

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

**IVERMECTINA IMPEDE DANOS TESTICULARES EM RATOS
JOVENS INDUZIDOS PELO ESTRESSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade
Paulista - UNIP, para a obtenção do título de Mestre em
Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação do
Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten

NATHALIA DE ANDRADE GALVÃO

**SÃO PAULO
2020**

NATHALIA DE ANDRADE GALVÃO

**IVERMECTINA IMPEDE DANOS TESTICULARES EM RATOS
JOVENS INDUZIDOS PELO ESTRESSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental

Orientador: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten

Coorientadora: Profa. Dra. Flora Cordeiro

SÃO PAULO

2020

Galvão, Nathalia de Andrade.

Ivermectina impede danos testiculares em ratos jovens induzidos pelo estresse / Nathalia de Andrade Galvão. - 2020.

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

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Flora Cordeiro

1. Avermectinas.
 2. Período pré-púbere.
 3. Doses terapêuticas.
 4. Estresse por contenção.
 5. Morfometria.
 6. Testosterona.
- I. Kirsten, Thiago Berti (orientador). II. Cordeiro, Flora (coorientadora). III. Título.

NATHALIA DE ANDRADE GALVÃO

**IVERMECTINA IMPEDE DANOS TESTICULARES EM RATOS
JOVENS INDUZIDOS PELO ESTRESSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Patologia Ambiental e Experimental da Universidade
Paulista - UNIP, para a obtenção do título de Mestre em
Patologia Ambiental e Experimental

Aprovado(a) em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof (a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof (a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof (a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento _____

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES/PROSUP, processo número 8882.365467/2019-01) - Código de Financiamento 001.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood”

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten; toda gratidão. Por toda disponibilidade, orientação, dedicação, apoio, competência, incentivo e a confiança que foi a mim depositada. Por ter despertado minha admiração e ser uma inspiração como professor e orientador. Por ter colaborado com meu crescimento profissional e senso crítico científico.

A Profa. Dra. Flora Cordeiro pela confiança e parceria desde a iniciação científica. Por ter me ensinado praticamente tudo que sei hoje sobre meu projeto. Por ser muito mais que uma coorientadora e uma grande amiga. Toda gratidão pelo apoio incentivo em momentos de dificuldade e apuros, sendo totalmente compreensiva e empática. Muito obrigada!

Aos coautores Dra. Débora Pedrolo Parisi e ao Satiro A. R. Santos, por a princípio terem me concedido a continuidade do projeto. Agradeço por suas colaborações ao projeto.

A Profa. Dra. Martha Bernardi por ser a idealizadora da linha de pesquisa e por estar sempre à disposição em colaborar. Gratidão pela dedicação, competência, humildade e inspiração.

As alunas do Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista: a mestrande Karina Eiko Kiataqui e Loren Silva Medeiros, pela amizade, pelos incentivos, conselhos, por terem se preocupado e o apoio necessário em momentos de dificuldade. Ao meu colega João Iosif Slobodticov pela grande parceira, amizade e ter estado junto desde o início em minha caminhada. Muito obrigada!

A Michelle Sanchez Correia Aguiar e a Dra. Cristiane Ribeiro Salmon, do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista, pela colaboração da obtenção de dados das análises bioquímicas de testosterona.

A Profa. Ivana Barbosa Sufreddini por ter doado o kit utilizado para as dosagens de testosterona e a aluna de pós-graduação deste programa Dra. Natalia Moreira, por ter compartilhado o kit e ter colaborado na execução do ensaio.

Ao Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan e a aluna de doutorado Carolina Cardoso Vieira, ambos do Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, pela colaboração com as análises morfométricas e com parte da discussão do projeto.

A Universidade Paulista pela infraestrutura disponibilizada para a realização dos experimentos, bem como pelos ótimos profissionais que me auxiliaram, em especial os técnicos Wilton e Anderson. E ao técnico Paulo Vedovato pela confecção das lâminas histológicas.

A CAPES/PROSUP pelo apoio financeiro durante toda a realização do trabalho.

Aos animais do biotério, os ratos Wistar, que foram os grandes protagonistas. Sem eles não conseguiríamos avançar e nem crescer cientificamente com tamanha qualidade.

Aos meus pais, pelo apoio, incentivo, por acreditarem no meu potencial e serem compreensivos pela ausência ou não estar ajudando como deveria. E ao Mauricio Yuji Shimabukuro que me disponibilizou seu computador para que eu pudesse desenvolver meu projeto e esteve ao meu lado me dando apoio em momentos de crises. Também aos meus amigos que me deram apoio e conforto nos momentos de instabilidade mental.

A filosofia e doutrina budista por ter deixado sua bela doutrina a humanidade, por me fazer refletir sobre o meu eu, melhorando meus condicionamentos mentais que causam a insatisfação, o descontentamento e o sofrimento. Me tornando mais otimista e praticando mais o hábito de se sentir grata pelas pequenas coisas.

O presente trabalho certamente não chegaria em sua fase final se estivesse nesta trajetória sozinha, dessa forma agradeço a todos que permaneceram ao meu lado nesta caminhada.

RESUMO

GALVÃO, N. A. **Ivermectina impede danos testiculares em ratos jovens induzidos pelo estresse.** 50 f. Orientação: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten. Dissertação (Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental) - Universidade Paulista, São Paulo, 2020

