001761> [Accessed August 17, 2014].

- Geigerseder C, Doepner RFG, Thalhammer A, Krieger A, Mayerhofer A (2004) Stimulation of TM3 Leydig cell proliferation via GABA(A) receptors: a new role for testicular GABA. *Reprod Biol Endocrinol* 2:13 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC416489/>
- Goudie AC, Evans NA, Gration KA, Bishop BF, Gibson SP, Holdom KS, Kaye B, Wicks SR, Lewis D, Weatherley AJ (1993) Doramectin--a potent novel endectocide. *Vet Parasitol* 49:5–15.
- Hauet T, Yao Z-X, Bose HS, Wall CT, Han Z, Li W, Hales DB, Miller WL, Culty M, Papadopoulos V (2005) Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into leydig cell mitochondria. *Mol Endocrinol* 19:540–554.
- He X, Zhang Y, Yan Y, Li Y, Koide SS (2003) Identification of GABABR2 in rat testis and sperm. *J Reprod Dev* 49:397–402.
- He XB, Hu JH, Wu Q, Yan YC, Koide SS (2001) Identification of GABA(B) receptor in rat testis and sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 283:243–247 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11322795>.
- Hikim APS, Amador AG, Klemcke HG, Bartke A, Russell LD (1989) Correlative morphology and endocrinology of Sertoli cells in hamster testes in active and inactive states of spermatogenesis. *Endocrinology* 125:1829–1843.
- Hotson IK (1982) The avermectins: A new family of antiparasitic agents. *J S Afr Vet Assoc* 53:87–90 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6750121>.

- Kanbara K, Okamoto K, Nomura S, Kaneko T, Shigemoto R, Azuma H, Katsuoka Y, Watanabe M (2005) Cellular localization of GABA and GABAB receptor subunit proteins during spermiogenesis in rat testis. *J Androl* 26:485–493.
- Kircik L, Del Rosso J, Layton A, Schauber J (2016) Over 25 Years of Clinical Experience With Ivermectin: An Overview of Safety for an Increasing Number of Indications. *J Drugs Dermatol* 15:325–332.
- Li S, Zhang Y, Liu H, Yan Y, Li Y (2008) Identification and expression of GABAC receptor in rat testis and spermatozoa. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40:761–767.
- Moreira N, Bernardi MMMM, Spinosa HS (2014) Ivermectin reduces sexual behavior in female rats. *Neurotoxicol Teratol* 43:33–38.
- Moreira N, Sandini TM, Reis-Silva TM, Navas-Suárez P, Auada AVV, Lebrun I, Flório JC, Bernardi MM, Spinosa HS (2017) Ivermectin reduces motor coordination, serum testosterone, and central neurotransmitter levels but does not affect sexual motivation in male rats. *Reprod Toxicol* 74.
- Moura C, Guerra M, Silva JúSilva C, Caju F, Alves L (2006) Avaliação histomorfométrica do parênquima testicular de ratos adultos tratados com diferentes doses de ivermectina. *Arq Bras Med Vet e Zootec* 58:799–808.
- Ottesen EA, Campbell W (1994) Ivermectin in human medicine. *J Antimicrob Chemother* 34:195–203.
- Ritter J, Flower R, Henderson G (2015) O Sistema Nervoso. In: Rang & Dale Farmacologia, 8th ed. (Rang J, Dale M, eds), pp 462–469. Elsevier Inc.

- Roulet A, Puel O, Gesta S, Lepage JF, Drag M, Soll M, Alvinerie M, Pineau T (2003) MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *Eur J Pharmacol* 460:85–91.
- Russel L, Ettlin R, Hikin A, Clegg E (1990) Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. *Int J Androl* 16.
- Russell LD, Peterson RN (1985) Sertoli Cell Junctions: Morphological and Functional Correlates. *Int Rev Cytol* 94:177–211 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074769608603976>.
- Shoop WL, Mrozik H, Fisher MH (1995) Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Vet Parasitol* 59:139–156.
- Tambo E, Khater EIM, Chen JH, Bergquist R, Zhou XN (2015) Nobel prize for the artemisinin and ivermectin discoveries: A great boost towards elimination of the global infectious diseases of poverty. *Infect Dis Poverty* 4.
- Turner MJ, Schaeffer JM (1989) Mode of Action of Ivermectin. In: Ivermectin and Abamectin, pp 73–88 Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4612-3626-9_5.
- Wolstenholme AJ, Rogers AT (2005) Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology* 131.

1.2 Testículo – Aspectos Anatomofisiológicos

Desenvolvimento Testicular Pré-Natal - Em humanos

No homem, os primeiros indícios do desenvolvimento das gônadas ocorrem no início da quarta semana, quando são visíveis, entre as células endodérmicas do saco vitelino, células esféricas e volumosas, que constituem as células sexuais primitivas, também denominadas germinativas primordiais. Elas migram a partir da parede do saco vitelino e ao longo da parede do intestino posterior, por meio do mesentério dorsal, alcançando os esboços das futuras gônadas, conhecidos como cristas genitais. No embrião humano, aproximadamente 1000 a 2000 células germinativas primordiais alcançam os esboços gonádicos e a migração cessa assim que elas alcançam esse alvo (Moore & Persaud, 2008).

As cristas genitais mostram-se bem evidentes durante a metade da quinta semana, quando as células germinativas primordiais invadem as cristas genitais. No início da sexta semana, um conjunto de cordões sexuais primitivos inicia o crescimento para o interior da crista genital e as células germinativas primordiais migram para o interior desses cordões (Larsen, 1997).

Inicialmente, as cristas genitais são indiferenciadas, ou seja, não apresentam dimorfismo sexual. O desenvolvimento do fenótipo masculino exige um cromosomo Y, mas somente o braço curto deste cromosomo é crítico para a determinação sexual. O gene para o fator testículo-determinante (*testis-determining factor*, TDF) localiza-se na região denominada “sexo-determinante” do cromosomo Y, conhecida como região SRY (Berta, 1990).

É esse fator TDF, regulado pelo cromosomo Y, que estabelece e dirige a diferenciação testicular durante a 7^a semana. A ausência ou o defeito da região SRY leva a gônada, inicialmente indiferenciada, a constituir um ovário. O cromosomo Y tem, portanto, forte efeito masculinizante e, mais precisamente, testículo determinante, que atua sobre a medula da gônada indiferenciada (Larsen, 1997, Moore & Persaud, 2008).

Os cordões seminíferos transformam-se em túbulos retos, rede testicular e túbulos seminíferos. Na fase tardia fetal, os testículos humanos passam a apresentar o epitélio seminífero composto por dois tipos celulares: as células de sustentação, ou de Sertoli, presentes em maior número e derivadas do epitélio

celomático, e as espermatogônias, oriundas das células germinativas primordiais (Larsen, 1997, Moore & Persaud, 2008).

Ainda com referência ao testículo humano, os túbulos seminíferos estão separados, entre si, pelo tecido mesenquimático, que originará as células intersticiais (Leydig). Nos primeiros dois meses de desenvolvimento, não são observados, no testículo embrionário, células de Leydig diferenciadas. Elas surgem durante a oitava semana e logo começam a sintetizar hormônios androgênicos (testosterona e androstenediona), que induzem a diferenciação da genitália externa, bem como do ducto deferente, epidídimos e vesícula seminal, oriundos dos ductos mesonéfricos. Além da testosterona, os testículos fetais produzem o fator inibidor Mulleriano (MIF), sintetizado pelas células de Sertoli embrionárias, agindo como supressor no desenvolvimento dos ductos paramesonéfricos (Mullerianos), precursores das vias genitais femininas. Após as semanas 17 e 18, as células de Leydig involuem gradativamente, reaparecendo na puberdade, quando, então, estimulam o processo de espermatogênese. (Carlson, 1999; Moore&Persaud,2008)

Com 26 semanas, os testículos já desceram retroperitonealmente (externamente ao peritônio) da parede abdominal posterior para os anéis inguinais profundos. A descida dos testículos pelos canais inguinais até o escroto leva 2 ou 3 dias. Após os testículos entrarem no escroto, o canal inguinal se contrai ao redor do cordão espermático (Moore&Persaud,2008).

Desenvolvimento Testicular Pré-Natal - Em ratos

No rato, os estágios iniciais da formação das gônadas, segundo Merchant-Larios (1975), iniciam no 11º dia de vida pré-natal, período no qual se pode localizar as células germinativas primordiais em diferentes locais do corpo do embrião, tais como a parede do intestino posterior, o mesênquima e ocasionalmente o epitélio celomático. No 14º dia, a associação entre essas estruturas formam duas massas compactas que se projetam levemente de cada lado no celoma, medialmente aos mesonefros, denominadas cristas genitais ou gonádicas. Finalmente, a gônada sexual passa a ser reconhecida em embriões de 15 dias de idade.

As células de Leydig iniciam seu desenvolvimento no período fetal tardio. A citodiferenciação das células mesenquimais indiferenciadas ocorre, rapidamente, durante os dias 15, 16 e 17 do período embrionário. Já a esteroidogênese, nessas

células, inicia-se tão logo tenham se diferenciado morfologicamente (Huhtaniemi & Pelliniemi, 1992).

Ainda no rato, por volta do vigésimo dia de gestação, a maior parte do volume dos cordões seminíferos (futuros túbulos seminíferos) é preenchida por células germinativas. As células de Sertoli são comprimidas em direção à periferia, apresentando finas projeções citoplasmáticas, que separam grupos de células germinativas (Merchant-Larios, 1975).

Desenvolvimento Testicular Pós-Natal - Em humanos

Na maioria dos mamíferos, os testículos migram do seu local de origem. Mais de 97% de meninos recém-nascidos a termo possuem ambos os testículos no escroto. A descida do testículo ocorre em duas fases distintas, denominadas transabdominal e inguinoescrotal, guiadas pelo gubernáculo, que liga os testículos fetais ao escroto (Moore&Persaud, 2008; Dzik A, 2012).

A fase inguinoescrotal é andrógeno-dependente e mediada pela liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Ao nascimento, os testículos movem-se para seu local extra-abdominal e são cobertos pelo processo vaginal do peritônio. Todo processo de descida ocorre entre o sexto mês de vida intrauterina e as seis primeiras semanas após o nascimento (Dzik A, 2012).

O peso testicular aumenta muitas vezes na puberdade e diminui ligeiramente com a idade. O volume médio testicular é de 20 centímetros cúbicos nos homens jovens. O comprimento longitudinal do testículo é de aproximadamente 4,5 cm a 5,1 cm e o peso médio do testículo humano é de 15 a 19 gramas (Dzik A, 2012).

Desenvolvimento Testicular Pós-Natal - Em ratos

Um estudo da histomorfometria de testículos de ratos, em várias idades, (Miraglia, 1990) demonstra que, em testículos de ratos jovens, com 45 dias de idade, estão presentes todos os 14 estágios do ciclo do epitélio seminífero. Além disso, aumentos graduais dos níveis de testosterona plasmática e intratubular ocorrem em torno do 41º dia e alcançam seu máximo por volta do 60º dia. Entretanto, o estabelecimento da fertilidade ocorre em torno de 63 dias, momento em que os espermatozoides alcançam as vias genitais. O aspecto do epitélio seminífero de

ratos com 60 e 90 dias mostrou-se bastante semelhante, incluindo todas as células da linhagem germinativa; espermatogônias A e B, espermatócitos nas várias fases da prófase I da meiose, espermatócitos secundários e espermátides nas fases 1 a 19 da espermiogênese (Miraglia, 1990).

A maturidade gonádica, em ratos, em termos qualitativos, é alcançada aos 60 dias, quando o processo de espermatogênese se completa, embora a gônada continue crescendo até os 108 dias de idade (Ekwall, H. 1984).

