

**DÉBORA PEDROLO PARISI**

***INFLUÊNCIA DO ESTRESSE EM RATOS JOVENS TRATADOS COM  
IVERMECTINA: ESTUDOS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS***

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

**Orientador: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten**

**SÃO PAULO**

**2017**

Parisi, Débora Predrolo

Influência do estresse em ratos jovens tratados com Ivermectina: estudos comportamentais e bioquímicos / Débora Pedrolo Parisi. – 2017.

61 f. : il. + CD-ROM.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2017.

Área de concentração: Modelos experimentais em patologia e toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten.

1. Avermectinas. 2. Período pré-púbere. 3. Ansiedade. 4. Corticosterona. 5. Monoaminas. I. Kirsten, Thiago Berti (orientador). II. Título.

**DÉBORA PEDROLO PARISI**

**INFLUÊNCIA DO ESTRESSE EM RATOS JOVENS TRATADOS COM  
IVERMECTINA: ESTUDOS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS**

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) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr.(a) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr.(a) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr.(a) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr.(a) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento \_\_\_\_\_

## PREFÁCIO

Este volume refere-se à tese de doutorado apresentada como requisito para a defesa de doutorado perante a Banca Examinadora no Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista.

Segundo as normas do Programa, este trabalho é apresentado na forma de artigo científico de autoria do aluno e organizado de acordo com as exigências do veículo de publicação científica escolhido.

O periódico escolhido para a submissão foi o ***Brain Research***, Elsevier, ISSN: 0006-8993, sendo o título do manuscrito: *“Therapeutical doses of ivermectin and its association with stress disrupt motor and social behaviors of juvenile rats via serotonergic and dopaminergic pathways”*.

*Os filhos são as maiores riquezas que podemos ter na vida. A partir do momento que Deus me deu o privilégio de ser sua mãe, aprendi o que é ter um pedaço meu vivendo em outro corpo. Dedico este trabalho ao meu bem maior, meu filho Eduardo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten, pela dedicação, orientação, paciência e enorme colaboração durante todas as etapas do doutorado.

Ao Satiro Alves Ribeiro, estudante de IC, e a Danilo Cabral, mestrando, pela colaboração durante os protocolos experimentais.

À Universidade Paulista, que disponibilizou suas instalações, laboratórios e estrutura geral, onde os experimentos foram realizados. Também aos funcionários da Universidade, em especial aos técnicos Wilton e Anderson.

À Dra. Nicolle Queiroz-Hazarbassanov, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), pelo auxílio nas análises por ELISA das amostras de plasma.

Ao Professor Dr. Jorge Camilo Flório, da FMVZ-USP, pelo auxílio nas análises neuroquímicas.

À Profa. Dra. Cláudia Mori, da FMVZ-USP, pela colaboração com os animais de laboratório.

À Profa. Dra. Maria Martha Bernardi do Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, pelas ideias na construção e execução do projeto.

Agradeço a Deus, por tudo que faz e tem feito na minha vida.

A meu marido Leonardo, por sua dedicação, pela espera paciente nos momentos de ausência, por toda a sua capacidade de compreensão, por sua confiança em mim, enfim, pela sua presença em minha vida.

Aos meus amados pais, Maria José e Bruno, por sempre terem me apoiado, acreditando no meu potencial. Obrigada por me ensinarem a não desistir dos meus sonhos, por acreditarem em mim e por compartilharem de muitas das minhas angústias e conquistas.

Aos meus irmãos Adriana e Guilherme, parceiros de vida.

Aos meus sogros Maria de Lourdes e Sergio por me apoiarem e auxiliarem sempre.

Aos amigos queridos, que, com palavras de amor e incentivo, renovaram as minhas energias me encorajando a seguir em frente, especialmente aos queridos amigos desta jornada, Thaís Bandouk Ogassawara e Flávio Buratti.

Aos ratos, por meio dos quais se puderam obter os dados deste trabalho. Eles permitiram o avanço de mais um degrau no conhecimento da ciência.

## RESUMO

A ivermectina é um dos antiparasitários mais utilizados no mundo. Nosso grupo tem revelado diversos prejuízos comportamentais e neuroquímicos induzidos pelo tratamento de ratos adultos com doses terapêuticas de ivermectina. Os efeitos nos jovens são desconhecidos, embora ela venha sendo prescrita para jovens humanos, pets e animais de criação, os quais ainda apresentam notável desenvolvimento e podem ser mais susceptíveis a intervenções medicamentosas. Foram estudados os efeitos comportamentais e neuroquímicos de duas doses terapêuticas (0,2 e 1,0 mg/kg) de ivermectina em ratos jovens. O fator estresse também foi estudado, já que ele é subestimado nas prescrições médicas. As duas doses de ivermectina induziram hiperatividade nos ratos, sendo o efeito da dose maior mais marcante. A associação de 1,0 mg/kg de ivermectina com o estresse induziu hipolocomoção nos ratos. A dose de 1,0 mg/kg de ivermectina associada ou não ao estresse exacerbou a socialização dos ratos jovens. A ivermectina não afetou nem os níveis de ansiedade, nem os níveis de corticosterona dos ratos. Os achados comportamentais motores e exploratórios induzidos após a associação da ivermectina com o estresse parecem ter sido desencadeados pelo aumento na atividade do sistema serotoninérgico estriatal. A associação da ivermectina com o estresse aumentou os níveis de dopamina estriatal, o que aumentou o comportamento (excessivo) de brincar social. Os resultados sugerem uma revisão no uso da ivermectina ou de sua dose prescrita durante a juventude de humanos e *pets*. O fator estresse deve ser considerado para as prescrições médicas, pois ele pode exacerbar os prejuízos comportamentais e neuroquímicos induzidos pelas doses terapêuticas de ivermectina.

**Palavras-chave:** Ivermectinas; período pré-púbere; ansiedade; comportamento de brincar; corticosterona; monoaminas.



## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>10</b> |
| <b>2. ARTIGO.....</b>  | <b>17</b> |
| <b>Highlights.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>Cover Page.....</b>   | <b>18</b> |
| <b>Abstract.....</b>   | <b>19</b> |
| <b>1. Introduction.....</b>  | <b>20</b> |
| <b>2. Results.....</b>   | <b>22</b> |
| <b>3. Discussion.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>4. Conclusion.....</b>  | <b>37</b> |
| <b>5. Experimental Procedure.....</b>  | <b>38</b> |
| 5.1 <i>Ethics statement.....</i>   | 38        |
| 5.2 <i>Animals.....</i>  | 38        |
| 5.3 <i>Treatments and groups.....</i>  | 39        |
| 5.4 <i>Restraint stress.....</i>   | 40        |
| 5.5 <i>Open-field behavior.....</i>  | 40        |
| 5.6 <i>Light-dark behavior.....</i>  | 41        |
| 5.7 <i>Play behavior.....</i>  | 41        |
| 5.8 <i>Corticosterone levels.....</i>  | 42        |
| 5.9 <i>Monoamine and turnover in the striatum.....</i>                             | 43        |
| 5.10 <i>Statistical analysis.....</i>  | 43        |
| <b>Acknowledgements.....</b>   | <b>44</b> |
| <b>Declaration of Conflicting Interests.....</b>                                   | <b>44</b> |
| <b>Author Contributions.....</b>   | <b>44</b> |
| <b>References.....</b>   | <b>45</b> |
| <b>Figure Legends.....</b>   | <b>55</b> |
| <b>Supplementary material.....</b>   | <b>57</b> |
| <b>3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>  | <b>59</b> |
| <b>ANEXO: Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....</b> | <b>60</b> |
| <b>ANEXO: Declaração de revisão ortográfica e gramatical.....</b>                  | <b>61</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

As avermectinas e milbemicinas, muitas vezes também referidas como lactonas macrocíclicas, descobertas em 1975, são os medicamentos antiparasitários mais vendidos no mundo (Merola and Eubig, 2012). São produtos de fermentação natural do actinomicete *Streptomyces avermitilis*, encontrados no solo, sendo altamente lipofílicos, pouco solúveis em água, mas facilmente solúveis em solventes orgânicos (Campbell, 2012). A partir da década de 1980, as avermectinas começaram a ser utilizadas como anti-helmínticos. Em 1985, a abamectina foi lançada como antiparasitário e inseticida (Taylor, 2001).