A ivermectina é um dos medicamentos antiparasitários mais utilizados na medicina veterinária e humana, sendo o tratamento considerado seguro. Porém, estudos de nosso grupo têm demonstrado que mesmo doses terapêuticas de ivermectina induzem diversos prejuízos, especialmente na esfera reprodutiva. Os jovens são mais susceptíveis à medicamentos durante fases do desenvolvimento. Ainda assim, jovens humanos e *pets* têm sido medicados com ivermectina. Considerando que os estudos com ivermectina realizados até hoje focam basicamente em danos nos adultos, é preciso aprofundar o entendimento dos processos patológicos envolvidos nos jovens. A variável estresse também deve ser levada em consideração, já que ela pode influenciar nos efeitos produzidos pela ivermectina. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar o testículo de ratos jovens expostos a doses terapêuticas de ivermectina e/ou estressados. Ratos Wistar machos no período pré-púbere foram tratados com 0,2 ou 1,0 mg/kg de ivermectina. Após 48h, esses ratos foram submetidos ou não a sessão de estresse (2h, contenção). Os testículos foram estudados quanto a parâmetros macroscópicos, microscópicos, estereológicos e histológicos, e os níveis plasmáticos de testosterona foram avaliados. As duas doses terapêuticas de ivermectina induziram poucos efeitos nos testículos e nos níveis de testosterona de ratos pré-púberes. Porém, o estresse por contenção prejudicou parâmetros morfométricos macroscópicos, microscópicos, estereológicos e histológicos do testículo: o estresse aumentou o peso testicular relativo, o diâmetro tubular, o diâmetro luminal, o índice de celularidade tubular, a densidade do volume intersticial, diminuiu a densidade do volume parenquimal e prejudicou a região intersticial (demonstrado pela intensa acidofilia e a presença de vários vacúolos). O tratamento prévio dos ratos jovens com doses terapêuticas de ivermectina impediu os danos morfométricos, estereológicos e histológicos testiculares induzidos pelo estresse. Concluindo, além de ser notável agente antiparasitário, a ivermectina impediu os danos testiculares em ratos jovens induzidos pelo estresse.

Palavras-chave: Avermectinas; Período pré-púbere; Doses terapêuticas; Estresse por contenção; Morfometria; Testosterona.

ABSTRACT

GALVÃO, N. A. **Ivermectin prevents stress-induced testicular damage in juvenile rats.** 50 p.
Advisor: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten. Master degree (Environmental and Experimental Pathology) -
Paulista University, São Paulo, 2020

Ivermectin is one of the most used antiparasitic drugs in veterinary and human medicine, and the treatment is considered safe. However, studies by our group have shown that therapeutic doses of ivermectin induce several impairments, especially in the reproductive sphere. Juveniles are more susceptible to drugs during developmental stages. Nevertheless, young humans and pets have been medicated with ivermectin. Considering that the studies carried out basically focus on impairments induced by ivermectin in adults, it is necessary to better understand the pathological processes involved in juveniles. The stress variable must also be considered, as it can influence the effects produced by ivermectin. Therefore, the objective of this study was to evaluate the testis of juvenile rats exposed to therapeutic doses of ivermectin and/or stressed. Male Wistar rats in the prepubertal period were treated with 0.2 or 1.0 mg/kg of ivermectin. Forty-eight hours later, these rats were submitted or not to a stress session (2h, restraint). The testicles were studied for macroscopic, microscopic, stereological, and histologic parameters, and plasma testosterone levels were measured. The two therapeutic doses of ivermectin induced few effects on testis and testosterone levels of prepubertal rats. However, the restraint stress impaired macroscopic, microscopic, and stereological morphometric parameters, as well as histology of the testis: stress increased the relative testicular weight, the tubular diameter, the luminal diameter, the tubular cellular index, the interstitial volume density, decreased the parenchymal volume density, and injured the interstitial area (shown by intense acidophilia and presence of several vacuoles). Previous treatment of juvenile rats with therapeutic doses of ivermectin prevented stress-induced testicular damages. In conclusion, in addition to be a remarkable antiparasitic agent, ivermectin prevented stress-induced testicular damages in juvenile rats.

Keywords: Avermectins; Prepubertal period; Therapeutic doses; Restraint stress; Morphometry; Testosterone.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Declaração de ética	17
3.2 Animais	17
3.3 Tratamentos, grupos e delineamento experimental	18
3.4 Estresse agudo por contenção.....	19
3.5 Avaliações testiculares	19
3.6 Avaliação dos níveis de testosterona	21
3.7 Análise estatística	21
4. RESULTADOS.....	23
4.1 Morfometria macroscópica	23
4.2 Morfometria microscópica	23
4.3 Estereologia microscópica	23
4.4 Análise histopatológica.....	23
4.5 Avaliação dos níveis de testosterona	23
5. DISCUSSÃO	24
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
REFERÊNCIAS	26
ANEXO: Certificado de Aprovação CEUA-UNIP	30

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As lactonas macrocíclicas, que incluem as avermectinas e milbemicinas, descobertas em 1975, são os medicamentos antiparasitários mais comercializados no mundo (MEROLA; EUBIG, 2012). Elas podem ser produzidas de modo semissintéticos ou como produtos de fermentação natural de actinomicetes do gênero *Streptomyces* (como *S. avermitilis*, *S. cyaneogriseu* e *S. hygroscopicus*) que podem ser encontrados no solo, sendo altamente lipofílicos, pouco solúveis em água, mas facilmente solúveis em solventes orgânicos (ALMEIDA; AYRES; SANTAREM; LAMBERT, 2017; CAMPBELL, 2012). A partir da década de 1980, as lactonas macrocíclicas começaram a ser utilizadas como anti-helmínticos. Em 1985, a abamectina foi lançada como antiparasitário e inseticida (TAYLOR, 2001).

Têm-se disponível no comércio diversas avermectinas e milbemicinas, tanto produtos biossintéticos, como produtos semissintéticos. Entre as avermectinas, destacam-se: **ivermectina**, 22,23-diidroavermectina B1a (>80%) e 22,23-diiforavermectina B1b (<20%); **abamectina**, avermectina B1a (>80%) e avermectina B1b (<20%); **doramectina**, 25-ciclohexil-5-O-dimetil-25-de(1-metilpropil) avermectina A1a; **eprionmectina**, 4"-epiacetilamino-4"-deoxi-avermectina B1; e **selamectina**, 25-ciclo-hexil-25-de(1-metilpropil)-5deoxi-22,23-di-hidro-5(hidroximino)-avermectina B1. As milbemicinas incluem: **milbemicina**, milbemicina A4 (80%) e milbemicina A3 (20%) -5-O-demetyl-28-deoxi-6,28-epoxi-25-(1-metiletil)-(6R,25R); e **moxidectina**, (6R, 23E, 25S) – 5-O-demetyl-28-deoxi-25-[(1E)-1,3-dimetil-1-butenil]-(metoximino) milbemicin 6,28-epoxi-23-B. Vale citar ainda a **emamectina** (4"-desoxi-4"-epi-(N-formilN-metil) amino-avermectina B1; a **nemadectina**, 23-(O-metiloxima); e a **milbemicina oxima**, 5-oxima e milbecina A4 e A3 (ALMEIDA; AYRES; SANTAREM; LAMBERT, 2017; CAMPBELL, 2012; MEROLA; EUBIG, 2012).