Nos ratos jovens, com 60 dias de idade, o volume médio testicular é de 930 milímetros cúbicos, o comprimento longitudinal do testículo é de aproximadamente 18 milímetros e o peso médio do testículo é de 1,4 gramas. (Miraglia, 1990)

Anatomia Testicular em humanos

Os testículos são órgãos pares, ovóides, que se encontram dentro do escroto. Em todos os mamíferos apresentam-se como órgãos encapsulados, constituídos de túbulos seminíferos, separados por tecido intersticial. O testículo é revestido por uma cápsula fibrosa branca, denominada túnica albugínea constituída de fibroblastos, feixes de colágeno e células de músculo liso. A túnica albugínea emite septos de tecido conjuntivo que dividem o testículo em cerca de 250 a 300 lóbulos em forma de cunha. Cada um desses lóbulos contém de um a três túbulos seminíferos. Os túbulos seminíferos totalizam cerca de dois terços do volume testicular, têm um lúmen estreito revestido por um espesso epitélio germinativo. Esse epitélio consiste em várias camadas de células germinativas e células de Sertoli, que as protegem e promovem seu desenvolvimento. Entre os túbulos seminíferos, encontra-se o tecido conjuntivo de suporte que contém células de Leydig (intersticiais), responsáveis pela produção de testosterona. O tecido intersticial completa os espaços entre os túbulos seminíferos e contém todos os vasos linfáticos e sanguíneos, bem como os nervos do parênquima testicular (Saladin KS, 2003; Longo DL, 2013) Figuras 01 e 02.

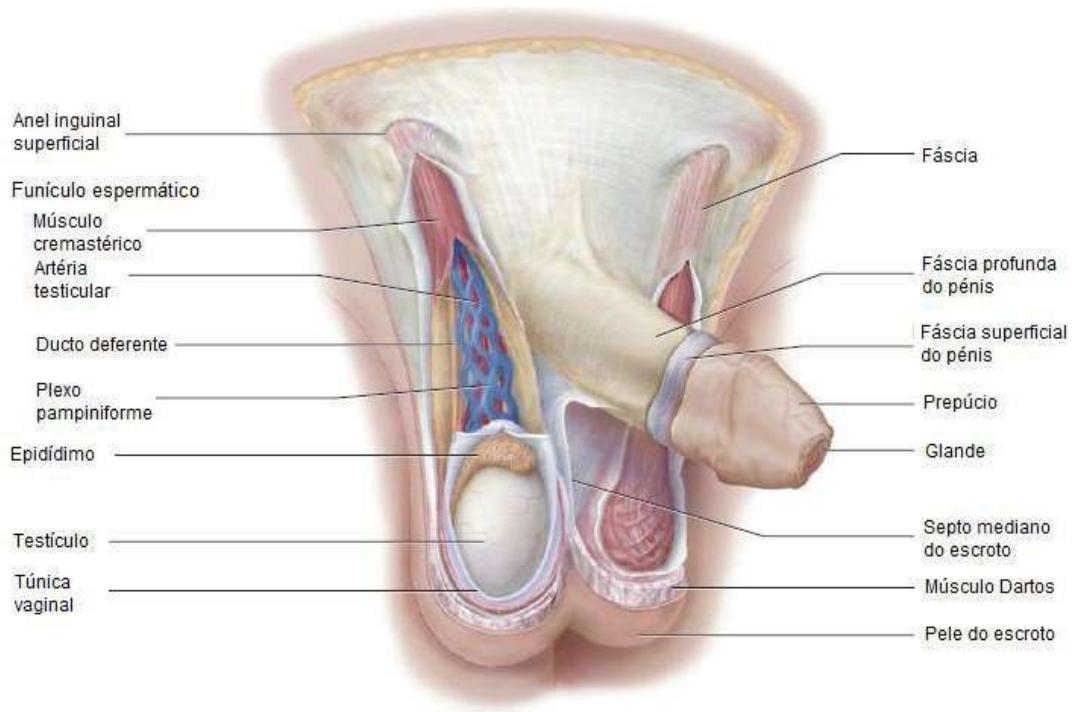


Figura 01 – Anatomia Testicular – Fonte: Saladin KS. Anatomy and Physiology (2003). The Unit of Form and Function. 3rd edition, McGraw-Hill, New York. pp. 1120.

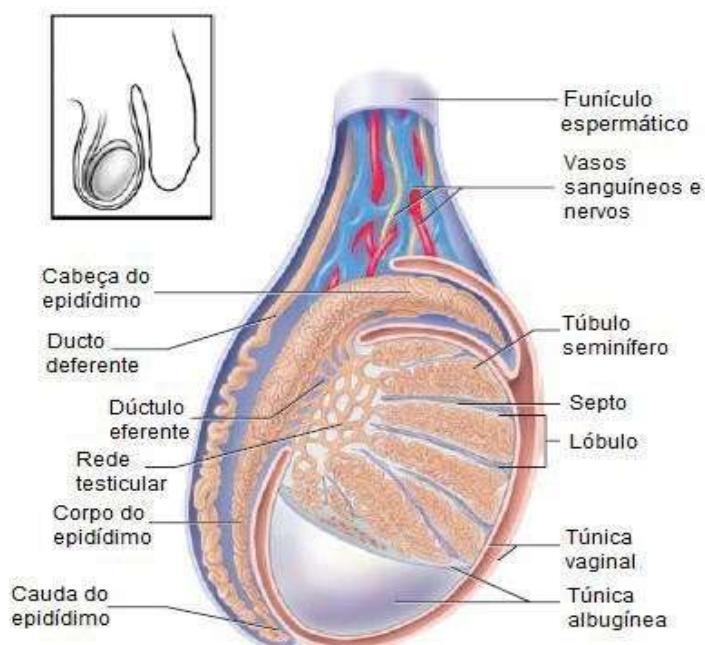


Figura 02 – Testículo e estruturas associadas. Fonte: Saladin KS. Anatomy and Physiology (2003). The Unit of Form and Function. 3rd edition, McGraw-Hill, New York. 1120 pp.

Os túbulos seminíferos são longos e em formato de “V”. Suas duas extremidades drenam, para a região central superior e posterior do testículo, a *rete testis* que, por sua vez, funde-se à parte superior do testículo, para formar os ductos eferentes. Esses ductos deixam o testículo e estendem-se até a região da cabeça do epidídimos, fornecendo um ducto de conexão para o transporte dos espermatozoides até o epidídimos. O epidídimos é um ducto único, altamente contorcido, que se estende do polo anterior ao polo posterior do testículo. Em sua porção final menos convoluta, o ducto do epidídimos, torna-se ducto deferente. Possui parede muscular espessa cujas contrações auxiliam o transporte dos espermatozoides (Tortora GJ, 2017).

Imediatamente antes de atingir a próstata, os canais deferentes alargam-se. Essa região é denominada ampola do deferente. Em seguida, unem-se ao duto emergente da vesícula seminal, formando o ducto ejaculador, que penetra a próstata (Dzik A, 2012)

Os testículos recebem suprimento sanguíneo das artérias testiculares, cremastéricas (espermáticas externas) e deferenciais (ramos das artérias ilíacas). A artéria testicular é o suprimento primário e surge a partir da aorta abdominal. As veias emergentes do testículo formam uma densa rede de ramos intercomunicantes, conhecida por plexo pampiniforme, que se estende do escroto para o cordão espermático. O sangue venoso (33°C) resfria o sangue arterial vindo do abdome, à temperatura de 37°C , pelo mecanismo de troca de calor em contracorrente (Dzik A, 2012).

Espermatogênese e Produção de gametas

A função primária do testículo é a formação dos espermatozoides. Esse processo contínuo tem início na puberdade até o fim da vida do homem. Durante a embriogênese, as células germinativas primordiais migram para as gônadas em desenvolvimento. Essas células se encontram no interior dos túbulos seminíferos. As espermatogônias se desenvolvem a partir das células germinativas primordiais, por meio de divisão mitótica. Essas células se localizam próximas à membrana basal e estão intimamente em contato com as células de Sertoli. As células de Sertoli formam uma camada contínua na membrana basal do túbulo seminífero, estando

firmemente aderidas umas às outras pelas junções oclusivas conhecidas por *tight-junctions*. Tal configuração é responsável por criar uma barreira entre a corrente sanguínea e os espermatozoides, formando, assim, a barreira imunológica hematotesticular (Moore & Persaud, 2008).

Diferenciação funcional

As espermatogônias permanecem inativas até a puberdade, quando passam a se dividir continuamente, por mitose, aumentando em número e fornecendo o suprimento para a linhagem celular subsequente. Parte das espermatogônias diferencia-se em espermatócitos de primeira ordem ou primários. Cada espermatócio primário sofre uma divisão reducional (primeira divisão meiótica), resultando em duas células haploides denominadas espermatócitos secundários, que, por sua vez, entram em segunda divisão meiótica originando quatro espermátides haploides (Russel,E 1990; Moore & Persaud, 2008; Dzik A, 2012).

Diferenciação estrutural

Também denominada Espermogênese, processo no qual as espermátides sofrem diferenciação morfológica, dá origem aos espermatozoides maduros, que serão impulsionados ao epidídimos. O espermatozoide possui grande quantidade de mitocôndrias, localizadas na peça intermediária, que fornecem energia na forma de ATP, para a movimentação da cauda. O segmento cefálico (ou cabeça) contém um núcleo haploide, o DNA inativo e condensado. A porção anterior da cabeça é ocupada pelo acrosomo, que contém enzimas, principalmente, a acrosina e a hialuronidase. A liberação dessas enzimas, denominada reação do acrosomo, ocorre quando o espermatozoide aproxima-se do ovócito e promove a lise de suas camadas externas (*cumulus oophorus* e zona pelúcida) permitindo sua passagem ao interior do gameta feminino. A cauda do espermatozoide é um longo flagelo formado por microtúbulos que permitem sua movimentação (Russel,E 1990; Moore & Persaud, 2008; Dzik A, 2012).

Produção dos Hormônios Sexuais

Desenvolvimento pré-natal

Antes do nascimento, a testosterona estimula o padrão de desenvolvimento masculino dos ductos do sistema genital e a descida dos testículos. A dihidrotestosterona (DHT), em contrapartida, estimula o desenvolvimento dos órgãos genitais externos. A testosterona também é convertida, no encéfalo, em estrogênios, os quais podem desempenhar, nos homens, um papel no desenvolvimento de determinadas regiões do encéfalo (Tortora GJ, 2017).

Controle hormonal dos testículos

Na puberdade, a testosterona e a DHT promovem o desenvolvimento das características sexuais secundárias masculinas. No início da puberdade, células neurosecretoras, no hipotálamo, aumentam a secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Esse, por sua vez, estimula a adeno-hipófise a aumentar sua secreção de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH). O LH estimula as células intersticiais, localizadas entre os túbulos seminíferos, a secretar o hormônio testosterona. Sintetizado nos testículos a partir do colesterol, esse hormônio esteroide é o andrógeno principal. A testosterona atua via retroalimentação negativa, para suprimir a secreção de LH pela adeno-hipófise e a secreção de GnRH pelas células neurosecretoras hipotalâmicas. O FSH e a testosterona atuam em conjunto, para estimular a gametogênese. Uma vez alcançado o grau de espermatogênese necessário para as funções reprodutivas masculinas, as células de sustentação (Sertoli) liberam inibina, hormônio que inibe a secreção de FSH pela adeno-hipófise. A inibina, desse modo, inibe a secreção de hormônios necessários à espermatogênese (Tortora GJ, 2017) (Figura 03).

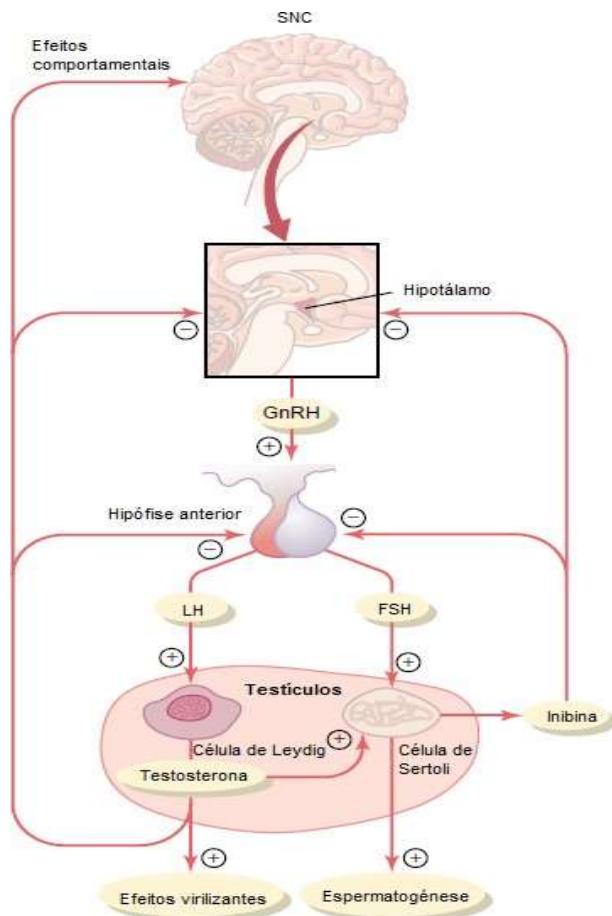


Figura 03- Eixo Hipotálamo Hipofisário Gonadal. Fonte: Guyton AC, Hall JE. (2006). Tratado de Fisiologia Médica. 11^a edição. Rio de Janeiro: Elsevier Editora; pp 1115.

