NATALIA MOREIRA

Influência da exposição à ivermectina na esfera sexual de ratos e ratas

São Paulo
2014

NATALIA MOREIRA

**Influência da exposição à ivermectina na esfera sexual de ratos
e ratas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa

São Paulo
2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2989
FMVZ

Moreira, Natalia

Influência da exposição à ivermectina na esfera sexual de ratos e ratas / Natalia Moreira. -- 2014.
91 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profª. Drª. Helenice de Souza Spinosa.

1. Avermectinas. 2. GABA. 3. Ivermectina. 4. Comportamento sexual. 5. Neurotransmissores. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência da exposição à ivermectina na esfera sexual de ratos e ratas", protocolado sob o nº 2881/2013, utilizando 150 (cento e cinquenta) ratos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

We certify that the Research "Influence of exposure to ivermectin in the sexual sphere of rats", protocol number 2881/2013, utilizing 150 (one hundred and fifty) rats, under the responsibility Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethical Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/13/2013.

São Paulo, 16 de maio de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MOREIRA, Natalia

Título: Influência da exposição à ivermectina na esfera sexual de ratos e ratas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais Vera Lúcia e Vivaldo,
por me ensinarem a nunca desistir dos meus
sonhos e estarem sempre ao meu lado para me
apoiar e motivar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus animais que fizeram e são parte do meu trabalho. Sem vocês o meu trabalho não teria fundamento algum!

Agradeço a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em especial ao Departamento de Patologia (VPT) por proporcionar docentes de qualidade e estrutura para formação.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos concedida.

A minha orientadora Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa pelo profissionalismo, por toda dedicação, orientação, pelo conhecimento científico ensinado e compartilhado, pela ajuda, apoio, e confiança que me foram prestados no decorrer do meu trabalho. Muito obrigada!

A minha colaboradora Profa. Dra. Maria Martha Bernardi pelo conhecimento, confiança, orientação, incentivo e apoio prestados durante todo o meu trabalho.

Agradeço infinitamente aos meus pais, Vera Lúcia de Oliveira Moreira e Vivaldo Moreira, por estarem sempre ao meu lado em qualquer decisão da minha vida, sempre me apoiando e incentivando. Obrigada por contribuírem tanto à minha vida e serem extremamente fundamentais. Muito obrigada pai pelas broncas, apoios, carinho, conselhos, enfim obrigada por tudo! Muito obrigada mãe por ser minha grande amiga, confidente, meu exemplo de altruísmo, meu porto seguro e sempre ter uma palavra de apoio e um conselho que façam eu me levantar nos momentos em que já pensei em desistir. Aos meus pais, muito obrigado e saibam que tudo o que fiz e faço é e sempre será por vocês. Amo muito vocês!

Muito obrigada as minhas avós, Alvisi Neyde Moreira e Anna Stoppa de Oliveira, por cuidarem de mim durante toda minha infância, que sem saberem me ensinaram a ter respeito, responsabilidade e comprometimento, quando me diziam: “Menina, primeiro faça suas lições de casa, depois você pode brincar o quanto quiser”!

Obrigada a todos da minha família que de algum modo especial contribuíram para a minha formação e pelos momentos que foram como pais ou irmãos para mim!

Agradeço ao Prof. Ivo Lebrun e sua aluna Aline Auada pela colaboração na dosagem dos neurotransmissores GABAérgico.

Agradeço ao Prof. Jorge Camilo Flório pelo auxílio e colaboração na dosagem de neurotransmissores e no decifrar dos resultados.

Agradeço as secretárias do nosso departamento: Adriana, Cristina e Milena, toda à atenção prestada, assim como todas as vezes que abriram a porta quando esqueci o meu cartão!

Agradeço a cada um dos funcionários do biotério: Aline, Claudia, Dona Idalina, Luciana, Mauro e Nelsinho a atenção e cuidado prestado aos meus e os demais animais.

Agradeço aos técnicos do laboratório: Herculano, Nicolle e Vagner, por toda atenção, ajuda prestada e conhecimento compartilhado. Obrigada pelas conversas de bancada e pelos cafezinhos na copa! Agradeço a Nicolle pelo auxílio e colaboração na dosagem de testosterona.

Obrigada Fukushima pela colaboração na dosagem de neurotransmissores e no decifrar dos resultados. Obrigada pelo auxílio e conhecimentos compartilhado.