Eficientes parasiticidas, as avermectinas são capazes de eliminar ampla variedade de artrópodes ectoparasitas e nematoides endoparasitas, e ainda assim considerado com alta margem de segurança (CAMPBELL, 2012; MEROLA; EUBIG, 2012). São amplamente utilizados para saúde animal, na medicina veterinária tanto para animais domésticos, como para criação, 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; KIM; HWANG; CHOI, 2004).

As avermectinas atuam como agonistas de alta afinidade sobre a subunidade alfa de canais iônicos seletivos ao cloro presentes no parasito (WOLSTENHOLME; ROGERS, 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; ROGERS, 2005).

No organismo dos mamíferos também existe ação das avermectinas. Elas podem se ligar aos receptores GABAA (canais cloro-mediados pelo ácido gama-aminobutírico tipo A), resultando na liberação de GABA (SIEGHART, 2006). O GABA é um neurotransmissor inibitório que atua na regulação da excitabilidade dos neurônios do encéfalo (WATANABE; MAEMURA; KANBARA; TAMAYAMA *et al.*, 2002). As avermectinas podem atuar em mais de um sítio receptor no complexo GABA receptor, embora, no geral, os estudos consideram que a exposição do organismo mamífero às avermectinas seja segura, sem efeitos tóxicos agudos. Por exemplo, mesmo doses altas de ivermectina, como 10 e 15 mg/kg parecem causar somente vertigens e sonolência em ratos (TRAILOVIC; NEDELJKOVIC, 2011). Os mamíferos são menos suscetíveis aos efeitos tóxicos das avermectinas, pois elas não são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica intacta, sendo que os neurônios mediados por GABA ocorrem principalmente no sistema nervoso central (YANG, 2012). Porém, é preciso mencionar que a dose letal mediana (DL50) das avermectinas é relativamente baixa nos mamíferos (DAWSON; WAFFORD; SMITH; MARSHALL *et al.*, 2000). As avermectinas podem ainda potencializar a ação de receptores purinérgicos (ASATRYAN; POPOVA; PERKINS; TRUDELL *et al.*, 2010) e colinérgicos (BERTRAND; GOPALAKRISHNAN, 2007) no encéfalo, e apresentam efeito anticonvulsivante (DAWSON; WAFFORD; SMITH; MARSHALL *et al.*, 2000).

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; 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 muito jovens, uma vez

que nestes animais a barreira hematoencefálica ainda é muito permeável (PAUL; TRANQUILLI; SEWARD; TODD *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; KIRSTEN; SPINOSA; MANZANO, 2011; FERRI; TODON; CABRAL; MOREIRA *et al.*, 2013; RODRIGUES-ALVES; LEBRUN; FLORIO; BERNARDI *et al.*, 2008). Nas ratas fêmeas, a ivermectina também reduz o comportamento sexual (MOREIRA; BERNARDI; SPINOSA, 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; STILCK; BERNARDI, 2002). Verificou-se que a doramectina apresenta tanto propriedades ansiolíticas como anticonvulsivantes (SPINOSA; GERENUTTI; BERNARDI, 2000). Deste modo, temos revelado que o uso das avermectinas está longe de ser considerado seguro, mesmo em administrações de doses terapêuticas.

Nossos estudos, até agora focaram nos indivíduos adultos, porém, não se sabe os efeitos em jovens, ainda em desenvolvimento. O organismo do jovem apresenta notável desenvolvimento e maturação pós-natal, incluindo os sistemas nervoso, reprodutivo, pulmonar, esquelético, imune, renal e metabólico (BRUCKNER, 2000; DOURSON; CHARNLEY; SCHEUPLEIN, 2002; GINSBERG; HATTIS; SONAWANE; RUSS *et al.*, 2002; SCHEUPLEIN; CHARNLEY; DOURSON, 2002). Por exemplo, o sistema nervoso começa a se formar cedo na gestação e continua a se desenvolver por toda a adolescência. O sistema imune vai se desenvolvendo gradualmente durante a infância. As diferenças farmacocinéticas 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; CHARNLEY; SCHEUPLEIN, 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; CHARNLEY; DOURSON, 2002).

Portanto, o indivíduo jovem que ainda está em fase de desenvolvimento e maturação, pode ser mais susceptível a intervenções medicamentosas.

Aliás, há muitos anos a ivermectina vem sendo receitada tanto para jovens humanos, como para jovens *pets* e animais de criação, sem a divulgação de efeitos adversos relevantes (CAMPBELL; BENZ, 1984; GILMORE, 2011; OMURA; CRUMP, 2014; PACQUE; MUÑOZ; POETSCHKE; FOOSE *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; LEAFASIA; SHERIDAN; HILLS *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; LEAFASIA; SHERIDAN; HILLS *et al.*, 2005). Assim, no geral, a comunidade científica considera que os dados clínicos são insuficientes para determinar efeitos adversos relevantes em crianças. É preciso lembrar que ausência de evidências é diferente de evidências de ausência.

Porém, os poucos estudos experimentais envolvendo avermectinas e seus efeitos em fases de desenvolvimento têm apontado para um cenário menos animador. Em um estudo bastante antigo, foi demonstrado que a exposição de doses altas de ivermectina, como 4 mg/kg diariamente durante quase toda a gestação e lactação de ratas 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. 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 neonatos desenvolvem convulsões e tremores e morrem após administrações repetidas de ivermectina (LANKAS; MINSKER; ROBERTSON, 1989). Aliás, a barreira hematoencefálica em ratos só se desenvolve completamente após o dia de vida pós-natal (PND) 24 (SCHULZE; FIRTH, 1992).

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 receitada sem preocupações com contextos estressores, que podem interferir, inclusive potencializando os efeitos de drogas. Por exemplo, o estresse agudo por contenção induz ansiedade e aumenta o nível de malondialdeído (relacionado à peroxidação lipídica) em ratos tratados com óxido de nano-magnésio e óxido de nano-zinco. Ou seja, o estresse agudo aumenta a toxicidade das nanopartículas (TORABI; KESMATI; POURREZA; NAJAFZADEH VARZI *et al.*, 2018). Neste sentido, a interação com variáveis ambientais pode exacerbar a toxicidade às avermectinas, dentre as quais se destaca o estresse.