Função Hipotalâmica

Segundo Dzik A. (2011) o hipotálamo, parte do diencéfalo, forma o assoalho e parte das paredes laterais do terceiro ventrículo. Limita-se, anteriormente, pelo quiasma óptico e internamente, pelo terceiro ventrículo, em cima, pelo sulco hipotalâmico e externamente, pelo subtálamo. Estruturalmente, é organizado nas regiões anterior, tuberal e posterior, sendo cada uma delas compostas das áreas medial e lateral. As células neurais peptidérgicas hipotalâmicas, altamente especializadas, possuem características tanto de neurônios quanto de células endócrinas e sintetizam e secretam peptídeos neuro-hormonais. Algumas dessas substâncias carreadas para a hipófise pelo sistema porta-hipofisário são, a vasopressina e ocitocina; outras são fatores liberadores. Em contato com as células adeno-hipofisárias, induzem à produção de trofinas.

Receptores para os aminoácidos aspartato e ácidos gama-aminobutírico A e B (GABA) também são expressos nesse conjunto neuronal. O sistema neural adrenérgico do tronco cerebral projeta-se diretamente aos neurônios GnRH e GABA. Há evidências de que os sistemas neuronais mais complexos do tronco cerebral, via neurotransmissores noradrenalina, dopamina, B-endorfina e GABA influenciam a secreção do GnRH. A ação desses neurotransmissores pode ser tanto de inibição quanto de estimulação (Dzik A, 2011)

As ações dos esteroides sexuais nos neurônios-GnRH são intermediadas principalmente pelos neurônios GABA. Assim, a maioria dos impulsos originados fora da área pré-óptica sobre os neurônios GnRH é canalizada por meio desses neurônios. A maioria dos neurônios GABA da área pré-óptica expressam receptores para os esteroides sexuais e sofrem estímulos desses hormônios, explicando, parcialmente, o efeito de retrocontrole negativo desses esteroides sobre a secreção de GnRH (Dzik A, 2011).

1.3 Testículo de rato como modelo experimental

Leblond e Clermont publicaram um esquema, para definir o ciclo da espermatogênese em ratos, camundongos e *guinea-pig* (Leblond CP, 1952a), que foi amplamente aceito e permanece muito popular até a presente data.

Em outro trabalho (1952b) estimularam o uso de esquemas de estágios, para descrever o desenvolvimento da espermatogênese em ratos pré-púberes e púberes.

Esses esquemas são reconhecidos como importante ferramenta não somente entre os morfologistas, mas também entre cientistas de disciplinas como bioquímica e biologia molecular assim como toxicologia e patologia experimental.

Uma detalhada descrição de secções testiculares coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) permite uma classificação do processo de espermatogênese em 14 estágios, com base nas mudanças do acrosomo e das alterações morfológicas das espermátides. Um estágio ou uma associação celular define-se como um grupo de células germinativas, em fases particulares do desenvolvimento, em uma secção de um túbulo seminífero (Leblond CP, 1952a Russel LD, 1990).

Cada tipo de associação celular está morfologicamente integrada às outras em seus processos de desenvolvimento. Desse modo, uma associação celular ou

estágio em particular apresenta uma constante composição celular. Cada associação celular é designada, por convenção, por numeração romana. Em ratos, existem 14 designações de associações celulares ou estágios da espermatogênese (Russel LD, 1990) (Figura 04).

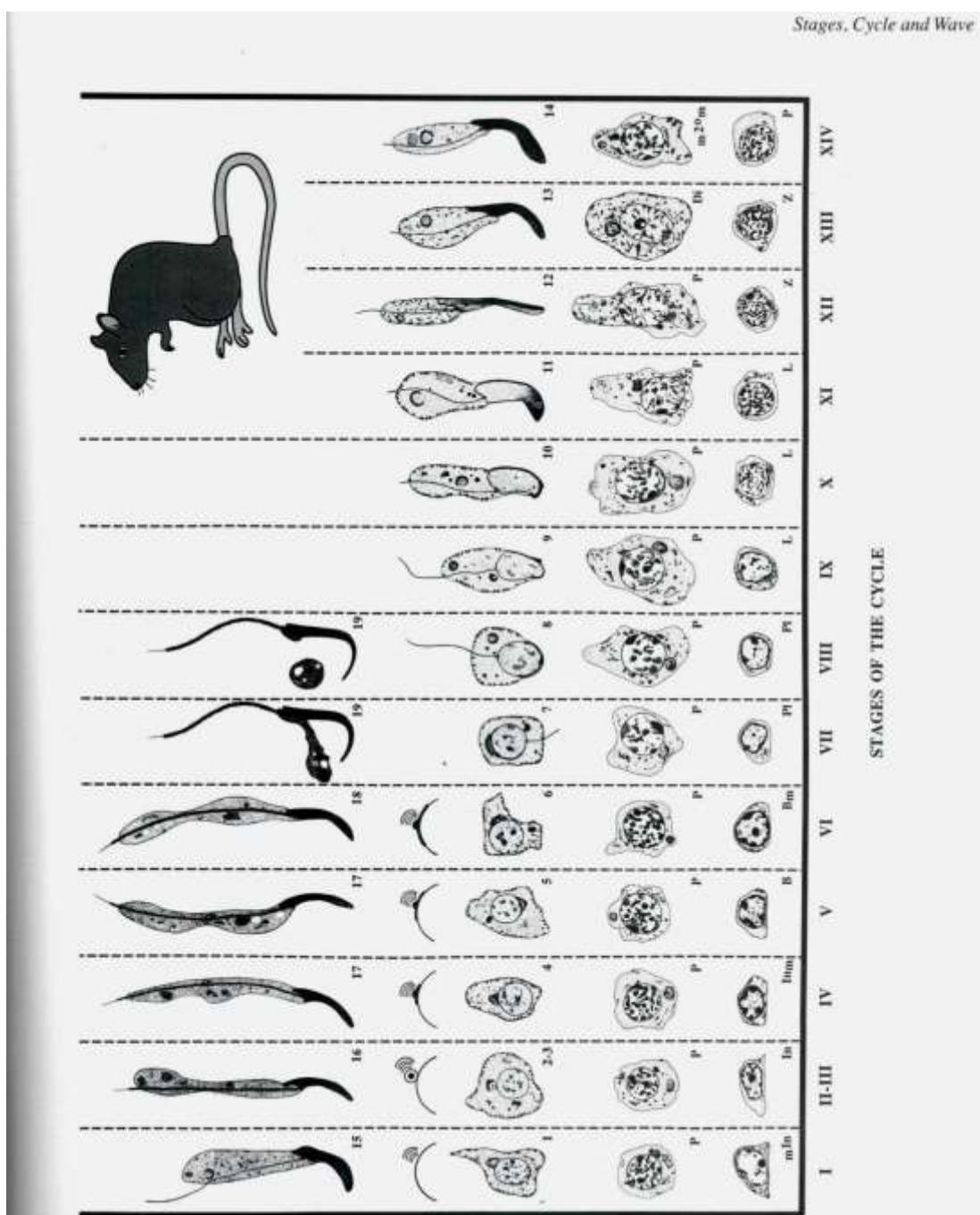


Figura 04- Estágios da espermatogênese em rato (I- XIV). Fonte: Russel LD, Etlin RA, Hikim APS, Clegg ED (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Cache river Press, St. Louis, MO; pp. 43.

A espermiogênese também é dividida e classificada com critérios morfológicos bem definidos com base na forma do acrosomo e das espermátides (Russel LD, 1990) (Figura 05).

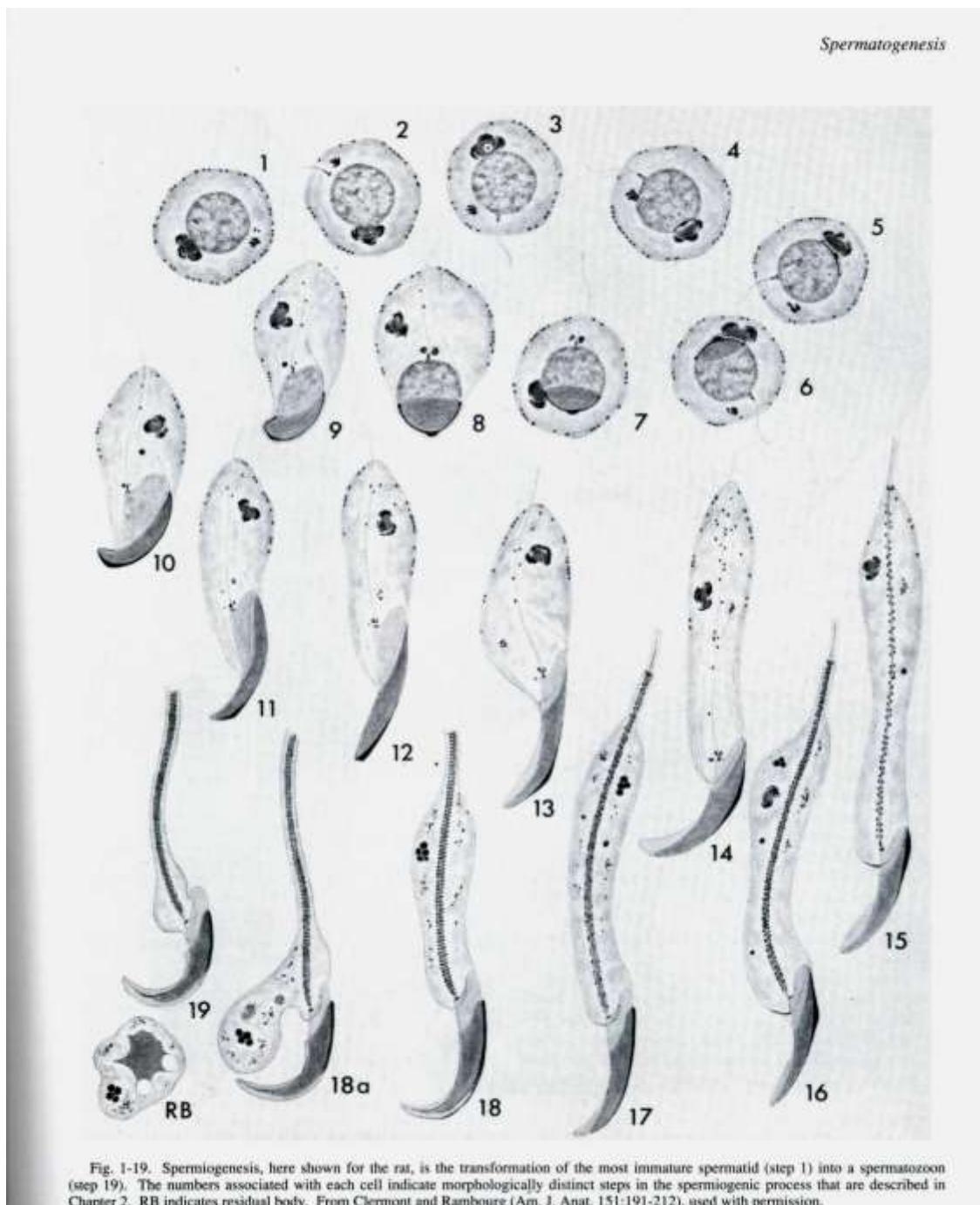


Fig. 1-19. Spermatogenesis, here shown for the rat, is the transformation of the most immature spermatid (step 1) into a spermatozoon (step 19). The numbers associated with each cell indicate morphologically distinct steps in the spermatogenic process that are described in Chapter 2. RB indicates residual body. From Clermont and Rambourg (Am. J. Anat. 151:191-212), used with permission.