Eficientes parasiticidas, as avermectinas são capazes de matar ampla variedade de artrópodes ectoparasitas e nematoides endoparasitas, e ainda assim considerado com alta margem de segurança (Campbell, 2012; Merola and Eubig, 2012). São amplamente utilizados para saúde animal, na medicina veterinária tanto para animais domésticos, como para selvagens, na agricultura, por exemplo, para o controle de infestações por pragas, e na medicina humana, em infecções, ou, por exemplo, para os tratamentos de filariose linfática, da oncocercose e da sarna (Omura, 2008; Yoon et al., 2004).

As avermectinas atuam como agonistas de alta afinidade sobre a subunidade alfa de canais iônicos seletivos ao cloro presentes no parasito (2005). Nos invertebrados o ligante a estes canais iônicos é o glutamato, sendo os receptores denominados GluCl. Estes receptores estão localizados em células musculares somáticas. O canal de cloro é aberto, aumentando a condução intracelular do neurotransmissor, alterando a membrana do neurônio, hiperpolarizando-a, resultando na paralisia motora do tipo flácida e eliminação do parasito. Nos nematódeos, a interferência na transmissão dos impulsos nervosos ocorre entre células nervosas, enquanto nos artrópodes acontece entre células nervosas e musculares. Nos invertebrados, os sítios de ligação para as avermectinas estão localizados no tecido periférico,

enquanto nos mamíferos estes sítios estão confinados no sistema nervoso central (Wolstenholme and Rogers, 2005).

Em mamíferos, as avermectinas se ligam aos receptores GABAA (canais cloro-mediados pelo ácido gama-aminobutírico tipo A) (Sieghart, 2006). O GABA é um neurotransmissor inibitório que atua na regulação da excitabilidade dos neurônios do encéfalo (Watanabe et al., 2002). Olsen e Snowman (1985) sugerem que as avermectinas atuam em um sítio receptor separado no complexo GABA receptor. Em estudo comparativo entre a avermectina B1a e moduladores de receptores GABAérgicos em membranas neuronais, Pong et al. (Pong et al., 1982) sugerem que os sítios para a 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 daqueles da picrotoxina e barbituratos. Além destes estudos envolvendo as avermectinas com a ativação do receptor GABAérgico, outras evidências mostram que estes medicamentos além de interagir diretamente com sítios receptores do GABA, podem causar aumento na liberação de GABA (Pong et al., 1980).

Atualmente, tem-se disponível no comércio as seguintes ivermectinas: Ivermectina, 22,23-diidroavermectina B1a (>80%) e 22,23-diiforavermectina B1b (<20%); Doramectina, 25-ciclohexil-5-0-dimetil-25-de(1-metilpropil) avermectina A1a; Eprionmectina, 4''-epi-acetilamino-4''-deoxi-avermectina B1; e Selamectina, -ciclohexil-525-de(1-metilpropil)-5deoxi-22,23-diidro-5(hidroximino)-avermectina B1 (Shoop et al., 1995).

A utilização da ivermectina é aprovada para o controle parasitário em muitas espécies animais como cavalos, gatos e cães, e, inclusive, para humanos, com poucas restrições, como é o caso das lactantes (Campbell, 2012; Omura and Crump, 2014). Embora o envenenamento por ivermectina tenha sido relatado em algumas espécies animais devido ao uso inadvertido ou abusivo do produto, o maior consenso em relação à toxicidade ocorre em cães da raça

Collie, que são mais sensíveis a esta droga e em animais jovens, uma vez que nestes animais a barreira hematoencefálica ainda é muito permeável (Paul et al., 1987).

Porém, ao contrário do que vem sendo veiculado como as avermectinas sendo um grupo de medicamento com alta margem de segurança, estudos de nosso grupo têm revelado que mesmo doses terapêuticas podem acarretar diversos prejuízos, incluindo a esfera comportamental, sexual e reprodutiva. Por exemplo, os tratamentos com moxidectina, doramectina ou ivermectina reduzem o comportamento sexual de ratos machos, sua ereção peniana e os níveis hipotalâmicos de GABA (Bernardi et al., 2011; Ferri et al., 2013; Rodrigues-Alves et al., 2008). Nas ratas fêmeas, a ivermectina também reduziu o comportamento sexual (Moreira et al., 2014). Além dos prejuízos sexuais, mostramos também que a ivermectina induz efeitos ansiolíticos e sedativos no labirinto em cruz elevado e no teste do conflito, de modo similar ao diazepam (Spinosa et al., 2002). Verificou-se que a doramectina apresenta tanto propriedades ansiolíticas como anticonvulsivantes (Spinosa et al., 2000). Deste modo, temos revelado que o uso das avermectinas está longe de ser considerado seguro, mesmo em administrações de doses terapêuticas.

Além disso, em um estudo experimental com ratas gestantes e lactantes, foi demonstrado que a exposição de doses altas de ivermectina, como 4 mg/kg diariamente durante quase toda a gestação e lactação causou 100% de letalidade de seus filhotes (Poul, 1988). Neste mesmo trabalho, os autores mostraram que doses inferiores, como 2 mg/kg, e/ou abreviação dos tratamentos diminuiu a mortalidade, porém, afetando também o desenvolvimento e o comportamento da prole. Por exemplo, revelou-se prejuízo do desenvolvimento comportamental e atividade geral (motora) nos recém-nascidos cujas mães foram tratadas com 1 mg/kg de ivermectina durante a gestação e a lactação (Poul, 1988).

Roedores recém-nascidos podem ser particularmente sensíveis à neurotoxicidade de ivermectina, pois suas barreiras hematoencefálicas ainda não estão totalmente formadas ao

nascimento e, portanto, a toxicidade exacerbada causada pela ivermectina pode não só ocorrer no período intrauterino, mas também no período da lactação (Campbell, 2012). Por exemplo, existe um estudo que demonstra que camundongos jovens desenvolveram convulsões e tremores e morreram após a administração de ivermectina (Lankas et al., 1989). Porém, é preciso destacar que o citado trabalho avaliou roedores bem mais jovens do que foi o objeto do presente estudo, bem como com administrações repetidas. Aliás, a barreira hematoencefálica em ratos só se desenvolve completamente após o dia de vida pós-natal (PND) 24 (Schulze and Firth, 1992).