Por tudo citado até aqui, que o uso de avermectinas na medicina veterinária e humana tem sido considerado seguro, mas com o contraponto de nossos estudos, onde ficam demonstrados que mesmo administrações de doses terapêuticas resultam em diversos prejuízos, especialmente na esfera reprodutiva, é preciso aprofundar o entendimento dos processos patológicos envolvidos. Foi visto também que os estudos realizados até hoje focam basicamente nos danos nos adultos. Porém, os jovens são especialmente susceptíveis à medicamento durante fases de desenvolvimento. Ainda assim, jovens humanos e *pets* têm sido medicados com ivermectina. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar o testículo de ratos jovens expostos a doses terapêuticas de ivermectina. O período específico da juventude escolhido foi o pré-púbere, uma vez que os poucos estudos disponíveis na literatura focaram os danos em períodos mais iniciais (citados anteriormente), antes do completo desenvolvimento da barreira hematoencefálica em ratos. No período pré-púbere, onde a barreira hematoencefálica já está desenvolvida (SCHULZE; FIRTH, 1992), não existem estudos relatando danos centrais e reprodutivos. A variável estresse também foi incluída nos estudos, uma vez que poderia influenciar nos efeitos produzidos pela ivermectina. Os resultados deste estudo têm o potencial de sugerir uma revisão na dose prescrita de ivermectina para jovens e/ou seu período de tratamento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o testículo de ratos jovens expostos a doses terapêuticas de ivermectina e submetidos a estresse.

2.2 Objetivos específicos

- Tratar ratos jovens no período pré-púbere com duas doses terapêuticas de ivermectina;
- Submeter ratos jovens no período pré-púbere ao estresse psicológico por contenção;
- Avaliar o testículo de ratos jovens tratados com ivermectina e estressados quanto a parâmetros morfométricos macroscópicos (peso testicular relativo, volume total testicular, eixo transversal testicular e eixo longitudinal testicular);
- Avaliar o testículo de ratos jovens tratados com ivermectina e estressados quanto a parâmetros morfométricos microscópicos (diâmetro tubular, altura do epitélio tubular, diâmetro luminal tubular, índice de celularidade tubular e frequência de células de Leydig);
- Avaliar o testículo de ratos jovens tratados com ivermectina e estressados quanto a parâmetros estereológicos microscópicos (densidade volumétrica intersticial, densidade volumétrica parenquimal, volume intersticial e volume parenquimal);
- Realizar análise histopatológica no testículo de ratos jovens tratados com ivermectina e estressados;
- Avaliar o plasma de ratos jovens tratados com ivermectina e estressados quanto aos níveis de testosterona.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Declaração de ética

Os animais foram utilizados nesse estudo de acordo com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório da Universidade Paulista (CEUA-UNIP número 346/15). Essas diretrizes são baseadas nas normas do *National Institutes of Health* (Bethesda, MD). Os experimentos foram realizados de acordo com os protocolos de boas práticas de laboratório com métodos de garantia de qualidade. Todos os esforços possíveis foram realizados para minimizar o sofrimento dos animais.

3.2 Animais

Foram utilizados seis ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar adultos machos e doze ratas Wistar fêmeas obtidos do biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (São Paulo, SP). Esses ratos foram alojados no Biotério de Experimentação da Universidade Paulista (São Paulo, SP). Os ratos permaneceram em gaiolas-moradia (45,5 x 34,5 x 20 cm, até 4 por gaiola) com filtro na parte superior, em sistema de rack ventilado (Tecniplast, Buguggiate, VA, Itália), permitindo aeração e trocas de ar constante. As camas dessas gaiolas-moradia eram constituídas de maravalha (esterilizada e livre de resíduos). O ambiente possuía temperatura ($24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (entre 55% e 65%) controladas constantemente por sistema automatizado. O ciclo de luz também era automatizado, com luz artificial (12-horas claro/12-horas escuro; luzes ligadas às 7h00). Os animais tinham livre acesso a ração irradiada (específica para a espécie, BioBase, Águas Frias, SC, Brasil) e água filtrada.

Após sete dias nas condições de nosso biotério para aclimatação, os ratos e ratas adultos foram submetidos a procedimentos de acasalamento conforme protocolos anteriormente realizados em nossos laboratórios (KIRSTEN; CHAVES-KIRSTEN; CHAIBLE; SILVA *et al.*, 2012). As ninhadas padronizadas foram mantidas com suas progenitoras até o PND 21 conforme descrito anteriormente (KIRSTEN; CASARIN; BERNARDI; FELICIO, 2018), quando foram desmamadas e separadas por sexo nas mesmas condições que aquelas previamente descritas para os adultos.

Trinta e seis ratos machos jovens, PNDs 28-31, foram os sujeitos submetidos aos procedimentos experimentais descritos a seguir. Esses ratos jovens pesavam 58-83 g no início dos experimentos.

3.3 Tratamentos, grupos e delineamento experimental

Foram avaliadas duas doses terapêuticas de ivermectina (22,23-diidroavermectina B1a [$\geq 80\%$] e B1b [$\leq 20\%$], Ivomec, Merck, Sharp & Dohme Farmacêutica e Veterinária do Brasil, Campinas, Brasil): 0,2 e 1,0 mg/kg, via subcutânea (s.c.) (DADARKAR; DEORE; GATNE, 2007). Ambas as doses já foram estudadas previamente por nosso grupo, revelando-se indutoras de prejuízos sexuais em ratos (BERNARDI; KIRSTEN; SPINOSA; MANZANO, 2011; CORDEIRO; GONÇALVES; MOREIRA; SLOBODTICOV *et al.*, 2018; MOREIRA; BERNARDI; SPINOSA, 2014). A solução de ivermectina foi preparada em salina (NaCl) 0,9%, com a adição de uma gota de Tween-80. O grupo controle foi tratado com o veículo da ivermectina, isto é, uma gota de Tween-80 adicionada a solução salina 0,9%. Cada rato recebeu somente uma injeção (de 0,2 mg/kg de ivermectina, ou de 1,0 mg/kg de ivermectina, ou do veículo) no PND 28-29 sempre no volume de 1 mL/kg.