Figura 05- Etapas da Espermiogênese em rato (1–19). Fonte: Russel LD, Etlin RA, Hikim APS, Clegg ED (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Cache river Press, St. Louis, MO; pp 21 com permissão de Clermont e Rambourg (Am.J.Anat. 151:191-212).

Duração de um ciclo

As etapas da espermiogênese são definidas em numerais arábicos. No rato, perfazem um total de 19 etapas. Finalmente, uma série completa de mudanças nas associações celulares (estágios), arranjadas em uma sequência lógica do progresso do desenvolvimento, é chamada de ciclo do epitélio germinativo ou, simplesmente, ciclo. Cada espécie apresenta determinada duração de ciclo (Russel, L.D., 1990).

A duração do ciclo, em dias, para as várias espécies são: 8,6 para o javali; 8,7 para o hamster; 8,9 para o camundongo; 10,4 para a rã; 13,5 para o touro; 13,6 para o cão da raça *beagle*; 9,5 para o macaco *rhesus*; 12,2 para o cavalo; 12,9 para o rato e 16 para os humanos (Divya V, 2014).

Duração da espermatogênese

Costuma-se dizer que são necessários entre 4 a 4,5 ciclos, para completar o processo de espermatogênese desde uma espermatogônia até um espermatozoide maduro. A duração da espermatogênese de qualquer espécie só pode ser aproximada devido à dificuldade de determinar o ponto em que ocorreu. Isso corresponde a 4 ou 5 gerações de células germinativas encontradas em cada estágio do ciclo espermatogênico. Portanto, calcula-se a duração da espermatogênese, multiplicando-se a duração do ciclo de cada espécie por 4,5 ciclos. Desse modo, tem-se a duração aproximada de 74 dias, em humanos ($16 \times 4,5$); 61 dias, em touros e cães ($13 \times 4,5$); 60 dias, em ratos ($13 \times 4,5$); 57 dias, em garanhões; 47 dias, em rãs; 39 dias, em javalis. Assim, esse processo dinâmico, com eventos celulares e moleculares muito bem organizados, resulta na liberação de grandes números de espermatozoides com capacidade para continuar a vida. (Divya V, 2014; Russel, 1990).

1.4 Referências bibliográficas

Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. Nature 348:448.

Carlson, BM (1999). Human embryology and developmental biology. 2^a edição. St. Louis, Mosby, 447.

Divya V, Kumar VG, Nandi S and Ramchandra SG (2014). Dynamics of Spermatogenesis. Annual Research & Review in Biology 4(1): 38-50.

Dzik A, Donadio NF, Esteves SC, Nagy ZP (2012). Atlas de Reprodução Humana. Vol 2, São Paulo, Ed. Segmento Farma.

Dzik A, Pereira DHM, Cavagna M, do Amaral WN (2011). Tratado de Reprodução Assistida da sociedade Brasileira de Reprodução Humana (SBRH). 2^a edição. Ampl. e atualiz.

Huhtaniemi I & Pelliniemi LJ (1992). Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 201:125-39.

Larsen WJ (1997). Human embryology. 2^a edição. New York, Churchill Livingstone Inc.

Leblond CP, Clermont Y. (1952a). Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea-pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. Am.J.Anat. 90:167-215.

Leblond CP, Clermont Y. (1952b). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. Ann. N.Y.Acad.Sci. 55:548-573.

Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J. (2013). Medicina Interna de Harrison. 18^a edição. Porto Alegre: AMGH; 3610 pp.

Merchant-Larios, H. (1975). The onset of testicular differentiation in the rat: an ultrastructural study. Am. J. Anat. 145:319-30.

Miraglia SM., Hayashi H, Goldfeder EM (1990). Histomorfometria dos testículos de ratos albino normais em várias idades. Rev. Bras. Ciênc. Morfol. 7:8-15.

Moore, KL & Persaud, TVN (2008). Embriologia clínica. 8^a. Edição, Elsevier, Rio de Janeiro.

Pocock G, Richards CD. Human Physiology (1999). The Basis of Medicine. Oxford: Oxford University.

Russel LD, Etlin RA, Hikim APS, Clegg ED (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Cache river Press, St. Louis, MO.

Saladin KS. Anatomy and Physiology (2003). The Unit of Form and Function. 3rd edition, McGraw-Hill, New York.

Tortora GJ, Derrickson B. Corpo Humano (2017). Fundamentos de Anatomia e Fisiologia. 10^a Ed, Ed. Artmed. Porto Alegre.

2 ARTIGO



Ivermectin acute administration impaired the spermatogenesis and spermiogenesis of adult rats



Flora Cordeiro^a, Wagner Gonçalves Jr^b, Natalia Moreira^b, João Iosif Sloboedtico^b, Nathalia de Andrade Galvão^b, Helenice de Souza Spinosa^b, Leoni Villano Bonamin^b, Eduardo Fernandes Bondan^a, Claudia Helena Pastor Ciscato^c, Cláudia Maria Barbosa^c, Maria Martha Bernardi^{a,*}

^a Graduate Program of Environmental and Experimental Pathology, Paulista University, Rua Dr. Bacelar, 1212, 04025-002 São Paulo, SP, Brazil

^b Graduate Program of Experimental and Comparative Pathology, Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, São Paulo, SP 05508-270, Brazil

^c Pesticide Residues Laboratory, Biological Institute, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, São Paulo, SP 04014-002, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Avermectin
Testosterone levels
LCMS/MS
Histological examination
Morphometry
Immunohistochemistry

ABSTRACT

Ivermectin (IVM) is an antiparasitic agent widely used in agricultural, domestic animals and in human clinical practice. In the present study, the temporal effects of therapeutic doses of IVM in the morphometric and histological assessment of testis were studied to verify if IVM acute administration impaired the spermatogenesis and spermiogenesis of adult rats, if these effects are reversible. The testosterone levels and the plasmatic IVM levels were assessed. The results show: 1) IVM acute exposure, mainly in the higher dose, reduced the testicular volume, the tubular diameter and the germinal epithelium height; 2) no interferences on Leydig cells frequency; 3) histological studies show that tubular sections containing several histological changes indicative of spermatogenesis interruption, such as disorganization of germinal epithelium, vacuolar degeneration of the germ cells and sloughing of cells into the tubular lumen; 4) no differences in testosterone levels; 5) The IVM plasmatic levels were significantly reduced at 72 h after the 0.2 mg/kg. It was concluded that acute IVM impaired the spermatogenesis and spermiogenesis of rats. Probably these effects were not consequence of IVM at the Leydig cells because no effects were observed at this level. Finally, our results suggest that some testicular effects are reversible and correlated with the plasmatic levels of IVM.

1. Introduction

Avermectins are broad spectrum antiparasitic agents that are widely used in agricultural and domestic animals (Bloemquist, 2003; Casida and Durkin, 2013; Campbell, 2016). In human clinical practice, avermectins is used to treat lymphatic filariasis, onchocerciasis, rosacea, scabies, head lice and others (Kircik et al., 2016). Ivermectin (IVM) is an avermectin that belongs to the macrocyclic lactones class of endectocides and consists of a mixture of two homologous compounds, 22, 23 dihydroavermectin B1a (H2B1a; not > 80%) and 22,23 dihyd roavermectin B1b (H2B1b; not > 20%). In vertebrates IVM is the first macrocyclic lactones synthesized avermectin (Elgar and Meinkind, 2003) and can produce γ -aminobutyric acid (GABA) mimetic effects by acting as agonists at GABA_A receptors and stimulating GABA release (Dawson et al., 2000; Estrada Mondragon and Lynch, 2015; Shoop et al., 1995).

In addition to central nervous system (CNS), GABA was found in gonads and accessory reproductive organs, and a direct effect on steroidogenesis and sperm viability and motility has been described (Brdo et al., 1983; Frungieri et al., 1996). GABA can mimic and potentiate the action of progesterone in initiating the acrosome reaction of mammalian sperm, indicating that sperm contain receptors for GABA. The GABA_A (He et al., 2003), GABA_B (He et al., 2001) and GABA_C (Li et al., 2008) receptors were identified in rat testis and sperm. Also, the GABAergic systems may play modulatory roles in spermatogenesis (Kanbara et al., 2005), because expression of glutamate decarboxylase mRNAs, which are GABA synthetic enzymes, has been observed in both round and elongated spermatids. Furthermore, the GABAergic system located in adult Leydig cells in rodent and human testis appears to be linked to the regulation of steroid synthesis by Leydig cells via local GABA_A receptors (He et al., 2001; Geigerseder et al., 2003; Hauer et al., 2005).

Data about IVM on reproductive parameters are controversial.

*Corresponding author.

E-mail address: maria.bernardi@deconta.unesp.br (M.M. Bernardi).

Histomorphometric evaluation of testicular parenchyma through the daily spermatogenic production and the efficiency of the spermatogenesis of rats treated with different doses of IVM (0.1, 0.4 and 0.6 mg/kg) did not show deleterious effect (Moura et al., 2006). However, in rats 0.56 mg/kg of IVM induced a variety of side effects on male reproduction as reduction of testes, epididymis, and accessory sex organs weights and change in sperm characters; decrease of sperm count and motility, and increase in sperm abnormalities (El-Sawy et al., 2015). In male rabbits 0.5 or 1.0 mg/kg of IVM induces in rats deleterious effects on kidneys and hepatic functions, oxidative stress, weight loss and increased testosterone and free testosterone (El-Far, 2013). Moreover, at clinical veterinary practice the sperm of recently animals treated with IVM was not considered with good quality to perform fertilization.

In the present study the temporal effects of a low and high therapeutic doses of IVM (Sall, 1989) in the morphometric and histological assessment of testes were performed to verify if IVM acute administration negatively affect adult rat testis and if these effects are reversible. We measured the testosterone serum levels because interferences with this hormone could be responsible for testis injuries (Russell et al., 1981; Meistrich, 1986). The IVM serum levels were evaluated to investigate their relationships with testis injuries and the testosterone levels. Also, the astrocyte behavior was assessed by the glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in the cortex and hypothalamus to examine if the central nervous system are involved in the IVM effects on testes injuries (Chatton et al., 2003).

2. Material and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats from the Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (FMVZ/USP), were used. The animals were housed in groups of four in polypropylene cages with a metal cover (40 cm × 50 cm × 20 cm) under controlled room temperature (22 °C ± 2 °C), humidity (45–65%), and artificial lighting (12 h/12 h light/dark cycle, lights on at 7:00 h a.m.). The animals received free access to Nuvilab® rodent chow (Nuvital Company, São Paulo, Brazil) and filtered water. Sterilized residue-free wood shavings were used as bedding. Animals were divided randomly into control and experimental groups. All of the procedures were reviewed and approved by the Animal Care Committee of Paulista University (UNIP) (protocol no. 333/15) and FMVZ/USP (protocol no. 1892040315) and conformed to the guidelines of the Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources, National Research Council, USA (Committee, 2011). All efforts were made to minimize animal suffering.

2.2. Drugs

Ivermectin (IVM – 1% Ivomec® injectable, Merial Animal Health Ltda, Paulínia, SP, Brazil) was dissolved in a saline solution (NaCl 0.9%) plus a drop of Tween 80 and was administered subcutaneously (SC) at a dose of 0.2 or 1.0 mg/kg. Saline solution plus a drop of Tween 80 was also administered as control solution. All solutions were administered in a volume of 1.0 mL/kg. The 0.2 mg/kg IVM dose was chosen because it is the standard therapeutic dose used in several animals' models (Dadarkar et al., 2007; Almeida et al., 2017). The 1.0 mg/kg dose is considered high, and we previously observed that this dose reduced male and female sexual behavior (Bernardi et al., 2011; Moreira et al., 2014).

2.3. Groups and treatments

Male Wistar adult rats (90 day old) were distributed among seven groups. A group of animals received control solution (control group). Six groups received IVM; three of them received a 0.2 mg/kg dose and

other three received 1.0 mg/kg. All experimental procedures were made 24, 48 and 72 h after IVM administration. After each time of IVM administration, the rats were euthanized (decapitation) and used to evaluate the testes morphometric and stereological examination, testosterone levels and ivermectin plasmatic level.