Por todos estes estudos realizados pelo nosso e outros grupos, fica claro que as avermectinas podem ser prejudiciais ao indivíduo medicado, mesmo em doses terapêuticas, ao contrário do que se acreditava. Nossos estudos, com doses terapêuticas, até agora focaram nos indivíduos adultos, porém, não se sabe os efeitos em jovens, ainda em desenvolvimento. O organismo do paciente jovem ainda apresenta notável desenvolvimento e maturação pós-natal, incluindo os sistemas nervoso, reprodutivo, pulmonar, esquelético, imune, renal e metabólico (Bruckner, 2000; Dourson et al., 2002; Ginsberg et al., 2002; Scheuplein et al., 2002). Por exemplo, o sistema nervoso começa a se formar cedo na gestação e continua a se desenvolver por toda a adolescência. Já o sistema imune só se desenvolve substancialmente após o parto. As diferenças cinéticas entre neonatos/jovens para adultos incluem diferenças na absorção, distribuição, metabolismo e eliminação, bem como reduzida capacidade de ligação das proteínas plasmáticas (Baldrick, 2004). As consequências destas diferenças são que os jovens podem biotransformar drogas em taxas diferentes em comparação com os adultos, inclusive com potencial de sobredosagem e eventos adversos (Baldrick, 2004; Dourson et al., 2002). Exemplos "bem estabelecidos" do efeito tóxicos de drogas em jovens que não ocorrem geralmente em adultos devido às diferenças de metabolismo incluem a síndrome do bebê cinzento pelo uso do antibiótico cloranfenicol, e icterícia pelo uso do diazepam (Bruckner,

2000; Scheuplein et al., 2002). Portanto, o indivíduo jovem que ainda está em fase de desenvolvimento e maturação, pode ser mais susceptível a intervenções medicamentosas.

Por falar nisso, há muitos anos a ivermectina vem sendo prescrita tanto para jovens humanos, como para jovens pets e animais de criação, sem relatarmos efeitos adversos relevantes (Campbell and Benz, 1984; Gilmore, 2011; Omura and Crump, 2014; Pacque et al., 1990). Por exemplo, a administração oral de uma única dose de ivermectina é considerada eficaz contra a sarna em humanos, inclusive para jovens, sendo também utilizada anualmente no tratamento em massa de milhões de pessoas com oncocercose e filariose (Gilmore, 2011; Lawrence et al., 2005). Inclusive, históricos de segurança sugerem que crianças podem ser medicadas, sendo indicado o uso de um comprimido de 3 mg cortado ao meio em crianças com peso corporal abaixo de 7,5 kg (Lawrence et al., 2005). Portanto, no geral, a comunidade científica considera que os dados clínicos são insuficientes para determinar efeitos adversos relevantes em crianças.

Além do fato de a ivermectina estar sendo usada aparentemente de modo inadvertido e pouco criterioso nos jovens, soma-se a isso o fator estresse. A ivermectina tem sido prescrita sem preocupações com contextos estressores, que podem interferir, inclusive potencializando os efeitos de drogas. Por exemplo, o estresse pré-natal potencializa o comportamento epilético induzido por pilocarpina em ratos jovens (Sadaghiani and Saboory, 2010). Neste sentido, a interação com variáveis ambientais pode exacerbar a toxicidade às avermectinas, dentre as quais se destaca o estresse.

Estudos comportamentais em animais de laboratório têm sido amplamente utilizados na pesquisa como ferramenta para os mais diversos fins, incluindo busca por tratamento para doenças e de transtornos mentais e o entendimento dos mecanismos centrais (sistema nervoso central) envolvidos com essas condições (Hanell and Marklund, 2014; McGonigle, 2014). A partir da famosa viagem com o Beagle na década de 1830, Charles Darwin é considerado

como sendo o fundador da pesquisa comportamental (Thierry, 2010). Desde então, diversos cientistas proeminentes como Ivan Pavlov, Karl von Frisch, Konrad Lorenz, Nikolaas Tinbergen e Burrhus Frederic Skinner vêm trazendo contribuições inquestionáveis, passando da ciência básica até a clínica (Hanell and Marklund, 2014).

O teste comportamental da avaliação da atividade geral em campo aberto possui diversas extrapolações, mas sem dúvida se destaca pelo estudo de comportamentos motores e exploratórios a partir da exposição do animal a um ambiente novo inescapável (Patti et al., 2005; Walsh and Cummins, 1976). O teste foi criado por Calvin Hall em 1934 (Walsh and Cummins, 1976).

O teste de transição claro-escuro é utilizado comumente em roedores para avaliar o comportamento não condicionado tipo-ansioso, o qual se baseia em uma situação de conflito, ou seja, o conflito entre explorar novos ambientes, e, ao mesmo tempo, esquivar-se de espaços abertos e iluminados (Arrant et al., 2013). O teste foi desenvolvido por Crawley, em que se observou que drogas ansiolíticas aumentavam o número de vezes que o animal cruzava os dois compartimentos (Crawley, 1985).

Para animais que vivem em grupos, tais como os ratos, a interação social adequada requer um repertório complexo e bem organizado de comportamentos sociais. A maioria das espécies passa por um período cronológico no qual uma estimulação social específica é necessária para um desenvolvimento social subsequente adequado (Lore and Flannelly, 1977; Scott, 1962). A primeira interação social de ratos não direcionada à mãe é o comportamento de brincar, que se inicia no décimo oitavo dia pós-natal, com picos na quarta e quinta semana de vida, e diminui sem se extinguir durante a idade de maturidade sexual (Vanderschuren et al., 1997). O comportamento de brincar tem como função facilitar o desenvolvimento de um repertório social rico e flexível, podendo também ser considerado o desencadeador para o desenvolvimento social (Vanderschuren et al., 2016). O comportamento de brincar é

generalizado no reino animal; ainda que pareça não ter uma função direta óbvia, experimentos em laboratório têm mostrado evidências de que eles facilitam o desenvolvimento social, habilidades cognitivas, emocionais e motoras, em particular a habilidade de usar esta flexibilidade em um ambiente instável e imprevisível (Vanderschuren et al., 2016). Portanto, o estudo do comportamento de brincar denota o desenvolvimento social.

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da ivermectina no comportamento de ratos jovens, pois este medicamento vem sendo receitado para humanos e no meio veterinário mesmo durante o período pré-púbere. Foram avaliados a atividade geral em campo aberto, para estudos relacionados ao comportamento motor e exploratório, o teste de transição claro/escuro para avaliar o comportamento tipo-ansioso, uma vez que a ivermectina pode induzir efeito ansiolítico (Spinosa et al., 2002), e o comportamento de brincar, que denota o desenvolvimento social. Além disso, realizaram-se estudos neuroquímicos a fim de identificar os mecanismos centrais relacionados às alterações comportamentais encontradas. Por fim, foram estudados os níveis plasmáticos de corticosterona nesses ratos jovens, como biomarcador da atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (McEwen, 2000) (níveis de estresse), uma vez que, além dos estudos dos efeitos diretos da ivermectina em jovens, verificaram-se também seus efeitos em jovens expostos a uma situação de estresse.

É importante destacar que até o momento não foram encontrados estudos comportamentais e bioquímicos dos efeitos da ivermectina e do estresse em jovens. Os resultados deste estudo tem o potencial de sugerir uma revisão no uso desta substância durante o desenvolvimento do indivíduo, ou revisão de dose prescrita.



**Title: Therapeutical doses of ivermectin and its association with stress disrupt motor and social behaviors of juvenile rats via serotonergic and dopaminergic pathways**

### **Highlights**

We studied therapeutical doses of ivermectin and restraint stress in juvenile rats.

Ivermectin induced hyperlocomotion.

Ivermectin associated or not with stress facilitated socialization of rats.

Association of ivermectin and stress increased striatal serotonergic system activity.

Association of ivermectin with stress increased striatal dopamine levels.