Quarenta e oito horas após as administrações de ivermectina ou salina (PND 30-31), esses ratos foram submetidos ou não a uma sessão de 2 horas de estresse por contenção, explicado no próximo item. Desse modo, foram estudados seis grupos ($n=6$ ratos/grupo). Os três primeiros grupos não foram submetidos a sessão de estresse: (1) SAL, administração de salina; (2) Iver0.2, administração de 0,2 mg/kg de ivermectina; e (3) Iver1.0, administração de 1,0 mg/kg de ivermectina. Os três últimos grupos foram tratados da mesma maneira, isto é, com salina, 0,2 e 1,0 mg/kg de ivermectina, respectivamente, e foram posteriormente submetidos a sessão de estresse por duas horas. Vinte minutos após a sessão de estresse, os ratos foram submetidos a eutanásia e seus testículos e o sangue foram coletados e estudados, conforme explicado nos próximos itens.

Tanto as administrações de ivermectina (PND 28-29), como as exposições ao estresse e as avaliações testiculares e plasmáticas (PND 30-31) foram realizadas no período pré-púbere dos ratos (HOROVITZ; TSOORY; HALL; JACOBSON-PICK *et al.*, 2012; QUINN, 2005). Nessa fase, a barreira hematoencefálica dos ratos já se apresenta completamente desenvolvida (SCHULZE; FIRTH, 1992).

3.4 Estresse agudo por contenção

O modelo de estresse por contenção é considerado simples, indolor e não causa debilitação duradoura (BUYNITSKY; MOSTOFSKY, 2009). É considerado um modelo de estresse psicológico por aproximar o animal a uma experiência de natureza de confinamento (DHABHAR; MCEWEN, 1996). Foram utilizados tubos cilíndricos plásticos (3,5 cm de diâmetro, 10 cm comprimento) para a contenção individual, com as extremidades possuindo orifícios que permitem a ventilação e a passagem da cauda do animal que não sofre dor nem compressão. No PND 30-31, os animais foram submetidos ao estresse agudo em uma única sessão com duração de duas horas, tempo suficiente para ativar o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA, também conhecido como eixo hipotálamo-hipófise-adrenal), provocando o aumento dos níveis circulantes de corticosterona (BUYNITSKY; MOSTOFSKY, 2009; ECHEVERRY; GUIMARAES; DEL BEL, 2004).

3.5 Avaliações testiculares

Vinte minutos após o término da sessão de estresse por contenção, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação, uma vez que seus encéfalos foram coletados para avaliações neuroquímicas (PARISI; SANTOS; CABRAL; QUEIROZ-HAZARBASSANOV *et al.*, 2019). O testículo esquerdo foi removido e fixado em solução de Bouin em volume de no mínimo trinta vezes o peso da peça anatômica, por um período total de 48 horas. Os testículos foram seccionados transversalmente após duas horas, para garantir uma penetração uniforme e eficaz do fixador. Após 24 horas da hemisseção transversal, foi realizada a aparagem e fragmentação das hemisseções (seção transversal dos polos testiculares) e submersão em fixador até completar às 48 horas. Após a fixação os testículos seccionados foram colocados em solução de álcool a 70%, xilol e posteriormente embebidos em parafina e cortados com 5 µm de espessura. As seções foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) e pelo método do Ácido Periódico e reativo de Schiff, com contra-coloração nuclear pela Hematoxilina de Harris (PAS+H) (CORDEIRO; GONÇALVES; MOREIRA; SLOBODTICOV *et al.*, 2018). Assim, foram obtidas as fotomicrografias para uma análise histopatológica, no qual, foram observados os estágios do ciclo do epitélio seminífero, bem como secções tubulares contendo de quatro a seis camadas concêntricas, características de células germinativas da espermatogênese, além da integridade dos túbulos seminíferos e das células de Leydig, tendo

como referencial o grupo controle. A descrição histopatológica contou com parecer de especialista na área e foram utilizadas as descrições de estágios da espermatogênese e das etapas da espermogênese em ratos encontrados na literatura (RUSSELL; ETTLIN; SINHA-HIKIM; CLEGG, 1993).

Os pesos corporais dos ratos e dos testículos foram avaliados e convertidos em peso relativo, isto é, peso testicular/100 g do peso corporal. Os eixos transversal (lateral-lateral) e longitudinal (céfalo-caudal) de cada testículo foram medidos com auxílio de paquímetro dotado de Vernier, possibilitando discriminação de 0,1mm. O volume total de cada testículo foi calculado através da formula de elipsoide: $V = 4/3.\pi.a.b^2$, no qual a é o semieixo longitudinal e b é o semieixo transversal.

As lâminas foram observadas com o auxílio de um microscópio óptico (Nikon Eclipse E 200 MV R, Tokyo, Japão) inicialmente com ampliação de 40 vezes, para observação geral do órgão. Em seguida, uma ampliação de 1000 vezes foi utilizada para uma análise mais detalhada da arquitetura do túbulo seminífero.

Foi efetuada a análise da morfometria linear dos túbulos seminíferos por determinação do diâmetro tubular, medidos a partir da lâmina basal até a lâmina basal no sentido oposto. Com o auxílio do programa computadorizado de análise de imagem Zen 2.3 lite (Carl Zeiss, Jena, Germany) também foram aferidos a altura do epitélio seminífero, a partir da lâmina basal até o início do lúmen tubular, bem como o diâmetro luminal (CORDEIRO; GONÇALVES; MOREIRA; SLOBODTICOV *et al.*, 2018). Dez campos por seção testicular de cada animal foram selecionados e fotografados. Cada campo tinha em média cinco túbulos seminíferos, portanto um total de 50 túbulos foram avaliados morfometricamente. Para cada animal, foram calculadas as médias das medidas indicadas (50 túbulos seminíferos) e a média de cada grupo também foi calculada. Assim, também foi medido o índice de celularidade dos túbulos e das células intersticiais (isto é, células de Leydig) coradas em HE ao longo de todo o campo.

A frequência das células de Leydig foi estimada independentemente do índice de celularidade em 10 fotomicrografias por testículo com áreas definidas, com o auxílio do programa computadorizado de análise de imagem Image J (National Institutes of Health). Para calcular as densidades de volume do parênquima testicular (túbulos seminíferos) e do tecido intersticial utilizou-se uma sobreposição de imagem de 25 pontos equidistantes sobre as fotomicrografias testiculares. Para cada animal de cada grupo, foram examinados 10 campos, com área definida, totalizando a contagem de 250 pontos por testículo. Tendo em mãos o volume testicular total (em milímetros cúbicos) e as densidades de volume (volumes em termos

percentuais) dos tecidos tubular e intersticial, foi possível calcular especificamente os volumes tubular e intersticial (em milímetros cúbicos) (OKADA; STUMPP; MIRAGLIA, 2020).