Obrigada Adriana Siqueira pelo conhecimento compartilhado, auxílio e ajuda na leitura das lâminas de histologia.

Agradeço ao Thiago Marinho pela amizade, atenção, risadas e principalmente por toda ajuda tecnológica!

Agradeço a Thaísa por compartilhar seus conhecimentos e por me ajudar nos experimentos. Obrigada pela amizade, cumplicidade e companheirismo. Obrigada por me apoiar, incentivar, por enxugar minhas lágrimas, pela companhia nas aulas de fitness no CEPE e por me fazer sorrir, principalmente quando eu não entendo o que você fala!

Aos amigos do VPT: Daniel, Eduardo, Esther, Everton, Fukushima, Gabi, Igor, Julia, Lilian, Mari Venâncio, Mari Silva, Maysa, Paulinha, Rafa Lucchesi, Rafa Margatho, Roberta, Sayuri, Stella, Thaísa, Thiago Marinho e Wanderley. Agradeço toda ajuda nos estudos e experimentos, pelo conhecimento, pelas referatas, pela paciência, pelas conversas e risadas na sala da pós, pelos almoços no bandeirão, por compreenderem minhas aflições, pelas motivações e principalmente pelos churrascos!

A todos os amigos que conquistei ao longo da minha vida, agradeço o companheirismo, incentivo, amizade, por compartilharmos nossas angústias, e melhor ainda por compartilharmos nossas alegrias, sorrisos e abraços. Agradeço por estarem juntos comigo em mais uma etapa da minha vida!

Por fim, saibam que sou muito grata a cada um de vocês. Muito obrigada a todos por estarem comigo em mais uma empreitada da minha vida!

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”

(Albert Einstein)

RESUMO

MOREIRA, N. **Influência da exposição à ivermectina na esfera sexual de ratos e ratas.** [Influence of ivermectin exposure in the sexual sphere of male and female rats]. 2014. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A ivermectina é uma lactona macrocíclica utilizada para o tratamento de parasitoses na espécie humana e amplamente empregada em medicina veterinária como endectocida. Em mamíferos, diversas evidências indicam que as lactonas macrocíclicas interagem com canais de cloro mediados pelo ácido gama-aminobutírico (GABA). Sabe-se que o sistema GABAérgico está envolvido com a manifestação do comportamento sexual. Assim, no presente trabalho foram estudados, em ratos, os efeitos da ivermectina na coordenação motora, na motivação e no desempenho sexual de machos, bem como no comportamento sexual de fêmeas; além disso, avaliaram-se os níveis séricos de testosterona e as concentrações de diferentes neurotransmissores e seus metabólitos no hipotálamo e estriado, áreas do sistema nervoso central relacionadas, respectivamente, com o comportamento sexual e atividade motora. No presente estudo foram usadas as doses de 0,2 e 1,0 mg/kg, por via intraperitoneal, de uma formulação comercial de ivermectina; estas doses foram escolhidas considerando que a primeira é a dose usualmente empregada terapeuticamente e a segunda baseada em achados prévios que mostraram interferência no comportamento sexual de ratos machos. Os resultados mostraram que a administração de ivermectina em ratos: promoveu prejuízo na coordenação motora de machos; não interferiu na motivação sexual e na ereção peniana de machos; prejudicou o comportamento sexual de ratas; não alterou o peso relativo dos testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal, porém aumentou o peso relativo do fígado; não alterou o índice gonadossomático de machos, bem como não foram observadas alterações no estudo histopatológico dos diferentes órgãos; reduziu os níveis séricos de testosterona de machos; diminuiu os níveis de GABA hipotalâmico e estriatal, bem como reduziu a atividade dos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico hipotalâmicos e, no estriado, reduziu a atividade do sistema dopaminérgico. Os resultados foram discutidos considerando a interferência da ivermectina nos sistemas de neurotransmissão central.

Palavras-chave: Avermectinas. GABA. Ivermectina. Comportamento sexual. Neurotransmissores.