**Therapeutical doses of ivermectin and its association with stress disrupt motor and social behaviors of juvenile rats via serotonergic and dopaminergic pathways**

**Short title: Ivermectin, stress, behavior and neurochemistry**

**Débora P. Parisi <sup>a</sup>, Satiro A. R. Santos <sup>a</sup>, Danilo Cabral <sup>a</sup>, Nicolle Queiroz-Hazarbassanov <sup>b</sup>, Jorge C. Flório <sup>b</sup>, Maria M. Bernardi <sup>a</sup>, Thiago B. Kirsten <sup>a\*</sup>,**

<sup>a</sup> Environmental and Experimental Pathology, Paulista University, Rua Dr. Bacelar, 1212, São Paulo, SP, 04026-002, Brazil

<sup>b</sup> Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, São Paulo, SP, 05508-270, Brazil

**\* Corresponding author:**

Thiago Berti Kirsten

Environmental and Experimental Pathology, Paulista University, UNIP

Rua Dr. Bacelar, 1212, São Paulo, SP, 04026-002, Brazil

Email: [thik@outlook.com](mailto:thik@outlook.com)

## **Abstract**

Ivermectin is one of the most widely used antiparasitic agents in the world. Studies from our group have revealed several behavioral and neurochemical impairments induced by therapeutic doses of ivermectin in adult rats. However, the effects on juveniles remain unknown. Ivermectin has been prescribed for juvenile humans, pets and farm animals, which still show remarkable development and postnatal maturation and may be more susceptible to drug interventions. Hence, we studied the behavioral and neurochemical effects of two therapeutical doses (0.2 and 1.0 mg/kg) of ivermectin in juvenile rats. As it is underestimated in prescriptions, the stress factor was also studied. Both therapeutic doses of ivermectin induced hyperlocomotion in juvenile rats; with a more pronounced effect from the higher dose. Association of 1.0 mg/kg ivermectin with stress induced hypolocomotion in rats. Ivermectin 1.0 mg/kg whether or not associated with stress exacerbated socialization of rats. Ivermectin did not affect anxiety or corticosterone levels of juvenile rats. The motor/exploratory behavioral findings induced by association of ivermectin and stress seem to be triggered after the increase in the striatal serotonergic system activity. Association of ivermectin with stress increased striatal dopamine levels, which increased (excessive) social play behavior. Our results suggest a review of the use of ivermectin or its prescribed dose for juvenile humans and pets. Moreover, it has been found that the stress factor should be considered for medical prescriptions, since it may exacerbate behavioral and neurochemical impairments induced by therapeutical doses of ivermectin.

**Keywords:** Avermectins; Prepubertal period; Anxiety; Play Behavior; Corticosterone; Monoamines.

## 1. Introduction

Avermectins and milbemycins, also known as macrocyclic lactone, are the most widely used antiparasitic agents in the world (Merola and Eubig, 2012). They are produced through fermentation by soil-dwelling actinomyces from the genus *Streptomyces* (Campbell, 2012). They are considered efficient parasiticides, including for a wide variety of arthropod ectoparasites and nematode endoparasites, but still safe for human and veterinary use (Campbell, 2012; Merola and Eubig, 2012). In human clinical practice, avermectins are used to treat, lymphatic filariasis, onchocerciasis, scabies, and other infections (Gonzalez et al., 2012). Likewise, they are used in veterinary medicine and agriculture, for example for the control of pest infestations (Omura, 2008; Yoon et al., 2004).

Avermectins exert their anthelmintic effects by binding to glutamate-gated chloride channels that are expressed on nematode neurons and pharyngeal muscle cells. Ivermectin, the first synthesized avermectin, is able to activate channel opening very slowly, but however, the opening is essentially irreversibly, leading to a very long-lasting hyperpolarization or depolarization of the neuron or muscle cell and blocking further function (Wolstenholme and Rogers, 2005). In vertebrates, avermectins can produce  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-mimetic effects by acting as agonists at GABA<sub>A</sub> receptors and stimulating GABA release (Campbell, 2012; Dawson et al., 2000). Mammals are considered less susceptible to the toxic effects of avermectins because GABA-mediated nerves occur only in the central nervous system, and avermectins do not readily cross the blood-brain barrier (Campbell, 2012). However, the most common side effects of avermectins in mammals are linked to their effects on GABAergic activation (Campbell, 2012).

The use of ivermectin is approved for parasitic control for humans and many other species, such as horses, cats, and dogs. There are few restrictions, among which for the dogs

Collie breed and during lactation (Campbell, 2012; Omura and Crump, 2014), due to the higher permeability of the blood-brain barrier (Paul et al., 1987). Studies from our group have revealed, though, that even therapeutic doses administered to health adult animals can lead to several behavioral, sexual, and reproductive impairments. For example, moxidectin, doramectin or ivermectin treatments reduce the sexual behavior of male rats, their penile erection, as well as their hypothalamic GABA levels (Bernardi et al., 2011; Ferri et al., 2013; Rodrigues-Alves et al., 2008). In female rats, ivermectin also reduce sexual behavior (Moreira et al., 2014). Moreover, ivermectin and doramectin induces anxiolytic and sedative effects (Spinosa et al., 2000; Spinosa et al., 2002). We have thus shown that the use therapeutic doses of avermectins is not safe for animals.

Our studies with therapeutic doses of avermectins have focused on adults; with the effects on juveniles unknown. Juvenile mammalian species still show remarkable development and postnatal maturation, including in the nervous, reproductive, pulmonary, skeletal, immune, renal and metabolic systems (Bruckner, 2000; Dourson et al., 2002; Ginsberg et al., 2002; Scheuplein et al., 2002). These peculiarities result in different rates of metabolization of drugs in organs, which may facilitate adverse effects (Baldrick, 2004; Dourson et al., 2002). Therefore, juveniles may be more susceptible to drug interventions. Incidentally, ivermectin has been prescribed for juvenile humans, pets, and farm animals (Campbell and Benz, 1984; Gilmore, 2011; Omura and Crump, 2014; Pacque et al., 1990).

The stress factor also seems to be underestimated. Ivermectin has been prescribed without concern for stressful contexts, which may interfere and enhance the effects of drugs. For example, prenatal stress increases pilocarpine-induced epilepsy behavior in juvenile rats (Sadaghiani and Saboory, 2010). In this sense, the interaction with environmental variables may exacerbate the toxicity of avermectins.

We aimed to study the effects of ivermectin on the behavior of juvenile rats. We evaluated the open-field behavior, for motor/exploratory studies (Patti et al., 2005; Walsh and Cummins, 1976). Light-dark test was used to study anxiety-like behavior (Campos et al., 2013), because ivermectin may induce anxiolytic effect (Spinosa et al., 2002). Play behavior test was performed to study social development and social interactions (Vanderschuren et al., 2016). Neurochemical studies (monoamine and turnover in the striatum) were performed in order to identify the central mechanisms related to the behavioral changes. Finally, we evaluated plasma levels of corticosterone, since it is considered as a biomarker of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activity, i.e., for stress levels (McEwen, 2000). We also exposed these rats to a stress event (restraint) to verify whether this variable may exacerbate the impairments of ivermectin in juvenile rats.

## **2. Results**

Both therapeutic doses of ivermectin induced hyperlocomotion in juvenile rats; with a more pronounced effect from the higher dose. Association of 1.0 mg/kg ivermectin with stress induced hypolocomotion in rats. Ivermectin 1.0 mg/kg whether or not associated with stress exacerbated socialization of rats. Ivermectin did not affect anxiety or corticosterone levels of juvenile rats. The motor/exploratory behavioral findings induced by association of ivermectin and stress seem to be triggered after the increase in the striatal serotonergic system activity. Association of ivermectin with stress increased striatal dopamine levels, which increased (excessive) social play behavior. Our results suggest a review of the use of ivermectin or its prescribed dose for juvenile humans and pets. Moreover, it has been found that the stress factor should be considered for medical prescriptions, since it may exacerbate behavioral and neurochemical impairments induced by therapeutical doses of ivermectin.