As avaliações testiculares e parâmetros estudados estão representados em uma ilustração esquemática para facilitar seu entendimento (Figura 1).

Em caráter didático, os parâmetros testiculares avaliados foram separados em quatro blocos para sua apresentação no item Resultados: (1) parâmetros morfométricos macroscópicos: peso testicular relativo, volume total testicular, eixo transversal testicular e eixo longitudinal testicular; (2) parâmetros morfométricos microscópicos: diâmetro tubular, altura do epitélio tubular, diâmetro luminal tubular, índice de celularidade tubular e frequência de células de Leydig; (3) parâmetros estereológicos microscópicos: densidade volumétrica intersticial, densidade volumétrica parenquimal, volume intersticial e volume parenquimal; e (4) análise histopatológica.

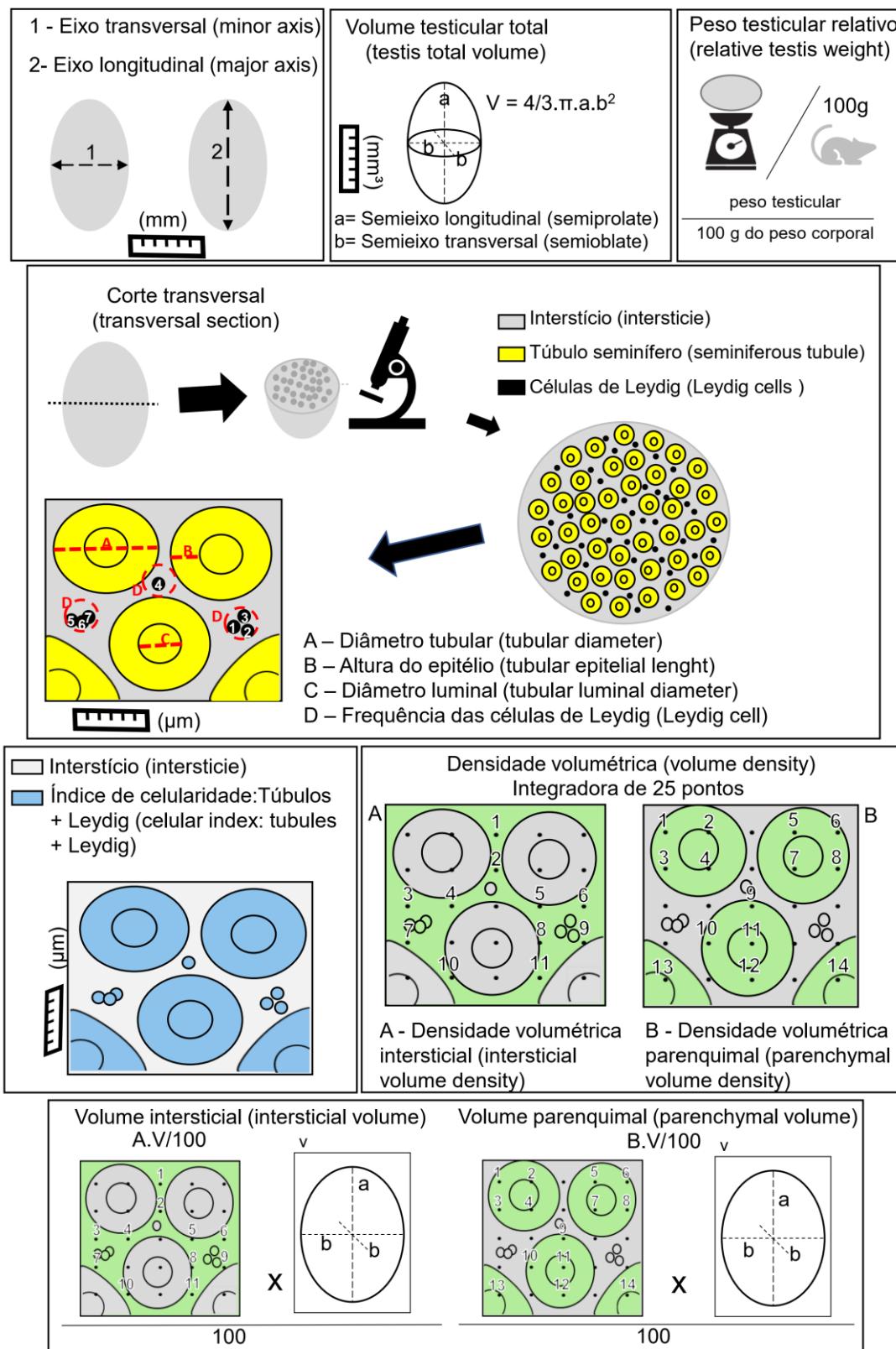
3.6 Avaliação dos níveis de testosterona

Os mesmos ratos utilizados para a análise testicular tiveram seu sangue do tronco coletado em tubos cônicos no momento da eutanásia. Amostras de plasma de cada rato foram obtidas de acordo com protocolos padronizados (MORAES; GALVAO; CABRAL; COELHO *et al.*, 2017). Os níveis séricos de testosterona foram analisados por ELISA seguindo as instruções do manual do fabricante (Cloud-Clone Corp, cat. no. HEA458Ge, Katy, TX, USA). Os resultados são expressos em pg/mL.

3.7 Análise estatística

Foram verificadas a homocedasticidade e a normalidade dos dados (testes de Bartlet e Kolmogorov-Smirnov). Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias (fatores: ivermectina e estresse), seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey para comparar dados paramétricos entre os seis grupos. O nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi considerado suficiente para mostrar diferenças significativas em todos os dados analisados. Os dados são expressos como média ± erro padrão (EP), com representação de *box & whiskers* (*min to max*) ou como porcentagens.