2.4. Procedures

2.4.1. Testicular weight and testis volume

The rats 24, 48 and 72 h after the treatments were euthanized (decapitation) and their brains, blood, and testes were collected.

The testes were weighed, and were calculated as the proportion of the gonad mass relative to total body mass: Testicular weight = (gonad weight/body weight) × 100.

The volume of each testis (V) was calculated: $V = 4/3\pi ab^2$, where a is the semiprolate axis and b is the semioblate axis (Miraglia and Hayashi, 1993; Botelho Cabral et al., 1997).

2.4.2. Histological examination

The testes were fixed by immersion in Bouin's liquid fixative for 48 h. The specimens were processed and embedded in Paraplast Plus (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Cross sections were obtained from the fragments of the gonad, allowing an adequate morphometric analysis (Gundersen et al., 1988). To obtain a better identification of all phases of spermatogenesis, 6 μm-thick sections were stained with the Hematoxilin-Eosin (HE) method (right testis). A periodic acid-Schiff method, counterstained with Harris' Hematoxylin (PAS + H), was also processed as a histochemical method to determine interstitial cells as well as elongate spermatids (left testis).

2.4.3. Morphometric examination

2.4.3.1. Tubular diameter and germinal epithelium height. The analysis of the linear morphology of seminiferous tubules to determination of tubular diameter sizing was made measuring the distance between the basal lamina of a tubule to the basal lamina in the opposite side. To determine the height of the germinal epithelium the distance from the basal lamina of a tubule until the beginning of the tubular lumen was measured, using a computerized image analysis program, ImageJ software. Ten fields were selected from the histological testicular sections to each animal and photomicrographs were taken using a 40× objective. For each field, five tubules were measured and the distance of tubular diameter and the height of the germinal epithelium were automatically calculated in pixels using ImageJ software totaling 50 tubules per animal.

2.4.3.2. Interstitial cells frequency. Ten fields were selected from the histological testicular sections to each animal. The frequency of interstitial cells per field was estimated using a 40× objective directly at the microscope.

2.4.4. Testosterone levels

Serum testosterone levels were assessed using commercially available enzyme-linked immunosorbent assays (testosterone kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA; catalog no. 582701). The procedure was performed according to the manufacturer's instructions.

2.4.5. IVM serum levels

The IVM serum levels were assessed using liquid chromatography technique coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS analysis). The IVM was analyzed by a Agilent Technologies 1260 Infinity system with a binary pump, degasser, automatic sampler and column oven with interface for the triple quadrupole mass spectrometer (3200 QTRAP) Applied Biosystem MDS Sciex with TurboSpray. The LC-MS/MS control software was Analyst V1.5.1. The column used was Agilent Zorbax XDB C18 (50 mm × 2.1 mm and 3 μm diameter). The column oven was maintained at 40 °C. The following gradient elution with methanol and 20 mM aqueous

ammonium formate (20:80 v/v) at "A" and methanol and 20 mM aqueous ammonium formate (90:10 v/v) at "B" was used at a flow rate of 200 $\mu\text{L}/\text{min}$: 0–3 min: 0% B → 100% B; 3–15 min: 100% B → 0% B; 15–30 min: 0% B → 0% B. The volume of injection was 10 μL . Mass determination was performed in electrospray positive mode with monitoring of three more abundant MS/MS (precursor/products) 892.7–569, 892.7–551.3, 892.7–566.9. The source conditions of the MS were as follows: curtain gas (CUR) 10 psi, spray ion-ion 5000 V, collisionally activated dissociation gas (CAD) medium, gas nebulizer (GS1 and GS2) 45 psi and source temperature 300 °C. To obtain calibration curves the extracted blank was fortified with solution containing 2.5–100 ng/mL of the standard drugs.

The subzero-temperature liquid–liquid extraction was used (Yoshida and Akane, 1999). Acetonitrile (1 mL) was well mixed with 0.25 mL of rat serum. The mixture of acetonitrile and serum was centrifuged at 1800 rpm for 9 min. Each sample was cooled at –20 °C for 20 min to separate the organic and aqueous phases. An aliquot of 100 μL was transferred to a vial and 10 μL of the extract was injected into a LC-MS/MS. The recovery was evaluated by analyzing three replicates at the level of 5 ng/mL, the results were in the range of 70 to 120%, feasible for the concentration.

2.4.6. GFAP immunohistochemistry

The rats euthanized had their brains rapidly dissected and fixed in 10% buffered formalin for at least 48 h. The cortex and hypothalamus was embedded in paraffin for processing per conventional histological procedures. Immunohistochemical investigation of GFAP in both described regions was performed as previously described (Joaquim et al., 2015).

Ten photomicrographs per section of the cortex and of the hypothalamus were randomly taken with the same microscope using a 40 × objective. The area of astrocyte processes, marked in brown, was automatically calculated in pixels using Metamorph software that was calibrated with digital color filters that regulated red, green, and blue bits, such that only positive cells were included and background staining was excluded from the measurement.

2.5. Statistical methods

Homogeneity was verified using the F test or Bartlett's test. Normality was verified using the Kolmogorov-Smirnov test. The one-way ANOVA followed by Dunnett's test was used to compare parametric data. The Kruskal-Wallis test followed by the Tukey or Dunn's multiple comparison tests were used to analyze relative testis weight and the GFAP area. The results are expressed as the mean ± SEM or medians and range. Instat software (Prism 6.01, GraphPad, San Diego, CA, USA) was used to analyze the data. In all cases, the results were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Testicular weight and testis total volume

Differences were observed in the testicular weight ($F_{6,35} = 2.34$, $p = 0.05$, Fig. 1A). The testicular weight of 0.2 mg/kg group at 72 h and 1.0 mg/kg group at 48 h were reduced compared to the weight of control group.

Testicular volume (Fig. 1B) significantly differed between groups ($F_{6,35} = 3.26$, $p = 0.01$). The post hoc test indicates a decreased volume in rats treated with 1.0 mg/kg at 24 h and 48 h relative to control group.

3.2. Histological examination

The testes of animals in the control group exhibited normal histological characteristics (Fig. 2A and B). The seminiferous tubules were arranged in well-defined cell associations, representing the 14 stages of

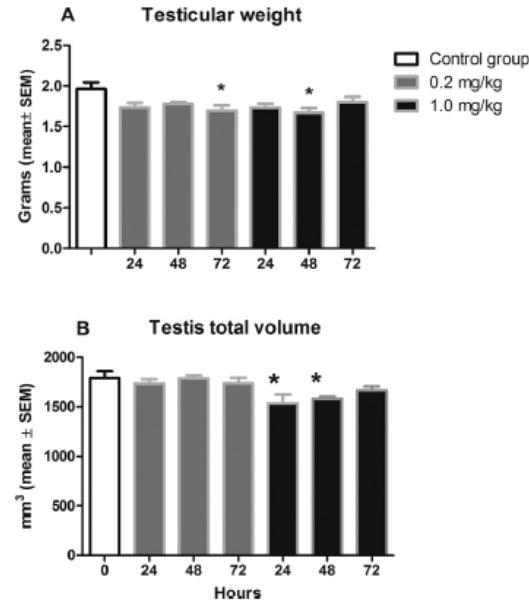


Fig. 1. Testicular weight (A) and testis total volume (B) of rats treated with 0.2 or 1.0 mg/kg of ivermectin (IVM) observed 24, 48 and 72 h after treatments. $N = 6$ per group. The data are presented as means ± SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, compared with respective control group (one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test).

the cycle of the seminiferous epithelium. The latter presented in all its tubular sections 4 to 6 concentric layers containing germ line cells characteristics of spermatogenesis. The support of the seminiferous epithelium cells (Sertoli) as well as interstitial cells (Leydig cells) exhibited nuclear aspect and location compatible to normal.

At 24 h after 1.0 mg/kg with IVM it was observed some tubular sections containing several histological changes characteristic of quantitative interruption spermatogenesis, such as disorganization of germinal epithelium, vacuolation, degeneration of the germ cells, germ cells and sloughing of cells into the tubular lumen (Fig. 2C, D, E and F).

Similar histological abnormalities were seen in tubular sections of 48 h and registered in the following light micrographs (Fig. 3A, B, C and D). At 72 h it was observed the same pattern of abnormalities that were described in the other two groups, denoting the permanence of these degenerative patterns in the germinal epithelium of the 72 h group (Fig. 4A, B, C, D and E).

3.3. Morphometric examination

Fig. 5 shows the morphometric analysis of rats treated with 0.2 and 1.0 mg/kg of IVM observed 24, 48 and 72 h after treatments.

Significant differences were observed between groups in the seminiferous tubule diameter ($F_{6,35} = 3.47$, $p = 0.009$, Fig. 5A). Relative to control group, this parameter was reduced at 24 h after 0.2 mg/kg and at 48 h after 1.0 mg/kg IVM.

Concerning the germinal epithelium height (Fig. 5B), significant differences were observed among groups ($F_{6,35} = 5.78$, $p < 0.0003$). The post hoc test show decrease in this parameter after 24 and 48 h, in rats treated with 1.0 mg/kg relative to control group.

No differences were observed in the number of Leydig cells (Fig. 5C) between groups and in the time after treatments ($F_{6,35} = 0.65$, $p = 0.69$).

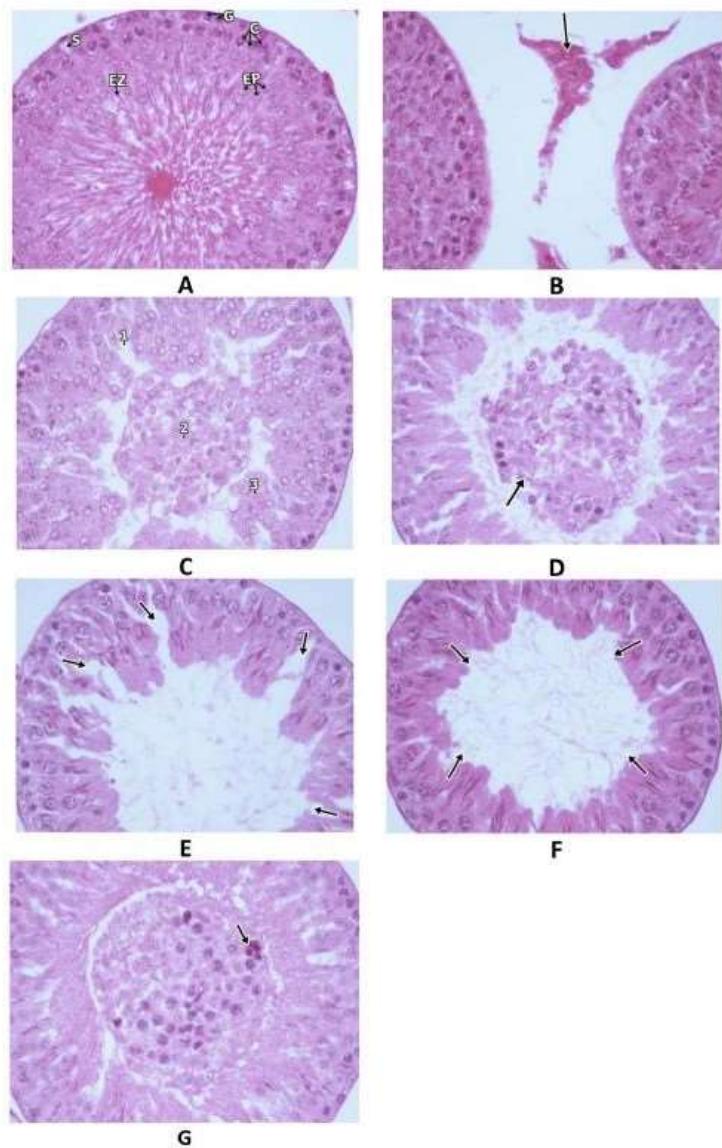


Fig. 2. Control group A - Light micrograph of seminiferous tubule section showing normal aspect and B - Interstitial tissue testicular section with Leydig cells in normal aspect (arrow) ($\times 400$). S - semoli cell; G - spermatogonia; C - spermatocyte; EP - round spermatids; EZ - spermatozoa. Light micrograph of testis post treatment with 1.0 mg/kg of Ivermectin at 24 h. C - seminiferous tubule section with a sloughing is taking place (2) and the epithelium appears highly disorganized (1,3); D - seminiferous tubule section with sloughing of germ cells into the tubular lumen (arrow); E - seminiferous tubule section where epithelium appears disorganized (arrows); F - seminiferous tubule section showing low frequency of germline lineage cells with an enlargement of lumen diameter (arrows); G - seminiferous tubule section with germ cells into the tubular lumen with pyknotic nuclei (arrow). H.E. ($\times 400$).