*Este volume de tese de doutorado apresenta somente o resumo dos principais resultados obtidos com este estudo. Para maiores detalhes, consultar a publicação em artigo científico, ou contatar o orientador deste estudo via e-mail: Prof. Dr. Thiago B. Kirsten, [thiago.kirsten@docente.unip.br](mailto:thiago.kirsten@docente.unip.br) ou [thik@outlook.com](mailto:thik@outlook.com)*

### **3. Discussion**

*Este volume de tese de doutorado apresenta somente as conclusões do trabalho, sem sua discussão. Para maiores detalhes, consultar a publicação em artigo científico, ou contatar o orientador deste estudo via e-mail: Prof. Dr. Thiago B. Kirsten, [thiago.kirsten@docente.unip.br](mailto:thiago.kirsten@docente.unip.br) ou [thik@outlook.com](mailto:thik@outlook.com)*

### **4. Conclusion**

In conclusion, both therapeutical doses of ivermectin (0.2 and 1.0 mg/kg) induced hyperlocomotion in juvenile rats; with a more pronounced effect from the higher dose. Association of 1.0 mg/kg of ivermectin with stress induced hypolocomotion in rats. Ivermectin 1.0 mg/kg associated or not with stress exacerbated socialization of rats. Ivermectin did not affect anxiety or corticosterone levels in juvenile rats. The motor/exploratory behavioral findings induced by association of ivermectin and stress seem to be triggered after the increase in the striatal serotonergic system activity. Association of ivermectin with stress increased striatal dopamine levels, which increased (excessive) social play behavior. Our results suggest a review of the use of ivermectin or its prescribed dose for juvenile humans and pets. Moreover, we showed that the stress factor should be considered

for medical prescriptions, because it may exacerbate behavioral and neurochemical impairments induced by therapeutical doses of ivermectin.

## **5. Experimental Procedure**

### *5.1 Ethics statement*

The present study was carried out in strict accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (NCR, 2011). The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Paulista University, Brazil (Permit Number: 346/15). All efforts were made to minimize suffering, reduce the number of animals used and utilize alternatives to *in vivo* techniques when available. The experiments were also performed in accordance with good laboratory practice protocols and quality assurance methods.

### *5.2 Animals*

A total of 42 Wistar juvenile male rats (*Rattus norvegicus*) of 28-31 days of age and weighing 46-83g at the beginning of the experiment from the School of Veterinary Medicine (University of São Paulo, São Paulo, Brazil) were used. They were housed in polypropylene cages (45.5 X 34.5 X 20 cm; maximum of 5 rats per cage) with microisolator system (Tecniplast, Buguggiate, Italy), controlled temperature ( $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and humidity (55–65%) with artificial lighting (12-hr light/12-hr dark cycle, lights on at 7:00 AM). The animals had free access to irradiated rodent chow (BioBase, Águas Frias, Brazil) and filtered water. Sterilized and residue-free wood shavings were used for animal bedding.



### *5.3 Treatments and groups*

Ivermectin (22,23-dihydroavermectin B1a [ $\geq 80\%$ ] and B1b [ $\leq 20\%$ ], Ivomec, Merck, Sharp & Dohme Farmacêutica e Veterinária do Brasil, Campinas, Brazil) were studied in two different subcutaneous (sc) therapeutical doses: 0.2 and 1.0 mg/kg (Dadarkar et al., 2007; Soll, 1989). Both doses had been previously studied by our group in adult rats, which induced sexual impairments (Bernardi et al., 2011; Moreira et al., 2014). Ivermectin solutions were prepared in a 0.9% saline (NaCl) solution plus a drop of Tween-80. Saline solution plus a drop of Tween-80 was also used as control solution (vehicle; sc). Each rat was treated with a 1 mL/kg solution. Each rat from all groups received a single saline or ivermectin injection on post-natal day (PND)28-29.

These rats were submitted or not to a restraint stress session 48h after the treatments, i.e., on PND30-31. Thus, we evaluated six groups (n = 7 rats per group): (1) Sal, rats that received saline solution; (2) Iver0.2, rats that received 0.2 mg/kg ivermectin; (3) Iver1.0, rats that received 1.0 mg/kg ivermectin; (4) Stress, rats that received saline solution and restraint stress; (5) Iver0.2+Str, rats that received 0.2 mg/kg ivermectin and restraint stress; (6) Iver1.0+Str, rats that received 1.0 mg/kg ivermectin and restraint stress.

Ivermectin treatments, stress session, and behavioral evaluations were all performed during, prepubertal period (PND28-29, PND30-31, and PND30-31, respectively), also known as juvenile rats (Horovitz et al., 2012; Quinn, 2005). At this age the blood-brain barrier in rats is considered completely developed (Schulze and Firth, 1992). All of the experiments were performed between 9:00 and 11:00 AM to minimize the effects of circadian rhythms.

### *5.4 Restraint stress*

Restraint stress is considered a simple and painless model of stress that does not cause any lasting impairment (Buynitsky and Mostofsky, 2009). It is considered a model of

psychological stress due to its similarity to the natural experience of confinement (Dhabhar and McEwen, 1996). The restraint stress apparatus consisted of plastic cylindrical restraint tubes (3.5 cm diameter, 10 cm length) for individual restraints that were fixed on a table with both ends closed and holes for the tail and ventilation. The tubes were designed in such a way as to prevent pain and compression. The rats were subjected to a single restraint session of 2 hours. A 2-hour session is considered sufficient to activate the HPA axis, and increase circulating corticosterone levels (Buynitsky and Mostofsky, 2009; Echeverry et al., 2004).

### *5.5 Open-field behavior*

Immediately after the end of the restraint stress session (PND30-31), rats were removed from the restraint tube and observed in an open-field arena to evaluate motor/exploratory behaviors (Patti et al., 2005; Walsh and Cummins, 1976). It consisted of a round arena (96 cm diameter, 29 cm high walls) that was painted gray with an acrylic washable cover and subdivided into 25 parts. Each rat was individually placed in the center of the apparatus, and the following parameters were evaluated over a period of 5 min: locomotion frequency (number of floor units entered with all four paws), rearing frequency (number of times the rodents stood on their hind legs), and fecal boli number. The testing room, which was isolated from the experimenter, was a small room with dim lighting. A video camera was placed above the arena to collect the data. The apparatus was washed with a 5% alcohol/water solution before placement of the animals to obviate possible biasing effects from odor cues left by a previous rat.

### *5.6 Light-dark behavior*

Immediately after the open-field test (PND30-31), rats were observed in a light-dark apparatus to evaluate anxiety-like behavior (Campos et al., 2013). This model is based on the

innate aversion of rodents to bright places, generating an inherent conflict between their exploratory drive to a novel place and their avoidance of the lit compartment (Campos et al., 2013; Crawley and Goodwin, 1980). The apparatus consisted of an acrylic box (80 cm length, 40 cm width, 30 cm high) containing two compartments (separated by a door measuring 13 x 8 cm): dark room with black walls and floor (34 cm length), and light room, with white walls and floor (44 cm length) and lit by a white fluorescent lamp (15W, 4100K). Each rat was individually placed in the center of the light room, facing the wall opposite the door. The following parameters were evaluated over a period of 5 min: dark side entry latency (s), total time (s) spent in the dark side, total time (s) spent in the light side, rearing frequency in the dark side, and rearing frequency in the light side. The testing room, which was isolated from experimenter, was a small room with dim lighting. A video camera was placed above the arena to collect the data. The apparatus was washed with a 5% alcohol/water solution before placement of the animals to obviate possible biasing effects from odor cues left by previous rat.