Figura 1 – Parâmetros testiculares. Esquema metodológico das avaliações testiculares e parâmetros estudados. Todos os parâmetros morfométricos macroscópicos, microscópicos e estereológicos relativos aos estudos testiculares estão descritos, incluindo as metodologias aplicadas para mensurar cada parâmetro e suas fórmulas, quando foi o caso. O nome de cada parâmetro em português é seguido pelo nome em inglês entre parênteses



Fonte: dos autores

4. RESULTADOS

As duas doses terapêuticas de ivermectina induziram poucos efeitos nos testículos e nos níveis de testosterona de ratos pré-púberes. Porém, o estresse por contenção prejudicou parâmetros morfométricos macroscópicos, microscópicos, estereológicos e histológicos do testículo: o estresse aumentou o peso testicular relativo, o diâmetro tubular, o diâmetro luminal, o índice de celularidade tubular, a densidade do volume intersticial, diminuiu a densidade do volume parenquimal e prejudicou a região intersticial (demonstrado pela intensa acidofilia e a presença de vários vacúolos). O tratamento prévio dos ratos jovens com doses terapêuticas de ivermectina impediu os danos morfométricos, estereológicos e histológicos testiculares induzidos pelo estresse. Concluindo, além de ser notável agente antiparasitário, a ivermectina impediu os danos testiculares em ratos jovens induzidos pelo estresse.

Este volume de Dissertação de Mestrado 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 ou thik@outlook.com

5. DISCUSSÃO

Este volume de Dissertação de Mestrado 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 ou thik@outlook.com

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluindo, as duas doses terapêuticas de ivermectina induziram poucos efeitos nos testículos e nos níveis de testosterona de ratos jovens pré-púberes. Porém, o estresse por contenção prejudicou parâmetros morfométricos macroscópicos, microscópicos, estereológicos e histológicos do testículo: o estresse aumentou o peso testicular relativo, o diâmetro tubular, o diâmetro luminal, o índice de celularidade tubular, a densidade do volume intersticial, diminuiu a densidade do volume parenquimal e prejudicou a região intersticial (demonstrado pela intensa acidofilia e a presença de vários vacúolos). O tratamento prévio dos ratos jovens com doses terapêuticas de ivermectina foi bastante eficiente em impedir os danos morfométricos, estereológicos e histológicos testiculares induzidos pelo estresse.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. A. O.; AYRES, M. C. C.; SANTAREM, V. A.; LAMBERT, S. Agentes antinematódeos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L., et al (Ed.). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2017. p. 563-577.
- ASATRYAN, L.; POPOVA, M.; PERKINS, D.; TRUDELL, J. R. et al. Ivermectin antagonizes ethanol inhibition in purinergic P2X4 receptors. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 334, n. 3, p. 720-728, Sep 1 2010.
- BALDRICK, P. Developing drugs for pediatric use: a role for juvenile animal studies? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 39, n. 3, p. 381-389, Jun 2004.
- BERNARDI, M. M.; KIRSTEN, T. B.; SPINOSA, H. S.; MANZANO, H. Ivermectin impairs sexual behavior in sexually naive, but not sexually experienced male rats. **Research in Veterinary Science**, 91, n. 1, p. 77-81, Aug 2011.
- BERTRAND, D.; GOPALAKRISHNAN, M. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. **Biochemical Pharmacology**, 74, n. 8, p. 1155-1163, Oct 15 2007.
- BRUCKNER, J. V. Differences in sensitivity of children and adults to chemical toxicity: the NAS panel report. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 31, n. 3, p. 280-285, Jun 2000.
- BUYNTSKY, T.; MOSTOFSKY, D. I. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 33, n. 7, p. 1089-1098, Jul 2009.
- CAMPBELL, W. C. History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 13, n. 6, p. 853-865, May 2012.
- CAMPBELL, W. C.; BENZ, G. W. Ivermectin: a review of efficacy and safety. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 7, n. 1, p. 1-16, Mar 1984.
- CORDEIRO, F.; GONÇALVES, V.; MOREIRA, N.; SLOBODTICOV, J. I. et al. Ivermectin acute administration impaired the spermatogenesis and spermiogenesis of adult rats. **Research in Veterinary Science**, 117, p. 178-186, 2018.
- DADARKAR, S. S.; DEORE, M. D.; GATNE, M. M. Comparative evaluation of acute toxicity of ivermectin by two methods after single subcutaneous administration in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 47, n. 3, p. 257-260, Apr 2007.
- DAWSON, G. R.; WAFFORD, K. A.; SMITH, A.; MARSHALL, G. R. et al. 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, n. 3, p. 1051-1060, Dec 2000.
- DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. **Journal of Immunology**, 156, n. 7, p. 2608-2615, Apr 1 1996.

DOURSON, M.; CHARNLEY, G.; SCHEUPLEIN, R. Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity. II. Risk and regulation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 35, n. 3, p. 448-467, Jun 2002.

ECHEVERRY, M. B.; GUIMARAES, F. S.; DEL BEL, E. A. Acute and delayed restraint stress-induced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions. **Neuroscience**, 125, n. 4, p. 981-993, 2004.

FERRI, R.; TODON, E. S. A. F.; CABRAL, D.; MOREIRA, N. *et al.* Doramectin reduces sexual behavior and penile erection in male rats. **Neurotoxicology and Teratology**, 39, p. 63-68, Sep-Oct 2013.

GILMORE, S. J. Control strategies for endemic childhood scabies. **PLoS One**, 6, n. 1, p. e15990, 2011.

GINSBERG, G.; HATTIS, D.; SONAWANE, B.; RUSS, A. *et al.* Evaluation of child/adult pharmacokinetic differences from a database derived from the therapeutic drug literature. **Toxicological Sciences**, 66, n. 2, p. 185-200, Apr 2002.

HOROVITZ, O.; TSOORY, M. M.; HALL, J.; JACOBSON-PICK, S. *et al.* Post-weaning to pre-pubertal ('juvenile') stress: a model of induced predisposition to stress-related disorders. **Neuroendocrinology**, 95, n. 1, p. 56-64, 2012.

KIRSTEN, T. B.; CASARIN, R. C.; BERNARDI, M. M.; FELICIO, L. F. Pioglitazone abolishes autistic-like behaviors via the IL-6 pathway. **PLoS One**, 13, n. 5, p. e0197060, 2018.

KIRSTEN, T. B.; CHAVES-KIRSTEN, G. P.; CHAIBLE, L. M.; SILVA, A. C. *et al.* Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide. **Journal of Neuroscience Research**, 90, n. 10, p. 1903-1912, Oct 2012.