3.4. Testosterone levels

Table 1 shows the serum testosterone concentration of rats 24, 48 and 72 h after 0.2 and 1.0 mg/kg of IVM administration. The one-way ANOVA indicates significant differences between groups ($F_{6,51} = 3.18, p = 0.01$). Relative to control group, a decreased in the testosterone levels in rats treated with 0.2 mg/kg of IVM at 24 ($p = 0.01$), 48 ($p = 0.05$) and 72 h ($p = 0.01$). Also, after 1.0 mg/kg of IVM treatment a decrease in the hormone levels at 24 ($p < 0.05$) and 72 h ($p < 0.01$).

3.5. IVM serum levels

The mean plasma concentrations of IVM obtained from the groups of rats treated with the levels of 0.2 mg/kg and 1.0 mg/kg are shown in Fig. 6A.

A decreased on plasma levels of IVM was observed at 72 h after administration relative to 24 h (interaction - $F_{2,88} = 4.259, p = 0.017$; time - $F_{2,88} = 1.55, p = 0.21$; Dose - $F_{1,88} = 2.15, p = 0.15$). Fig. 6B illustrates a chromatogram of IVM levels.

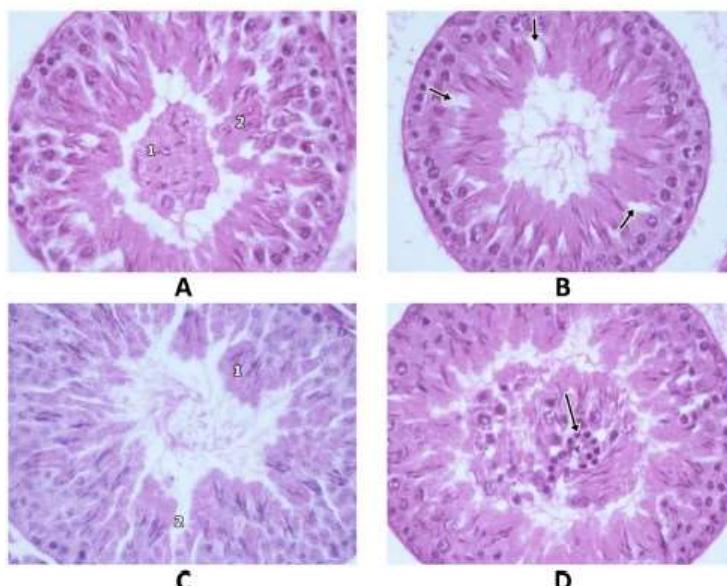


Fig. 3. Light micrograph of testis post treatment with 1.0 mg/kg of ivermectin at 48 h. A - sloughing of germ cells into the tubular lumen (1) and a disorganized epithelium (2); B - tubular epithelium vacuolation (arrows); C - seminiferous tubule section with epithelium appears disorganized (1,2); D - seminiferous tubule section with a massive germ cells into the tubular lumen and germ cells with pyknotic nuclei (arrow). H.E. ($\times 400$).

3.6. GFAP immunohistochemistry

No differences were observed between the cortical ($KW = 0.67$, $p = 0.72$) and hypothalamic ($KW = 1.45$, $p = 0.48$) GFAP areas (Table 2).

4. Discussion

Quantitative information provides evidence that control and experimental tissues are different. Classically, testis weights and volume have been used as a quantitative indicator of testis normality, unless other circumstances are at play to increase testis weight such as tumor, edema or inflammation (Russel et al., 1990). In addition, there is a strong correlation between testis weight and the number of germ cells present in it (Hikim et al., 1989; Meistrich, 1982). The findings of this study suggest an atrophy of testis at 48 h of treatment with a reversed effect after 72 h.

Weight and volume of the organ are important measures for statistical correlations, mainly associated with pathologies and/or growth. The testis volume is a composition of the volumetric density of both parenchyma and interstitial tissue, intrinsic components of the testis.

Tubular diameter analysis is important in determine if volume alterations occurred in the germinal epithelium and not in the interstitial tissue.

In a review on the assessment of testicular toxicity (Creasy, 1997), underscores the importance of quantifying testicular changes through parameters such as tubular diameter for determination of loss of germinal epithelium cell in testes.

The analysis of the results of tubular diameter is in agreement with the decrease in weight and testicular volume and presented a significant decrease at 24 h at the dose of 0, 2 mg/kg as well as at 48 h at 1.0 mg/kg of IVM and showed a recovery at 72 h. This effects resulted probably by the decrease of the tubular diameter in consequence of reduced germinative cells (Hikim et al., 1989).

Histological aspects found in this study, demonstrated increased intraepithelial vacuolation, suggesting a death of germinal lineage cells

resulting in large spaces between contiguous Sertoli cells (Freitas et al., 2002). Besides this, some section also displayed disorganized cellular associations of the seminiferous epithelium while others exhibits a large quantity of cellular debris and cells at various phases of maturation localized in the tubular lumen. Pyknotic nuclei of germinal lineage cells were observed in other sections, characterizing the degeneration of the seminiferous epithelium cells.

According with Russel et al. (1990) there are four general schemes that may lead to a diminution in the numbers of sperm produced by the testis; interruption of the pattern of stem cell division, degeneration and phagocytosis of germ cells, arrest or retardation of spermatogenesis and sloughing of germ cells. Germ cells can be released from contacts with other germ cells of the same type by breakage of intercellular bridges. They will also be freed of attachments to Sertoli cell by disengagement of Sertoli-germ cell junctions (Russell and Peterson, 1985) and will be sloughed individually or as a group into the lumen of the tubule. This condition frequently occurs when degeneration of germ cells is massive, but it has also been seen when only minor changes in the testis were noted. We found these histological alterations in all experimental groups 24, 48 and 72 h time with a 1.0 mg dosage. Because similar but slightly alterations were observed with 0.2 mg/kg data were not presented.

However, Moura et al. (2006) did not reported differences between control and experimental rats on body weight, testicular weight and in the gonadosomatic index of rats treated repeatedly with ivermectin. In sheep a therapeutic dose of IVM increases hyaluronidase activity of serum and semen in sheep, but it decreases sperm motility and concentrations, suggesting that use of IVM is not suitable during ramming season and in rams used for breeding due to the deleterious effects on fertility (El-Nahas and El-Ashmawy, 2008). In male rabbits IVM in therapeutic and double therapeutic doses induced deleterious effects on kidneys and hepatic functions, oxidative stress, weight loss and increased testosterone and free testosterone (El-Far, 2013). Species and treatment design could account by these differences (Meistrich, 1986).

GABA neurotransmitter and GABAergic receptors were previously reported to be distributed in reproductive systems besides central

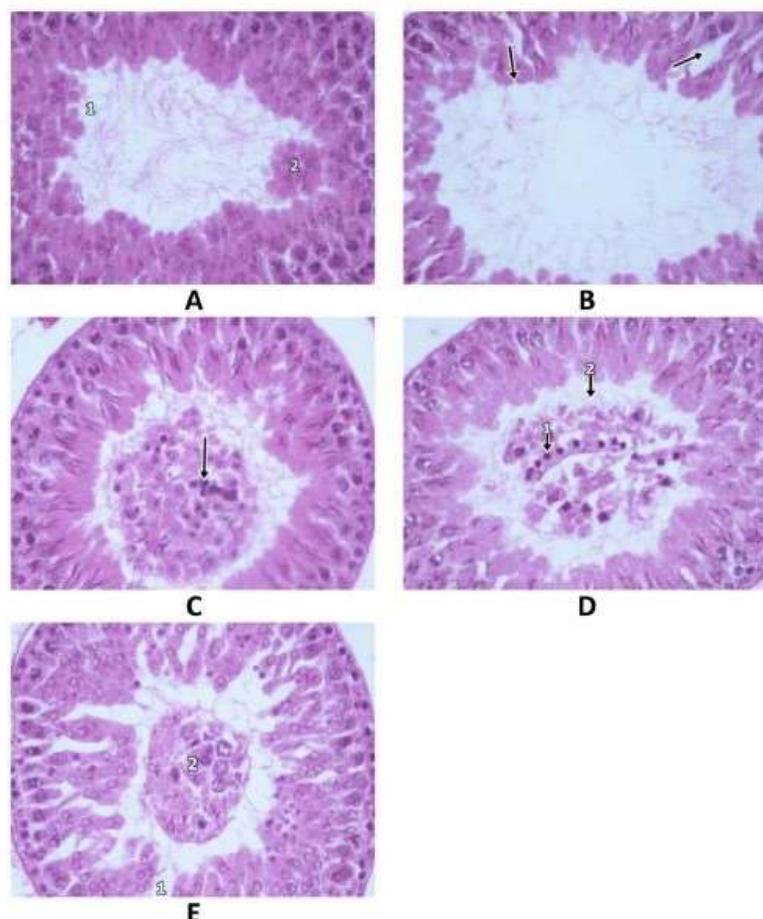


Fig. 4. Light micrograph of testis post treatment with 1.0 mg/kg of ivermectin at 72 h. A - enlargement of lumen diameter (1) and the epithelium appears disorganized (2); B - enlargement of lumen diameter and tubular epithelium vacuolation (arrows); C - germ cells into the tubular lumen with pyknotic nuclei (arrow); D - germ cells with pyknotic nuclei (1) and sloughing of germ cells into the tubular lumen (2); E - epithelium appears disorganized (1) and germ cells into the tubular lumen (2). H.E. ($\times 400$).

nervous system and predicted to participate in the modulation of testicular function (Erdo et al., 1983; Ritta and Calandra, 1986; Frungieri et al., 1996). At central nervous system, GABA acts as a trophic factor regulating key developmental steps, such as proliferation, differentiation and migration (Ben-Ari, 2002; Represa and Ben-Ari, 2005; Mackwardt and Overstreet-Wadiche, 2008). Du et al. (2013) identified GABA as a novel niche factor that negatively regulated spermatogonial stem cells proliferation to maintain the homeostasis of spermatogenesis in the testis.

Ivermectin acute exposure, mainly in the higher dose, impaired the spermatogenesis and spermogenesis of rats by a disorganized cellular in different stages of the seminiferous epithelium cycle. We propose that these effects were consequence of excessive stimulus produced by IVM administration by an action on GABAergic receptors or increased GABA release. In this respect, studies of cisplatin cytotoxic effect during intrauterine phase on rat's testis suggested that when primary gonocytes were affected by the toxic action of cisplatin, consequently populations of mature spermatids were also hit in an adult phase by the significant reduction of the numbers of cells, demonstrating a delayed cascade effect on the seminiferous epithelium of these animals (Cordeiro, 2000).

Is of paramount importance to identify the effect of Ivermectin in mechanism of proliferation, since, by the histological data found in this study, it is already possible to realize that same effect occurring in

elongate spermatids from experimental rat testis in this study. A reduction in elongated spermatids would result in first instance a state of infertility, even if reversible. However one should keep in mind the reproductive age of animals submitted to this treatment, since these animals are adults and already have a reproductive consolidated stability.

It is known that in adult age testosterone is involved in several functions as maintaining libido, muscle strength and mass, bone density and sperm production. This hormone, produced by the Leydig cells, is controlled at central nervous by a retroactive system in which the hypothalamus and hypophysis release of gonadotrophic substances which in turn controls the testosterone levels produced by the Leydig cells (Ramaswamy and Weinbauer, 2014).

Administration of both IVM doses did not modify the plasmatic testosterone levels and this effect may be related to the absence of changes in Leydig cells histological parameters.