### *5.7 Play behavior*

Immediately after the light-dark test (PND30-31), rats were observed for their play behavior. The play behavior test was based on our previous studies (Kirsten et al., 2010; Kirsten et al., 2012; Kirsten et al., 2015). Briefly, on PND21, the rat pups from the six groups were weaned from their litters and kept isolated, i.e., maintaining one rat per polypropylene cages in the same conditions as explained above until PND30-31. The rationale behind the social isolation was to increase the motivation to initiate play behavior (Panksepp and Beatty, 1980). Play behavior was evaluated on PND30-31 because it has been shown to peak during this time (Pletnikov et al., 1999). For the evaluation, each isolated rat in the six groups was paired with a naïve male rat (i.e., without any treatment) that had previously been housed in a

group environment. The weight difference of the two rats (isolated and naïve-grouped) was up to 10 g. Each naïve rat was only used for one pairing. The testing room, which was isolated from experimenter, was a small room with dim lighting. A video camera placed above the cage was used to collect the data. A 5 min period was allowed for the animals to adapt to the testing room prior to matching. The naïve-grouped rat was always placed into the cage of the isolated rat, where the test was conducted; therefore, the isolates are also referred to as the residents, and the grouped rats are referred to as the intruders. Their behaviors were recorded for 10 min. The following parameters were measured only for the isolated rats: total time (s) with social interactions (including the time spent sniffing the intruder, the time spent following the intruder, the time spent crawling over/under the intruder, and the time spent pinning); pinning frequency (the number of times the resident rat laid on its back and showed its belly to the intruder, which mounted the resident from above to complete the social interaction); darting frequency (the number of times the resident moved rapidly towards, in parallel, or away from the intruder); and rearing frequency (the number of times the resident rat stood on its hind legs without interacting with the intruder). Social interaction considers both social investigations and play solicitations. Pinning is considered social play. Darts are considered play solicitations. Rearing is considered a non-social exploratory behavior (Pletnikov et al., 1999).

### *5.8 Corticosterone levels*

Immediately after the play behavior test (PND30-31), rats were decapitated, and trunk blood was collected in conical tubes that contained 10% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The samples were centrifuged (3.500 RPM, 15 min), and plasma was obtained. Corticosterone analysis was performed using enzyme-linked immunosorbent (ELISA) commercial kits in duplicate and according to the manufacturer's instructions. Corticosterone

levels were determined using an Arbor Assays kit (cat. no. K014-H, Ann Arbor, MI, USA). The results are expressed in ng/ml. Corticosterone is the most abundant circulating steroid secreted by rodents and is considered to be a good indicator of HPA axis activity in these species (McEwen, 2000).

#### *5.9 Monoamine and turnover in the striatum*

Together with the blood, brain from these rats was also collected. Monoamine and monoamine metabolite levels in the striatum (Paxinos and Watson, 1998) were measured using high-performance liquid chromatography (HPLC, Shimadzu, model Prominence, Kyoto, Japan). Tissue collection and preparation were previously described by our group (Soto et al., 2013). Serotonin (5-HT) and its metabolite 5-hydroxyindolacetic acid (5HIAA), dopamine (DA) and its metabolites 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) were measured. The HPLC system consisted of a C-18 column (Supelco, Sigma, St. Louis, MO, USA), an electrochemical detector (Decade, Antec Leyden, The Netherlands), and an integrator (Chromatopac, Shimadzu, Kyoto, Japan). DA and 5-HT turnovers (metabolite/neurotransmitter ratio) were also calculated. The detection limit was 10 ng/g. The coefficients of variation were less than 15%, and standard linear regression curve values were greater than 0.98.

#### *5.10 Statistical analysis*

Homogeneity and normality were verified using a Bartlett's or F test. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls's multiple comparison test was used to compare the parametric data among the six groups. Student's t-tests (unpaired, one-tailed) were used to compare the parametric data between the two groups. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. In all cases, the results were considered significant if  $p < 0.05$ .

## **Acknowledgements**

This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Universal no. 441580/2014-9, PQ/CNPq no. 303701/2014-5, and PIBIC/CNPq no. 13853612016-3) and Paulista University. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors are grateful to Wilton Pereira dos Santos (UNIP) for technical support.

## **Declaration of Conflicting Interests**

The authors declare that there is no conflict of interest.

## **Author Contributions**

Conceptualization: DPP MMB TBK.

Data curation: DPP SARS DC TBK.

Formal analysis: DPP SARS NQH JCF MMB TBK.

Funding acquisition: SARS MMB TBK.

Investigation: DPP SARS NQH JCF MMB TBK.

Methodology: DPP SARS DC NQH JCF MMB TBK.

Project administration: TBK.

Resources: SARS MMB TBK.

Supervision: MMB TBK.

Validation: TBK.

Visualization: DPP SARS DC NQH JCF MMB TBK.

Writing - original draft: DPP SARS TBK.

Writing - review & editing: DPP SARS DC NQH JCF MMB TBK.

## References

- Arrant, A.E., Schramm-Sapyta, N.L., Kuhn, C.M., 2013. Use of the light/dark test for anxiety in adult and adolescent male rats. *Behavioural Brain Research*. 256, 119-27.
- Baldrick, P., 2004. Developing drugs for pediatric use: a role for juvenile animal studies? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 39, 381-9.
- Bernardi, M.M., Kirsten, T.B., Spinoso, H.S., Manzano, H., 2011. Ivermectin impairs sexual behavior in sexually naive, but not sexually experienced male rats. *Research in Veterinary Science*. 91, 77-81.
- Bruckner, J.V., 2000. Differences in sensitivity of children and adults to chemical toxicity: the NAS panel report. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 31, 280-5.
- Buynitsky, T., Mostofsky, D.I., 2009. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 33, 1089-98.
- Campbell, W.C., Benz, G.W., 1984. Ivermectin: a review of efficacy and safety. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 7, 1-16.
- Campbell, W.C., 2012. History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 13, 853-65.
- Campos, A.C., Fogaca, M.V., Aguiar, D.C., Guimaraes, F.S., 2013. Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 35 Suppl 2, S101-11.

- Crawley, J., Goodwin, F.K., 1980. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 13, 167-70.
- Crawley, J.N., 1985. Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 9, 37-44.
- Dadarkar, S.S., Deore, M.D., Gatne, M.M., 2007. Comparative evaluation of acute toxicity of ivermectin by two methods after single subcutaneous administration in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 47, 257-60.
- Dawson, G.R., Wafford, K.A., Smith, A., Marshall, G.R., Bayley, P.J., Schaeffer, J.M., Meinke, P.T., McKernan, R.M., 2000. Anticonvulsant and adverse effects of avermectin analogs in mice are mediated through the gamma-aminobutyric acid(A) receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 295, 1051-60.
- Dhabhar, F.S., McEwen, B.S., 1996. Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. *Journal of Immunology*. 156, 2608-15.
- Dourson, M., Charnley, G., Scheuplein, R., 2002. Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity. II. Risk and regulation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 35, 448-67.
- Echeverry, M.B., Guimaraes, F.S., Del Bel, E.A., 2004. Acute and delayed restraint stress-induced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions. *Neuroscience*. 125, 981-93.
- Ferri, R., Todon, E.S.A.F., Cabral, D., Moreira, N., Spinosa, H.S., Bernardi, M.M., 2013. Doramectin reduces sexual behavior and penile erection in male rats. *Neurotoxicology and Teratology*. 39, 63-8.
- Gilmore, S.J., 2011. Control strategies for endemic childhood scabies. *PLoS One*. 6, e15990.