ABSTRACT

MOREIRA, N. **Influence of ivermectin exposure in the sexual sphere of male and female rats.** [Influência da exposição à ivermectina na esfera sexual de ratos e ratas]. 2014. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Ivermectin is a macrocyclic lactone used for the treatment of parasitic infections in humans and widely used in veterinary medicine as endectocide. In mammals, a number of evidence indicate that interact with the macrocyclic lactones chloride channels mediated by gamma-aminobutyric acid (GABA). It is known that the GABAergic system is involved in the manifestation of sexual behavior. Thus, in the present work were studied in rats, the effects of ivermectin on motor coordination, motivation and sexual performance of males and females in sexual behavior; furthermore, evaluated the serum levels of testosterone and different concentrations of neurotransmitters and their metabolites in the hypothalamus and striatum areas of the central nervous system related, respectively, sexual behavior and motor activity. In the present study doses of 0.2 and 1.0 mg / kg were used, intraperitoneally, a commercial formulation of ivermectin; these doses were chosen considering that the first dose is usually employed therapeutically and the second based on previous findings have shown that interference with sexual behavior of male rats. The results showed that administration of ivermectin in rats: impairment in motor coordination promoted male; did not interfere on the sexual motivation and the penile erection in male; impaired sexual behavior of female rats; did not alter the relative weight of the testes, epididymis, prostate and seminal vesicles, but increased the relative liver weight; did not alter the gonadosomatic index (GSI) of males and no changes were observed in the histopathological study of different organs; reduced serum testosterone levels of male; decreased levels of hypothalamic and striatal GABA and reduced the activity of the serotonergic and dopaminergic systems hypothalamic and the, reduced the activity of the dopaminergic system striatal. The results were discussed considering the interference of ivermectin in central neurotransmission systems.

Keywords: Avermectins. GABA. Ivermectin. Neurotransmitters. Sexual behavior.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química das avermectinas	22
Figura 2 - Estrutura química da avermectina e seus compostos.....	24
Figura 3 - Estrutura química da ivermectina	25
Figura 4 - Desenho esquemático da trave elevada	36
Figura 7 - Ilustração do aparelho da ereção peniana	41
Figura 8 - As diferentes fases do ciclo estral, vista sob microscopia de luz (400x).....	43
Figura 9 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (C = controle – 1,0 ml/kg) na coordenação motora de ratos observados em trave elevada, após 15 minutos e 24 horas da administração. N = 6 - 8 animais/grupo.....	52
Figura 10 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (controle – 1,0 ml/kg) em parâmetros da motivação sexual de ratos, após 15 minutos e 24 horas da administração. N = 10 ratos/grupo	54
Figura 11 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou não (controle – 1,0 mL/kg) na latência para a primeira ereção peniana, no número de ereções penianas, na latência para o primeiro bocejo e no número de bocejos, após 15 minutos e 24 horas da administração. São apresentadas as medianas e respectivos limites dos escores da latência para a 1ª ereção peniana (EP) e para os demais parâmetros, as médias e os respectivos desvios padrão. N = 6 ratos/grupo	57
Figura 12 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou não (controle – 1,0 mL/kg) no comportamento sexual de ratas, após 15 minutos. São apresentadas as medianas e respectivos limites. N = 10 ratas/grupo.....	61
Figura 13 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou não (controle - 1,0 ml/kg) no comportamento sexual de ratas, após 15 minutos. São apresentadas as medianas e respectivos limites. N = 10 ratas/grupo.....	65
Figura 14 - Comparação dos efeitos da ivermectina sobre a intensidade de lordose das ratas com ciclo estral farmacológico e fisiológico (em 10 montas). Quinze minutos após a administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) foi observado o comportamento das ratas na fase de estro. São apresentados as médias e respectivos erros padrão. N = 10 ratos/grupo	68