GABA is considered to be the major inhibitory neurotransmitter in the hypothalamus that is synthesized in and released from GABAergic neurons in the hypothalamus (Decavel and Van Den Pol, 1990). Astrocytes contain a considerable amount of GABA, which can be released and activate the receptors responsive to GABA (Yoon et al., 2012). Also, astrocytes are themselves responsive to GABA by expressing GABA receptors (Fraser et al., 1994). Thus, we measured the astrocytes behavior

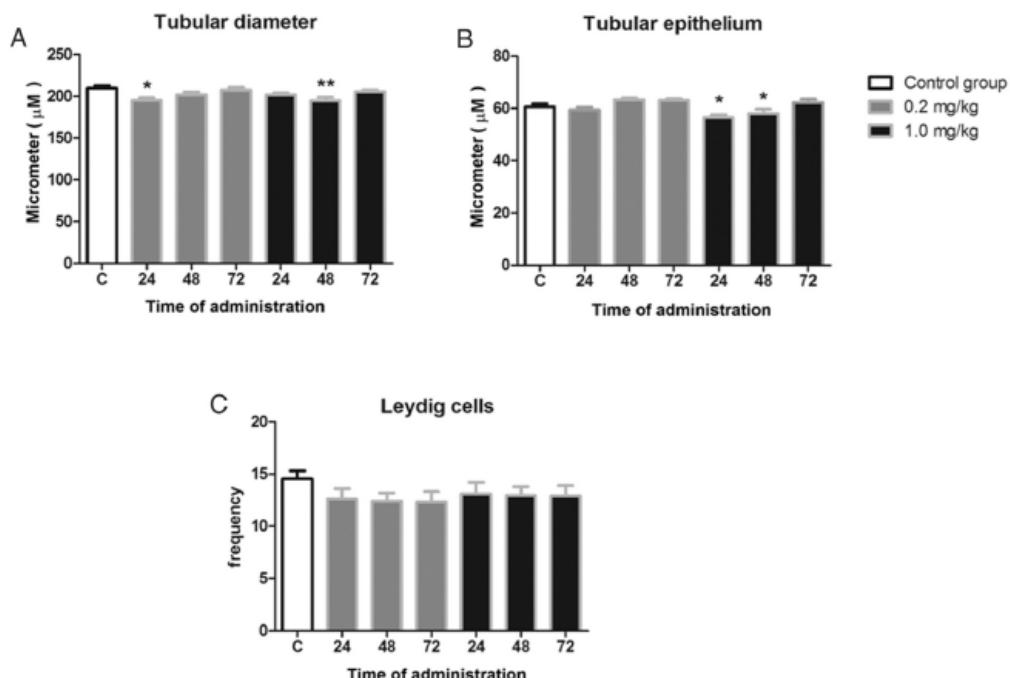


Fig. 5. Seminiferous tubular diameter (A), height of germinal tubular epithelium (B) and frequency of Leydig cells (C) of rats treated with 0.2 or 1.0 mg/kg of IVM observed 24, 48 and 72 h after treatments. $N = 6$ /group. The data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, compared with respective control group (one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test).

Table 1

Serum testosterone levels (pg/mL) in male rats 24, 48 and 72 h after administration of 0.2 or 1.0 mg/kg ivermectin or control solution (1.0 mL/kg).

Groups	Time of treatment		
	24 h	48 h	72 h
Control	42.77 \pm 7.07 ($N = 10$)		
0.2 mg/kg	16.24 \pm 3.51* ($N = 7$)	22.09 \pm 4.88* ($N = 7$)	18.66 \pm 6.10* ($N = 7$)
1.0 mg/kg	24.89 \pm 3.21* ($N = 7$)	28.48 \pm 4.93 ($N = 7$)	21.35 \pm 4.43* ($N = 7$)

The data are expressed as mean \pm SEM. $N = 10$ in control group, $N = 7$ in 0.2 mg/kg ivermectin group, $N = 7$ in 1.0 mg/kg ivermectin group.

* $p < 0.05$ compared with control group (one-way ANOVA followed by Dunnett post hoc test).

** $p < 0.001$ compared with control group (one-way ANOVA followed by Dunnett post hoc test).

by the expression of the protein GFAP in the cortex and hypothalamus. The lack of IVM effects in the cortex and hypothalamus on astrocytes area suggest that IVM did not affected the testosterone levels by a central nervous action at the astrocyte levels.

Spermatogenesis is a complex process involving mitotic cell division, meiosis and the process of spermiogenesis. The regulation of spermatogenesis involves both endocrine and paracrine mechanisms (Sofilitis et al., 2008). Sertoli cells also provide factors necessary for the successful progression of spermatogonia into spermatozoa (de Kretser et al., 1998). Somatostatin is a regulatory peptide playing a role in the regulation of the proliferation of the male gametes (de Kretser et al., 1998). Activin A, follistatin and FSH play a role in germ cell maturation during the period when gonocytes resume mitosis to form the spermatogonial stem cells and differentiating germ cell populations (Kaijia et al., 1992). Thus, detailed studies about the Sertoli cells are necessary to investigate if injuries in these cells is involved in the IVM testicular function.

Ivermectin acute exposure impaired the spermatogenesis and spermiogenesis of rats by a disorganized cellular in different stages of the seminiferous epithelium cycle. At 72 h after treatment the morphometric data suggest some reversibility of the impaired effects. We found a direct relationship between the histological data and the IVM plasmatic levels. In fact, measured at 24, 48 and 72 h shows a decreased IVM levels with minimal levels at 72 h after 0.2 mg/kg of IVM.

5. Conclusion

In conclusion, ivermectin acute exposure, mainly in the higher dose, impaired the spermatogenesis and spermiogenesis of rats by a disorganized cellular in different stages of the seminiferous epithelium cycles, independently of central neural system inflammation, since no differences were observed in the cortex and hypothalamic GFAP + astrocytes area. The morphometric testes data suggest that the IVM effects are reversible and correlated with the IVM plasmatic levels.

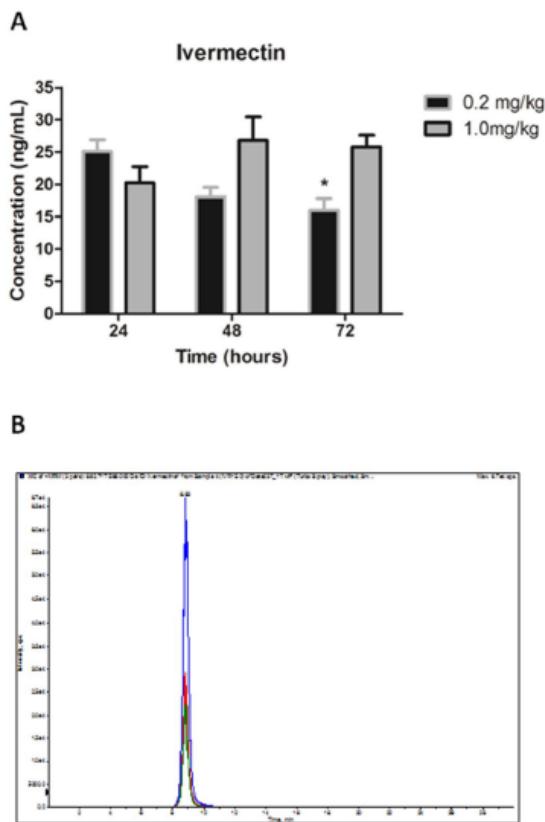


Fig. 6. A - Plasma concentration of ivermectin in male rats 24, 48 and 72 h after administration of 0.2 or 1.0 mg/kg ivermectin or control solution (1.0 mL/kg). The data are expressed as mean \pm SEM. N = 10/group. *p < 0.05, compared with control group (one-way ANOVA followed by Dunnett post hoc test). B - Chromatogram of plasma IVM levels.

Table 2
GFAP expression in male rats 24, 48 and 72 h after administration of 1.0 mg/kg ivermectin or control solution (1.0 mL/kg) in the cortex frontal (A) and hypothalamus (B).

Groups	Control	Time of treatment		
		24 h	48 h	72 h
Frontal cortex	6.07 \pm 1.03	9.49 \pm 2.32	8.025 \pm 3.07	10.21 \pm 2.01
Hypothalamus	8.53 \pm 1.65	10.17 \pm 3.37	7.24 \pm 0.37	10.87 \pm 1.36

The data are expressed as mean \pm SEM of total count of pixels $\times 10^3$. N = 10/group. p > 0.05 (Kruskall-Wallis test).

Acknowledgements

This work is part of PhD thesis of Natalia Moreira, Vagner Gonçalves Jr. and Flora Cordeiro, and was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant no. 303701/2014-5 and 441580/2014-9) and Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; grant no. 2015/03131-4).

References

- Committee, 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Eighth Edition. <http://dx.doi.org/10.2307/1525495>.
- Almeida, M., Ayres, M., Santarem, V., Lambert, S., 2017. A. Agentes empregados no controle de ectoparásitos. In: Spinosa, H.S., Górnjak, S.L., Bernardi, M.M. (Eds.), Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 567–583 (in: Spinosa, H., Górnjak, S., Bernardi, M. (Eds.), Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 553–576).
- Ben-Ari, Y., 2002. Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 728–739. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn920>.
- Bernardi, M.M., Kirsten, T.B., Spinosa, H.S., Manzano, H., 2011. Ivermectin impairs sexual behavior in sexually naïve, but not sexually experienced male rats. *Res. Vet. Sci.* 91, 77–81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.07.026>.
- Bloomquist, J.R., 2003. Chloride channels as tools for developing selective insecticides. In: Archives of Insect Biochemistry and Physiology, pp. 145–156. <http://dx.doi.org/10.1002/arch.10112>.
- Bonello Cabral, M.G., Hayashi, H., Miraglia, S.M., 1997. Histomorphometry of sexually immature albino rats testis after X-ray-irradiation. *Interciencia* 22, 71–80.
- Campbell, W.C., 2016. Ivermectin: a reflection on simplicity (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201601492>.
- Casida, J.E., Durkin, K.A., 2013. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 99–117. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153645>.
- Charon, J.Y., Pellerin, L., Magistretti, P.J., 2003. GABA uptake into astrocytes is not associated with significant metabolic cost: implications for brain imaging of inhibitory transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 12456–12461. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2132096100>.
- Cordeiro, F., 2008. Efeito da Crispatina sobre a morfologia de testículos de ratos albinos tratados na fase intra-uterina. Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).
- Creasy, D.M., 1997. Review article: evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: the appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicol. Pathol.* 25, 119–131. <http://dx.doi.org/10.1177/019262339702500201>.
- Dadkar, S.S., Deore, M.D., Game, M.M., 2007. Comparative evaluation of acute toxicity of ivermectin by two methods after single subcutaneous administration in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 47, 257–260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2006.10.009>.
- Dawson, G.R., Wafford, K.A., Smith, A., Marshall, G.R., Bayley, P.J., Schaeffer, J.M., Meinke, P.T., McKenna, R.M., 2000. Anticonvulsant and adverse effects of ivermectin analogs in mice are mediated through the gamma-aminobutyric acid(A) receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295, 1051–1060.
- Decavel, C., Van Den Pol, A.N., 1990. GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 302, 1019–1037. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.903020423>.
- Du, Y., Du, Z., Zheng, H., Wang, D., Li, S., Yan, Y., Li, Y., 2013. GABA exists as a negative regulator of cell proliferation in spermatogonial stem cell. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 18, 1–14. <http://dx.doi.org/10.2478/s11658-013-0081-4>.
- El-Far, A.H., 2013. Effect of therapeutic and double therapeutic doses of ivermectin on oxidative status and reproductive hormones in male rabbits. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* 8, 128–133. <http://dx.doi.org/10.3844/ajavsp.2013.128.133>.
- Elgert, G.W., Meinkind, T.L., 2003. Ivermectin. Dermatol. Clin. [http://dx.doi.org/10.1016/S0733-8633\(02\)80095-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0733-8633(02)80095-5).
- El-Nashar, A.F., El-Ashrawy, I.M., 2008. Effect of ivermectin on male fertility and its interaction with P-glycoprotein inhibitor (verapamil) in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 26, 206–211. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2008.03.011>.
- El-Sawy, A., El-Maddawy, Z.K., El-Sawy, A., 2015. Adverse effects of ivermectin in comparison with Rafoxadole on male rats. *Alexandria J. Vet. Sci.* 47, 119–128.
- Endo, S.I., Nemer, L., Szporow, L., 1983. The occurrence of GABA in vas deferens, prostate, epididymis, seminal vesicle and testicle of the rat. *Acta Biol. Hung.* 34, 435–437.
- Entrena-Mondragon, A., Lynch, J.W., 2015. Functional characterization of ivermectin binding sites in α1β2γ2 GABA(A) receptors. *Front. Mol. Neurosci.* 8(55). <http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2015.00055>.
- Fraser, D.D., Mudrick-Doumon, L.A., Macvarie, B.A., 1994. Astrocytic GABA receptors. *Glia* 11, 83–93. <http://dx.doi.org/10.1002/glia.440110203>.
- Freitas, F., Cordeiro-Mori, F., Sasso-Cerri, E., Lucas, S., MIRAGLIA, S.M., 2002. Alterations of spermatogenesis in ivermectin-treated rats: a stereological study. *Interciencia* 27, 227–235.
- Frungieri, M., Gonzalez Galver, S., Calandra, R., 1996. Influence of photoinhibition of GABA and glutamic acid levels, and on glutamate decarboxylase activity in the testis and epididymis of the golden hamster. *Int. J. Androl.* 19, 171–178. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2605.1996.tb00458.x>.
- Geigereder, C., Deppner, R., Thalhammer, A., Frungieri, M.E., Gamel-Didelon, K., Calandra, R.S., Nöhn, F.M., Mayerhofer, A., 2003. Evidence for a GABAergic system in rodent and human testis: local GABA production and GABA receptors. *Neuroendocrinology* 77, 314–323. <http://dx.doi.org/10.1159/000070897>.
- Gundersen, H.J.G., Bagger, P., Bendtsen, T.F., Evans, S.M., Korbo, L., Marcussen, N., Møller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., Saadén, F.B., Vesterby, A., West, M.J., 1988. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point-sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96, 857–881. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2745.1988.tb00458.x>.
- Hauet, T., Yao, Z.-X., Boze, H.S., Wall, C.T., Han, Z., Li, W., Bales, D.B., Miller, W.L., Culley, M., Papadopoulos, V., 2005. Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into Leydig cell mitochondria. *Mol. Endocrinol.* 19, 540–554. <http://dx.doi.org/10.1210/me.2004-0307>.
- He, X.B., Hu, J.H., Wu, Q., Yan, Y.C., Koide, S.S., 2001. Identification of GABA(B) receptors in rat testis and sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 243–247. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2001.4732>.
- He, X., Zhang, Y., Yan, Y., Li, Y., Koide, S.S., 2003. Identification of GABAR_{B2} in rat testis and sperm. *J. Reprod. Dev.* 49, 397–402. <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.49.397>.
- Hilkin, A.P.S., Amador, A.G., Klencke, H.G., Bartle, A., Russell, L.D., 1989. Correlative