- Ginsberg, G., Hattis, D., Sonawane, B., Russ, A., Banati, P., Kozlak, M., Smolenski, S., Goble, R., 2002. Evaluation of child/adult pharmacokinetic differences from a database derived from the therapeutic drug literature. *Toxicological Sciences*. 66, 185-200.
- Gonzalez, P., Gonzalez, F.A., Ueno, K., 2012. Ivermectin in human medicine, an overview of the current status of its clinical applications. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 13, 1103-9.
- Hanell, A., Marklund, N., 2014. Structured evaluation of rodent behavioral tests used in drug discovery research. *Front Behav Neurosci*. 8, 252.
- Horovitz, O., Tsoory, M.M., Hall, J., Jacobson-Pick, S., Richter-Levin, G., 2012. Post-weaning to pre-pubertal ('juvenile') stress: a model of induced predisposition to stress-related disorders. *Neuroendocrinology*. 95, 56-64.
- Kirsten, T.B., Taricano, M., Maiorka, P.C., Palermo-Neto, J., Bernardi, M.M., 2010. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. *Neuroimmunomodulation*. 17, 240-251.
- Kirsten, T.B., Chaves-Kirsten, G.P., Chaible, L.M., Silva, A.C., Martins, D.O., Britto, L.R., Dagli, M.L., Torrao, A.S., Palermo-Neto, J., Bernardi, M.M., 2012. Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide. *Journal of Neuroscience Research*. 90, 1903-12.
- Kirsten, T.B., Chaves-Kirsten, G.P., Bernardes, S., Scavone, C., Sarkis, J.E., Bernardi, M.M., Felicio, L.F., 2015. Lipopolysaccharide Exposure Induces Maternal Hypozincemia, and Prenatal Zinc Treatment Prevents Autistic-Like Behaviors and Disturbances in the Striatal Dopaminergic and mTOR Systems of Offspring. *PLoS One*. 10, e0134565.

- Lankas, G.R., Minsker, D.H., Robertson, R.T., 1989. Effects of ivermectin on reproduction and neonatal toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 27, 523-9.
- Lawrence, G., Leafasia, J., Sheridan, J., Hills, S., Wate, J., Wate, C., Montgomery, J., Pandeya, N., Purdie, D., 2005. Control of scabies, skin sores and haematuria in children in the Solomon Islands: another role for ivermectin. *Bull World Health Organ*. 83, 34-42.
- Lore, R., Flannelly, K., 1977. Rat societies. *Scientific American*. 236, 106-11, 113-6.
- McEwen, B.S., 2000. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research*. 886, 172-189.
- McGonigle, P., 2014. Animal models of CNS disorders. *Biochemical Pharmacology*. 87, 140-9.
- Merola, V.M., Eubig, P.A., 2012. Toxicology of avermectins and milbemycins (macrocyclic lactones) and the role of P-glycoprotein in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 42, 313-33, vii.
- Moreira, N., Bernardi, M.M., Spinosa, H.S., 2014. Ivermectin reduces sexual behavior in female rats. *Neurotoxicology and Teratology*. 43, 33-8.
- NCR, 2011. National Research Council. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Vol., National Academies Press, Washington (DC).
- Olsen, R.W., Snowman, A.M., 1985. Avermectin B1a modulation of gamma-aminobutyric acid/benzodiazepine receptor binding in mammalian brain. *Journal of Neurochemistry*. 44, 1074-82.
- Omura, S., 2008. Ivermectin: 25 years and still going strong. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 31, 91-8.

- Omura, S., Crump, A., 2014. Ivermectin: panacea for resource-poor communities? *Trends in Parasitology*. 30, 445-55.
- Pacque, M., Munoz, B., Poetschke, G., Foose, J., Greene, B.M., Taylor, H.R., 1990. Pregnancy outcome after inadvertent ivermectin treatment during community-based distribution. *Lancet*. 336, 1486-9.
- Panksepp, J., Beatty, W.W., 1980. Social deprivation and play in rats. *Behavioral Neural Biology*. 30, 197-206.
- Patti, C.L., Frussa-Filho, R., Silva, R.H., Carvalho, R.C., Kameda, S.R., Takatsu-Coleman, A.L., Cunha, J.L., Abilio, V.C., 2005. Behavioral characterization of morphine effects on motor activity in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 81, 923-7.
- Paul, A.J., Tranquilli, W.J., Seward, R.L., Todd, K.S., Jr., DiPietro, J.A., 1987. Clinical observations in collies given ivermectin orally. *American Journal of Veterinary Research*. 48, 684-5.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Vol., Academic Press, San Diego.
- Pletnikov, M.V., Rubin, S.A., Vasudevan, K., Moran, T.H., Carbone, K.M., 1999. Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. *Behav Brain Res*. 100, 43-50.
- Pong, S.S., Wang, C.C., Fritz, L.C., 1980. Studies on the mechanism of action of avermectin B1a: stimulation of release of gamma-aminobutyric acid from brain synaptosomes. *Journal of Neurochemistry*. 34, 351-8.
- Pong, S.S., DeHaven, R., Wang, C.C., 1982. A comparative study of avermectin B1a and other modulators of the gamma-aminobutyric acid receptor . chloride ion channel complex. *Journal of Neuroscience*. 2, 966-71.

- Poul, J.M., 1988. Effects of perinatal ivermectin exposure on behavioral development of rats. *Neurotoxicology and Teratology*. 10, 267-72.
- Quinn, R., 2005. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*. 21, 775-7.
- Rodrigues-Alves, P.S., Lebrun, I., Florio, J.C., Bernardi, M.M., Spinosa Hde, S., 2008. Moxidectin interference on sexual behavior, penile erection and hypothalamic GABA levels of male rats. *Res Vet Sci*. 84, 100-6.
- Sadaghiani, M.M., Saboory, E., 2010. Prenatal stress potentiates pilocarpine-induced epileptic behaviors in infant rats both time and sex dependently. *Epilepsy Behav*. 18, 166-70.
- Scheuplein, R., Charnley, G., Dourson, M., 2002. Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity. I. Biological basis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 35, 429-47.
- Schulze, C., Firth, J.A., 1992. Interendothelial junctions during blood-brain barrier development in the rat: morphological changes at the level of individual tight junctional contacts. *Brain Res Dev Brain Res*. 69, 85-95.
- Scott, J.P., 1962. Critical periods in behavioral development. *Science*. 138, 949-58.
- Shoop, W.L., Mrozik, H., Fisher, M.H., 1995. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary Parasitology*. 59, 139-56.
- Sieghart, W., 2006. Structure, pharmacology, and function of GABAA receptor subtypes. *Advances in Pharmacology*. 54, 231-63.
- Soll, M.D., 1989. Use of ivermectin in laboratory and exotic mammals and in birds, fish, and reptiles. In *Ivermectin and Abamectin*. Vol., W.C. Campbell, ed.^eds. Springer-Verlag, New York, pp. 260-286.
- Soto, A.M., Kirsten, T.B., Reis-Silva, T.M., Martins, M.F., Teodorov, E., Florio, J.C., Palermo-Neto, J., Bernardi, M.M., Bondan, E.F., 2013. Single early prenatal

- lipopolysaccharide exposure impairs striatal monoamines and maternal care in female rats. *Life Sciences*. 92, 852-8.
- Spinosa, H.S., Gerenutti, M., Bernardi, M.M., 2000. Anxiolytic and anticonvulsant properties of doramectin in rats: behavioral and neurochemistic evaluations. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 127, 359-66.
- Spinosa, H.S., Stilck, S.R., Bernardi, M.M., 2002. Possible anxiolytic effects of ivermectin in rats. *Veterinary Research Communications*. 26, 309-21.
- Taylor, M.A., 2001. Recent developments in ectoparasiticides. *Veterinary Journal*. 161, 253-68.
- Thierry, B., 2010. Darwin as a student of behavior. *Comptes Rendus Biologies*. 333, 188-96.
- Vanderschuren, L.J., Niesink, R.J., Van Ree, J.M., 1997. The neurobiology of social play behavior in rats. *Neurosci Biobehav Rev*. 21, 309-26.
- Vanderschuren, L.J., Achterberg, E.J., Trezza, V., 2016. The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 70, 86-105.
- Walsh, R.N., Cummins, R.A., 1976. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull*. 83, 482-504.
- Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tamayama, T., Hayasaki, H., 2002. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *International Review of Cytology*. 213, 1-47.
- Wolstenholme, A.J., Rogers, A.T., 2005. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*. 131 Suppl, S85-95.
- Yoon, Y.J., Kim, E.S., Hwang, Y.S., Choi, C.Y., 2004. Avermectin: biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63, 626-34.