Figura 15 - Peso relativo dos órgãos e índice gonadossomático de ratos machos após 24 horas da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou não (controle – 1,0 ml/kg). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão. N = 6 - 8 animais/grupo	71
Figura 16 - Avaliação dos níveis séricos de testosterona de ratos machos após 24 horas da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou não (controle – 1,0 ml/kg). N = 6 – 8 animais.....	73
Figura 17 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) nos níveis de neurotransmissores e seus metabólicos (ng/g de tecido), no hipotálamo de ratos machos, após 24 horas da administração. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão. GABA=ácido gama aminobutírico; 5HT=serotonina e seu metabólito 5HIA=ácido 5 hidroxindolacético; DA=dopamina e seu metabólito DOPAC=ácido di-hidróxi-fenilacético; NOR=noradrenalina e seu metabólito VMA=ácido vanilmandélico. N=6 - 8 animais	75
Figura 18 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) nos níveis de neurotransmissores e seus metabólicos (ng/g de tecido), no estriado de ratos machos, após 24 horas da administração. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão. GABA=ácido gama aminobutírico; 5HT=serotonina e seu metabólito 5HIA=ácido 5 hidroxindolacético; DA=dopamina e seu metabólito DOPAC=ácido di-hidróxi-fenilacético; NOR=noradrenalina e seu metabólito VMA=ácido vanilmandélico. N=6 - 8 animais	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Escores atribuídos ao comportamento do rato na porção central (1 metro) da trave elevada, observando a pata posterior voltada para o observador	38
Quadro 2 - Escores atribuídos à latência (em minutos) para primeira ereção peniana de ratos tratados com 50 µg/kg de apomorfina por via subcutânea	42
Quadro 3 - Escores atribuídos à lordose no comportamento sexual de ratas	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) na coordenação motora de ratos observados em trave elevada, após 15 minutos e 24 horas da administração. São apresentadas as medianas da soma dos escores e os respectivos limites inferior e superior. N = número de animais/ grupo	51
Tabela 2 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) na motivação sexual de ratos, após 15 minutos e 24 horas da administração. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão. N = número de animais/grupo	53
Tabela 3 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) na ereção peniana. Após 15 minutos e 24 horas da administração de ivermectina ou solução controle, foi induzida a ereção peniana pela administração de 50 µg/kg de apomorfina, por via subcutânea. São apresentadas as medianas e respectivos limites dos escores da latência para a 1ª ereção peniana (EP) e para os demais parâmetros, as médias e os respectivos desvios padrão. N = número de animais/grupo	56
Tabela 4 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle), após 15 minutos da administração, na intensidade de lordose de ratas, em cada uma das 10 montas. O cio foi induzido com 0,5 mg/kg de valerato de estradiol, via SC, 24 horas antes da avaliação comportamental. São apresentadas as medianas dos escores e os respectivos limites inferior e superior. N = número de animais/grupo	59
Tabela 5 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle), após 15 minutos da administração. O cio foi induzido com 0,5 mg/kg de valerato de estradiol, via SC, 24 horas antes da avaliação comportamental. São apresentados as medianas e respectivos limites. N = número de animais/grupo	60
Tabela 6 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) na intensidade de lordose de ratas, em cada uma das 10 montas, após 15 minutos da administração. A avaliação comportamental foi observada na fase estro do ciclo estral. São apresentadas as medianas dos	

escores e os respectivos limites inferior e superior. N = 10 animais/grupo	63
Tabela 7 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle), após 15 minutos da administração. A avaliação do comportamento foi realizada na fase estro do ciclo estral. São apresentados as medianas e respectivos limites. N = número de animais/grupo	64
Tabela 8 - Comparação dos efeitos da ivermectina sobre a intensidade de lordose das ratas com ciclo estral farmacológico e fisiológico (em 10 montas). Quinze minutos após a administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) foi observado o comportamento das ratas na fase de estro. São apresentados as médias e respectivos erros padrão; N = número de animais/grupo	67
Tabela 9 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) no peso relativo dos órgãos (fígado, próstata, testículos, epidídimos e vesícula seminal) e no índice gonadossomático (IGS) de ratos, após 24 horas da administração. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão. N = número de animais/grupo	70
Tabela 10 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) na concentração de testosterona no sangue de ratos machos, após 24 horas da administração. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão. N = número de animais/grupo.....	72
Tabela 11 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) nos níveis de neurotransmissores e seus metabólicos (ng/g de tecido), no hipotálamo e estriado de ratos machos, após 24 horas da administração. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão. GABA=ácido gama aminobutírico; 5HT=serotonina e seu metabólito 5HIA=ácido 5 hidroxí-indolacético; DA=dopamina e seu metabólito DOPAC=ácido di-hidróxi-fenilacético; NOR=noradrenalina e seu metabólito VMA=ácido vanilmandélico. N = número de animais/grupo	74