LANKAS, G. R.; MINSKER, D. H.; ROBERTSON, R. T. Effects of ivermectin on reproduction and neonatal toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, 27, n. 8, p. 523-529, Aug 1989.

LAWRENCE, G.; LEAFASIA, J.; SHERIDAN, J.; HILLS, S. *et al.* Control of scabies, skin sores and haematuria in children in the Solomon Islands: another role for ivermectin. **Bulletin of the World Health Organization**, 83, n. 1, p. 34-42, Jan 2005.

MEROLA, V. M.; EUBIG, P. A. Toxicology of avermectins and milbemycins (macrocyclic lactones) and the role of P-glycoprotein in dogs and cats. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, 42, n. 2, p. 313-333, vii, Mar 2012.

MORAES, M. M.; GALVAO, M. C.; CABRAL, D.; COELHO, C. P. *et al.* Propentofylline Prevents Sickness Behavior and Depressive-Like Behavior Induced by Lipopolysaccharide in Rats via Neuroinflammatory Pathway. **PLoS One**, 12, n. 1, p. e0169446, 2017.

MOREIRA, N.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Ivermectin reduces sexual behavior in female rats. **Neurotoxicology and Teratology**, 43, p. 33-38, May-Jun 2014.

OKADA, F. K.; STUMPP, T.; MIRAGLIA, S. M. Carnitine Diminishes Etoposide Toxic Action on Spermatogonial Self-renewal and Sperm Production in Adult Rats Treated in the Prepubertal Phase. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 68, n. 5, p. 327-342, Mar 31 2020.

OMURA, S. Ivermectin: 25 years and still going strong. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 31, n. 2, p. 91-98, Feb 2008.

OMURA, S.; CRUMP, A. Ivermectin: panacea for resource-poor communities? **Trends in Parasitology**, 30, n. 9, p. 445-455, Sep 2014.

PACQUE, M.; MUÑOZ, B.; POETSCHKE, G.; FOOSE, J. *et al.* Pregnancy outcome after inadvertent ivermectin treatment during community-based distribution. **Lancet**, 336, n. 8729, p. 1486-1489, Dec 15 1990.

PARISI, D. P.; SANTOS, S. A. R.; CABRAL, D.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N. *et al.* Therapeutical doses of ivermectin and its association with stress disrupt motor and social behaviors of juvenile rats and serotonergic and dopaminergic systems. **Research in Veterinary Science**, 124, p. 149-157, Jun 2019.

PAUL, A. J.; TRANQUILLI, W. J.; SEWARD, R. L.; TODD, K. S., Jr. *et al.* Clinical observations in collies given ivermectin orally. **American Journal of Veterinary Research**, 48, n. 4, p. 684-685, Apr 1987.

POUL, J. M. Effects of perinatal ivermectin exposure on behavioral development of rats. **Neurotoxicology and Teratology**, 10, n. 3, p. 267-272, May-Jun 1988.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition**, 21, n. 6, p. 775-777, Jun 2005.

RODRIGUES-ALVES, P. S.; LEBRUN, I.; FLORIO, J. C.; BERNARDI, M. M. *et al.* Moxidectin interference on sexual behavior, penile erection and hypothalamic GABA levels of male rats. **Research in Veterinary Science**, 84, n. 1, p. 100-106, Feb 2008.

RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA-HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. **International Journal of Andrology** 16, n. 1, p. 83-83, 1993.

SCHEUPLEIN, R.; CHARNLEY, G.; DOURSON, M. Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity. I. Biological basis. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 35, n. 3, p. 429-447, Jun 2002.

SCHULZE, C.; FIRTH, J. A. Interendothelial junctions during blood-brain barrier development in the rat: morphological changes at the level of individual tight junctional contacts. **Brain Research. Developmental Brain Research**, 69, n. 1, p. 85-95, Sep 18 1992.

SIEGHART, W. Structure, pharmacology, and function of GABA_A receptor subtypes. **Advances in Pharmacology**, 54, p. 231-263, 2006.

- SPINOSA, H. S.; GERENUTTI, M.; BERNARDI, M. M. Anxiolytic and anticonvulsant properties of doramectin in rats: behavioral and neurochemistic evaluations. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology**, 127, n. 3, p. 359-366, Dec 2000.
- SPINOSA, H. S.; STILCK, S. R.; BERNARDI, M. M. Possible anxiolytic effects of ivermectin in rats. **Veterinary Research Communications**, 26, n. 4, p. 309-321, Jun 2002.
- TAYLOR, M. A. Recent developments in ectoparasiticides. **Veterinary Journal**, 161, n. 3, p. 253-268, May 2001.
- TORABI, M.; KESMATI, M.; POURREZA, N.; NAJAFZADEH VARZI, H. *et al.* Neurobehavioral and biochemical modulation following administration of MgO and ZnO nanoparticles in the presence and absence of acute stress. **Life Sciences**, 203, p. 72-82, 2018.
- TRAILOVIC, S. M.; NEDELJKOVIC, J. T. Central and peripheral neurotoxic effects of ivermectin in rats. **The Journal of Veterinary Medical Science**, 73, n. 5, p. 591-599, May 2011.
- WATANABE, M.; MAEMURA, K.; KANBARA, K.; TAMAYAMA, T. *et al.* GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. **International Review of Cytology**, 213, p. 1-47, 2002.
- WOLSTENHOLME, A. J.; ROGERS, A. T. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. **Parasitology**, 131 Suppl, p. S85-95, 2005.
- YANG, C. C. Acute human toxicity of macrocyclic lactones. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 13, n. 6, p. 999-1003, May 2012.
- YOON, Y. J.; KIM, E. S.; HWANG, Y. S.; CHOI, C. Y. Avermectin: biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 63, n. 6, p. 626-634, Feb 2004.



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

C E R T I F I C A D O

CERTIFICAMOS, que a proposta intitulada “Influência do estresse em ratos jovens tratados com ivermectina: estudos comportamentais e bioquímicos/ Influência do estresse em ratos jovens tratados com ivermectina: estudos testiculares” Espécie utilizada: rato heterogêneo “ “Número de animais utilizados: 60, registrada com o nº346 /15, sob-responsabilidade de” Thiago Berti Kirsten, Nathalia de Andrade Galvão e Débora Pedrolo Parisi” 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.

A handwritten signature in cursive script, which appears to read "Juliana Guizi".

Juliana Guizi

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