## Figure Legends

**Figure 1. Open-field behavior.** Effects of ivermectin (0.2 and 1.0 mg/kg) associated with stress on the open-field behaviors in juvenile male rats. Rats were treated with a single injection of ivermectin (Iver) or its vehicle (Sal) on PND28-29; 48h later they were submitted or not to a single restraint stress (Str) session (2h) and immediately observed for behaviors (n = 7 per group). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test). The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM.

**Figure 2. Light-dark behavior.** Effects of ivermectin (0.2 and 1.0 mg/kg) associated with stress on the light-dark behaviors in juvenile male rats. Rats were treated with a single injection of ivermectin (Iver) or its vehicle (Sal) on PND28-29; 48h later they were submitted or not to a single restraint stress (Str) session (2h) and immediately observed for behaviors (n = 7 per group). \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test). The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM.

**Figure 3. Play behavior.** Effects of ivermectin (0.2 and 1.0 mg/kg) associated with stress on the play behavior of juvenile male rats. Rats were treated with a single injection of ivermectin (Iver) or its vehicle (Sal) on PND28-29; 48h later they were submitted or not to a single restraint stress (Str) session (2h) and immediately observed for behaviors (n = 7 per group). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test). The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM.

**Figure 4. Serotonergic system.** Effects of ivermectin (0.2 and 1.0 mg/kg) associated with stress on striatal serotonergic neurotransmitter and metabolite levels (ng/g/wet tissue) and

turnover rates in juvenile male rats. Rats were treated with a single injection of ivermectin (Iver) or its vehicle (Sal) on PND28-29; 48h later they were submitted or not to a single restraint stress (Str) session (2h) and immediately observed for behaviors (n = 7 per group). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test). The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM.

**Figure 5. Dopaminergic system.** Effects of ivermectin (0.2 and 1.0 mg/kg) associated with stress on striatal dopaminergic neurotransmitter and metabolite levels (ng/g/wet tissue) and turnover rates in juvenile male rats. Rats were treated with a single injection of ivermectin (Iver) or its vehicle (Sal) on PND28-29; 48h later they were submitted or not to a single restraint stress (Str) session (2h) and immediately observed for behaviors (n = 7 per group). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test). The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM.

## Supplementary material

**S1 Table. Values of one-way analysis of variance of behaviors.** Effects of ivermectin (0.2 and 1.0 mg/kg) associated with stress on the statistical values of *F* and *p* of one-way analysis of variance of open-field, light-dark, and play behaviors in juvenile male rats. Rats were treated with a single injection of ivermectin (Iver) or its vehicle (Sal) on PND28-29; 48h later they were submitted or not to a single restraint stress (Str) session (2h) and immediately observed for behaviors (n = 7 per group).

|                                     | <i>F</i> | <i>p</i>      |
|-------------------------------------|----------|---------------|
| locomotion frequency                | 9.96     | < 0.0001 **** |
| rearing frequency                   | 1.24     | 0.3113        |
| fecal boli number                   | 1.39     | 0.2502        |
| dark side entry latency (s)         | 6.01     | 0.0004 ***    |
| dark side total time (s)            | 1.42     | 0.2396        |
| light side total time (s)           | 1.01     | 0.4251        |
| rearing frequency in the dark side  | 1.42     | 0.2396        |
| rearing frequency in the light side | 2.36     | 0.0596        |
| social interaction (s)              | 4.04     | 0.0052 **     |
| pinning frequency                   | 1.37     | 0.2602        |
| darts frequency                     | 7.71     | < 0.0001 **** |
| rearing frequency                   | 4.79     | 0.0019 **     |

\*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test).



**S2 Table. Values of one-way analysis of variance of biochemical parameters.** Effects of ivermectin (0.2 and 1.0 mg/kg) associated with stress on the statistical values of *F* and *p* of one-way analysis of variance of plasma corticosterone levels and striatal monoamine and metabolite levels (ng/g/wet tissue) and turnover rates in juvenile male rats. Rats were treated with a single injection of ivermectin (Iver) or its vehicle (Sal) on PND28-29; 48h later they were submitted or not to a single restraint stress (Str) session (2h) and immediately observed (n = 7 per group).

|                | <i>F</i> | <i>p</i>      |
|----------------|----------|---------------|
| corticosterone | 2.27     | 0.0645        |
| 5HT            | 7.01     | < 0.0001 **** |
| 5HIAA          | 8.01     | < 0.0001 **** |
| 5HIAA/5HT      | 3.56     | 0.0095 **     |
| DA             | 21.87    | < 0.0001 **** |
| DOPAC          | 5.84     | 0.0003 ***    |
| HVA            | 5.17     | 0.0009 ***    |
| DOPAC/DA       | 2.61     | 0.0387 *      |
| HVA/DA         | 3.39     | 0.0120 *      |

\* *p* < 0,05; \*\* *p* < 0.01; \*\*\* *p* < 0.001; \*\*\*\* *p* < 0.0001 (one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test).

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As duas doses terapêuticas de ivermectina (0,2 e 1,0 mg/kg) induziram hiperatividade nos ratos jovens, sendo o efeito da dose maior mais marcante.
- A dose de 1,0 mg/kg de ivermectina associada ao estresse induziu hipolocomoção nos ratos.
- A dose de 1,0 mg/kg de ivermectina associada ou não ao estresse exacerbou a socialização dos ratos jovens.
- A ivermectina não afetou nem os níveis de ansiedade, nem os níveis de corticosterona dos ratos jovens.
- Os achados comportamentais motores e exploratórios induzidos após a associação da ivermectina com o estresse parecem ter sido desencadeados após o aumento na atividade do sistema serotoninérgico estriatal.
- A associação da ivermectina com o estresse aumentou os níveis de dopamina estriatal, o qual aumentou o comportamento (excessivo) de brincar social.
- Nossos resultados sugerem uma revisão no uso da ivermectina ou de sua dose prescrita durante a juventude de humanos e *pets*.
- O fator estresse deve ser considerado para as prescrições médicas, pois ele pode exacerbar os prejuízos comportamentais e neuroquímicos induzidos pelas doses terapêuticas de ivermectina.

## CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 346/15 CEUA/UNIP, sobre o projeto de pesquisa intitulado “Influência do estresse em ratos jovens tratados com ivermectina: estudos comportamentais e bioquímicos, “Espécie utilizada: rato heterogênico - “ “Número de animais utilizados: 60 - “ sob a responsabilidade de “ THIAGO BERTI KIRSTEN e DÉBORA PEDROLO PARISI” , está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei Federal nº 11.794/08 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

Universidade Paulista, em São Paulo-SP, aos 20 dias do mês de maio de 2015.



Juliana Guizi  
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
Universidade Paulista – UNIP

## **REVISORES ORTOGRÁFICOS E GRAMATICAIS**

### **DECLARAÇÃO**

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

Título: *Influência do Estresse em Ratos Jovens Tratados com Ivermectina: Estudos Comportamentais e Bioquímicos*

Autoria: : *Débora Pedrolo Parisi*

Orientador(a): *Thiago Berti Kirsten*

Dados do Revisor(a)

Nome: *Marise Rauen Vianna*

RG: *1147428-4*

Telefone de contato: *(11) 9 9656-5121*

E-mail: *mariserv@hotmail.com*

Tipo de revisão:  Total  Parcial  
 Ortográfica  Gramatical  
 Formatação  Normatização  
 Inglês  Português

23 de novembro de 2017.



Assinatura do(a) Revisor(a)