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	LACTONAS MACROCÍCLICAS: AVERMECTINAS E MILBEMICINAS.....	21
2	OBJETIVOS	31
2.1	OBJETIVO GERAL.....	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.2	DROGAS.....	35
3.3.1	Avaliação da coordenação motora observada em trave elevada.....	36
3.3.2	Avaliação da motivação sexual.....	38
3.3.3	Avaliação da ereção peniana induzida pela apomorfina	40
3.3.4	Avaliação do ciclo estral.....	42
3.3.5	Avaliação do comportamento sexual em fêmeas	44
3.3.6	Avaliação do peso relativo dos órgãos, do índice gonadossomático e estudo histopatológico.....	45
3.3.7	Avaliação da concentração de testosterona no sangue.....	46
3.3.8	Avaliação dos níveis de neurotransmissores cerebrais e seus metabólitos.....	46
3.3.9	Análise estatística.....	48
4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	50
4.1	EXPERIMENTO 1: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE IVERMECTINA NA COORDENAÇÃO MOTORA OBSERVADA EM TRAVE ELEVADA.....	51
4.2	EXPERIMENTO 2: EFEITOS DA IVERMECTINA NA MOTIVAÇÃO SEXUAL DE MACHOS.....	52
4.3	EXPERIMENTO 3: EFEITOS DA IVERMECTINA NA EREÇÃO PENIANA INDUZIDA PELA APOMORFINA	55
4.4	EFEITOS DA IVERMECTINA NO COMPORTAMENTO SEXUAL EM FÊMEAS, EM CICLO ESTRAL FARMACOLÓGICO E FISIOLÓGICO.....	58
4.4.1	Experimento 4: efeitos da ivermectina no comportamento sexual de fêmeas, em ciclo estral farmacológico	58
4.4.2	Experimento 5: efeitos da ivermectina no comportamento sexual de fêmeas, em ciclo estral fisiológico	62
4.4.3	Experimento 6: comparação dos efeitos da ivermectina sobre a intensidade de	

lordose das ratas com ciclo estral farmacológico e fisiológico	66
4.5 EXPERIMENTO 7: EFEITOS DA IVERMECTINA NO PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS, NO ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO E ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	69
4.6 EXPERIMENTO 8: EFEITOS DA IVERMECTINA NO NÍVEL DE TESTOSTERONA NO SANGUE	72
4.7 EXPERIMENTO 9: EFEITOS DA IVERMECTINA NOS NÍVEIS DE NEUROTRANSMISSORES CEREBRAIS E SEUS METABÓLITOS	73
5 DISCUSSÃO	77
6 CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS.....	86

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A importância do controle dos parasitos, tanto em animais de produção, como nos de companhia é realizado, em medicina veterinária, prioritariamente, por meio da utilização de antiparasitários. Os parasitos constituem um grave problema sócio-econômico em decorrência da sua alta prevalência, e por alguns deles serem agente de zoonoses; assim, seu controle através do uso de antiparasitários se revela de grande importância (MORAGAS; SCHNEIDER, 2003).

Antiparasitários são fármacos que possuem a capacidade de eliminar o parasita ou reduzir a carga parasitária para níveis toleráveis, inibindo o seu crescimento. Os antiparasitários são classificados em três tipos: ectocidas, endocidas e endectocidas (MORAGAS; SCHNEIDER, 2003; MAZO et al., 2005). Os ectocidas apresentam ação somente contra os parasitos externos, como, por exemplo, insetos e aracnídeos. Endocidas, por sua vez, atuam contra os parasitos internos, como nematódeos, cestódeos e trematódeos. E, por fim, os endectocidas agem contra os parasitos externos e internos, tendo assim um uso mais amplamente difundido (MORAGAS; SCHNEIDER, 2003; MAZO et al., 2005).

Os antiparasitários são empregados não somente na medicina veterinária, como na agricultura há anos. Há relatos, por exemplo, do uso desde 1895, de soluções arsênicas para o combate de carrapatos; em virtude de seu uso prolongado, houve o desenvolvimento de resistência e novos produtos surgiram, como os organoclorados e, dentre eles o DDT (diclorodifeniltricloreto). Com os consequentes danos a saúde humana e ao ambiente causados pelos organoclorados, surgiu uma nova geração de antiparasitários, os organofosforados. A resistência a este antiparasitário estimulou o desenvolvimento dos piretróides, os quais apresentam eficácia contra ectoparasitos e baixa toxicidade para mamíferos, todavia apresentavam instabilidade química e elevado custo de produção. Foi somente em 1973 que o primeiro piretróide estável as condições ambientais foi obtido (OPAS/OMS, 1996; MORAGAS; SCHNEIDER, 2003). O grande avanço no controle dos ecto- e endoparasitas foi a descoberta, em 1979, das lactonas macrocíclicas, como as avermectinas e milbemicinas (CAMPBELL, 1989; GERENUTTI; SPINOSA, 1997).