- morphology and endocrinology of Sertoli cells in hamster testes in active and inactive states of spermatogenesis. *Endocrinology* 125, 1829–1843.
- Joaquin, A., Coelho, C., Mota, P., Bondan, E., Teodorov, E., Martins, M., Kirsten, T., Casarin, R., Bonanini, L., MM, E., 2015. Transgenerational effects of a hypercaloric diet. *Reprod. Fertil. Dev.* <http://dx.doi.org/10.1071/RD15165>.
- Kaipia, A., Penttila, T.L., Shimasaki, S., Ling, N., Parvinen, M., Toppila, J., 1992. Expression of inhibin- α and inhibin- β , follistatin and Activin-A receptor messenger ribonucleic acids in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology* 131, 2703–2710.
- Kanbara, K., Okamoto, K., Nomura, S., Kaneko, T., Shigeno, E., Azuma, H., Matsuka, Y., Watanabe, M., 2005. Cellular localization of GABA and GABAB receptor subunit proteins during spermatogenesis in rat testis. *J. Androl.* 26, 485–493. <http://dx.doi.org/10.2164/jandrol.04185>.
- Kirch, L., Del Rosso, J., Layton, A., Schauber, J., 2016. Over 25 years of clinical experience with Ivermectin: an overview of safety for an increasing number of indications. *J. Drugs Dermatol.* 15, 325–332.
- de Kreijer, D.M., Loveland, K.L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., Wreford, N., 1998. Spermatogenesis. *Hum. Reprod.* 13 (Suppl. 1), 1–8.
- Li, S., Zhang, Y., Liu, H., Yan, Y., Li, Y., 2008. Identification and expression of GABAC receptor in rat testis and spermatozoa. *Acta Biochim. Biophys. Sin. Shanghai* 40, 761–767. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-7270.2008.00453.x>.
- Markwardt, S., Overstreet-Wadiche, L., 2008. GABAergic signalling to adult-generated neurons. *J. Physiol.* 586, 3745–3749. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2008.155713>.
- Meistrich, M., 1982. Quantitative survival, sperm after correlation production between and testicular fertility stem in the cell mouse agents treatment with different cytotoxic. *J. Androl.* 3, 58–68.
- Meistrich, M.L., 1986. Critical components of testicular function and sensitivity to disruption. *Biol. Reprod.* 34, 17–28.
- Miraglia, S.M., Hayashi, H., 1993. Histomorphometry of immature rat testis after heating. *J. Morphol.* 217, 65–74. <http://dx.doi.org/10.1002/jmor.1052170106>.
- Moreira, N., Bernardi, M.M., Spinosa, H.S., 2014. Ivermectin reduces sexual behavior in female rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 43C, 33–38.
- Moura, C., Guerra, M., Silva Júlio, C., Caju, F., Alves, L., 2006. Avaliação histomorfometria do parénquima testicular de ratos adultos tratados com diferentes doses de ivermectina. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 58, 799–808.
- Ramaswamy, S., Weinbauer, G.F., 2014. Endocrine control of spermatogenesis: role of FSH and LH/testosterone. *Spermatogenesis* 4, e996025. <http://dx.doi.org/10.1080/21565562.2014.996025>.
- Reprea, A., Ben Ari, Y., 2005. Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2005.03.010>.
- Ritta, M., Calanda, R., 1986. Occurrence of GABA in rat testis and its effect on androgen production. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 42, 291–297.
- Russel, L., Ertan, R., Hikin, A., Clegg, E., 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. *Int. J. Androl.* 16. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2605.1993.tb01156.x>.
- Russell, L.D., Peterson, R.N., 1985. Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. *Int. Rev. Cytol.* 94, 177–211. [http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60397-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60397-6).
- Russell, L.D., Malone, J.P., Karpas, S.L., 1981. Morphological patterns elicited by agents affecting spermatogenesis by disruption of its hormonal stimulation. *Tissue Cell* 13, 369–380. [http://dx.doi.org/10.1016/0040-8166\(81\)90011-2](http://dx.doi.org/10.1016/0040-8166(81)90011-2).
- Shoop, W.L., Mrozik, H., Fisher, M.H., 1995. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Vet. Parasitol.* 59, 139–156. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)80743-V](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017(94)80743-V).
- Soflakis, N., Giouras, N., Tsounapi, P., Balogianidis, D., Giannakis, D., Pandalidis, N., 2008. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 109, 323–330. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.03.004>.
- Soll, M., 1989. Use of ivermectin in laboratory and exotic mammals and in birds, fish, and reptiles. In: Campbell, W.C., William, C. (Eds.), *Ivermectin and Abamectin*, pp. 265–New York.
- Yoon, B.E., Woo, J., Lee, C.J., 2012. Astrocytes as GABAergic and GABA-septive cells. *Neurochem. Res.* <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-012-0505-z>.
- Yoshida, M., Akane, A., 1999. Subzero-temperature liquid-liquid extraction of benzodiazepines for high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* 71, 1918–1921. <http://dx.doi.org/10.1021/ac981276g>.

Errata

Table 1. Serum testosterone levels (ng/ml) in male rats 24, 48 and 72 h after administration s.c. of 0.2 or 1.0 mg/kg ivermectin or control solution (1.0 ml/kg). The data are expressed as median \pm interquartile range of μ g/mL. N = 10 in control group, N = 7 in 0.2 mg/kg ivermectin group, N = 7-10 in 1.0 mg/kg ivermectin group. Kruskall-Wallis test.

Groups	Time of treatment		
	24 h	48 h	72 h
Control		0.431 \pm 1.751 (N=10)	
0.2 mg/kg	0.473 \pm 1.198 (N=7)	0.352 \pm 2.476 (N=7)	0.424 \pm 2.754 (N=7)
1.0 mg/kg	1.090 \pm 2.692(N=10)	0.785 \pm 1.783(N=7)	0.188 \pm 2.147(N=10)

CONCLUSÕES

- ✓ A exposição aguda à ivermectina, principalmente na dose mais alta, prejudicou a espermatoценese com ênfase na espermioценese de ratos, por causar desorganização celular em diferentes estágios do ciclo do epitélio seminífero.
- ✓ Os dados da morfometria testicular sugerem que os efeitos da ivermectina são reversíveis e correlacionados com os níveis plasmáticos do medicamento.
- ✓ Como conclusão final deste trabalho e, diante dos achados de que doses terapêuticas de diferentes avermectinas causam inúmeros danos na esfera reprodutiva dos animais, incluindo prejuízos comportamentais e testiculares, sugere-se que as avermectinas não sejam empregadas no período da reprodução.

ANEXOS

ANEXO 1 – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

C E R T I F I C A D O

CERTIFICAMOS, que a proposta intitulada "A administração aguda de ivermectina prejudica a espermatogênese e espermogenese em ratos adultos", registrada com o nº 339/15, sob-responsabilidade " MARIA MARTHA BERNARDI e FLORA CORDEIRO" de que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animais (CEUA) da UNIP, em reunião de 20/05/2015.

Finalidade	Ensino ()	Pesquisa Científica (x)
Vigência de autorização		Após aprovação da CEUA á 30/05/2017
Espécie / linhagem/ raça		Rato Isogênico
Nº de animais		42
Peso / idade		350 a 400 gramas / 90 a 110 dias
Sexo		Macho
Origem		Biotério de criação da Universidade Federal de São Paulo

Juliana Guizi

Secretaria da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Universidade Paulista – UNIP

ANEXO 2 – Certificado de Revisão Ortográfica e Gramatical



Pós-Graduação *Stricto Sensu*
Mestrado e Doutorado - Campus Indianópolis
Rua Dr. Bacelar, 1212 – 4º Andar - Vila Clementino
São Paulo - SP - CEP: 04026-002
Site: www.unip.br

REVISORES ORTOGRÁFICOS E GRAMATICAIS

DECLARAÇÃO

DECLARO que a *Dissertação* do Programa de *Doutorado* em *Patologia Ambiental e Experimental*/da Universidade Paulista – UNIP foi devidamente revisada.

Título: A administração aguda de ivermectina prejudica a espermatogênese e espermiogênese em ratos adultos

Autoria: Flora Cordeiro

Orientador(a): Prof.^a Maria Martha Bernardi

Dados do Revisor(a)

Nome: Cristina Mantovani Bassi

RG: 12479398

Telefone de contato: 999064773

E-mail: mantovanibassi@gmail.com

Tipo de revisão: Total / Parcial - Ortográfica / Gramatical - Formatação / Normatização

07 de junho de 2018.

Assinatura do(a) Revisor(a)

ANEXO 3 – Aceite de publicação em capítulo de livro

Fwd: Aceite do capítulo do livro
Martha Bernardi <marthabernardi@gmail.com>
seg 04/06/2018 11:58
Para: FLORA CORDEIRO <floracordeiro@unip.br>; flora.cordeiro@docente.unip.br;

----- Forwarded message -----

From: Cecília José Veríssimo <civerissimo@iz.sp.gov.br>
Date: seg, 4 de jun de 2018 08:53
Subject: RES: Aceite do capítulo do livro
To: Martha Bernardi <marthabernardi@gmail.com>

Prezada Maria Martha Bernardi,

Informamos que seu capítulo de livro intitulado “**AVERMECTINAS AFETAM A REPRODUÇÃO EM ESTUDOS COM ANIMAIS DE LABORATÓRIO**” foi aceito para fazer parte do livro: **CARRAPATICIDAS: TOXICOLOGIA, RESÍDUOS E ALTERNATIVAS.**

Cecília José Veríssimo

Pesquisadora do Instituto de Zootecnia/Nova Odessa/SP