1.1 LACTONAS MACROCÍCLICAS: AVERMECTINAS E MILBEMICINAS

As avermectinas e milbemicinas são lactonas macrocíclicas empregadas como antiparasitários, sendo extensivamente vendidas no mundo (VERCRUYSSSE; REW, 2002). São amplamente utilizados na medicina veterinária para o tratamento de verminoses gastrointestinais e também para o controle de ectoparasitos, bem como na agricultura para o controle de infestações por pragas. Na medicina humana são usados para o tratamento de filariose e, principalmente, no tratamento e controle da oncocercose e sarna (JACKSON, 1989; OMURA, 2008).

As lactonas macrocíclicas foram descobertas na década de 1970 e vem sendo empregadas para o tratamento das doenças parasitárias que acometem tanto os animais domésticos como os animais de produção (GEARY, 2005). Primeiramente, foram descobertas as milbemicinas, em 1973, por pesquisadores da Sankyo, os quais apontaram o seu efeito acaricida e inseticida (MEROLA; EUBIG, 2012). Etimologicamente, a palavra milbemicina se refere aos seus efeitos: *milb* (ácaro) + *myc* (fungo) + *in* (substância química com finalidade farmacológica) (SHOOP et al., 1993). Posteriormente, em 1975, pesquisadores da indústria farmacêutica *Merck Sharp & Dohme Research* descobriram as avermectinas (Figura 1), a partir de amostras de solo coletadas próximo ao Golfo Kawano (Japão); sua atividade biológica é contra insetos, ácaros e nematódeos. Assim, como as milbemicinas, etimologicamente a palavra avermectina expressa: *a* (ausência) + *verm* (verme) + *ect* (externo) + *in* (substância química com finalidade farmacológica) (BURG et al., 1979; GERENUTTI; SPINOSA, 1997; OMURA, 2008).

Figura 1 - Estrutura química das avermectinas

Estrutura geral das avermectinas

Avermectinas	R ₅	R ₂₆		R ₁
Abamectina	OH	CH ₃		OH
Ivermectina	OH	CH ₃	C ₂ H ₅	OH
Doramectina	OH			OH
Eprinomectina	OH	CH ₄	H ₃ C—CH ₃

Fonte: (MOREIRA, 2014).

As avermectinas e milbemicinas são obtidas a partir do processo de fermentação de fungos presentes no solo, pertencente ao filo dos actinomicetos, do gênero *Streptomyces*. A fermentação natural do actinomiceto *Streptomyces hygroscopicus* produz o metabolito milbemicina e moxidectina, já a fermentação do *Streptomyces avermitilis* culmina em metabolitos denominados ivermectina, a abamectina e a doramectina (BURG et al., 1979; LANKAS; MINSKER; ROBERTSON, 1989; GERENUTTI; SPINOSA, 1997).

O processo de fermentação do *Streptomyces avermitilis* resulta na produção de oito tipos de avermectinas: A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a, e B2b (Figura 2). Os compostos A possuem um radical metil (CH_3) ligado ao carbono 5, enquanto o grupo B possui um hidrogênio; os compostos do tipo 1 possuem dupla ligação entre os carbonos 22 e 23, já o tipo 2 apresenta ligação simples. O grupo “a” apresenta um radical butil (C_4H_9) ligado ao carbono 25, e o grupo “b” um radical isopropil (C_3H_7). Neste processo de fermentação resulta na produção em maiores quantidades dos seguintes tipos A2a, B1a, e B2a (GERENUTTI; SPINOSA, 1997; OMURA, 2008).

A avermectina B_{1a}, ficou conhecida comercialmente como abamectina, é um produto natural do processo de fermentação, possui elevada eficácia com amplo espectro parasiticida e ligações simples com hidrogênios nos carbonos C-22 e C-23. A introdução de hidrogênios da avermectina B₁ no lugar das insaturações presentes entre os carbonos C-22 e C-23 resultou na molécula 22,23 diidroavermectina B₁, conhecida comercialmente como ivermectina. A presença de um grupo ciclo-hexílico na posição C-25 do anel lactônico central origina a doramectina, uma das avermectinas mais recentes, tendo sido lançada comercialmente no início da década de 1990 (JACKSON, 1989; GERENUTTI; SPINOSA, 1997; ALMEIDA; AYRES, 2006; OMURA, 2008).

Figura 2 - Estrutura química da avermectina e seus compostos

Componentes	Grupamentos	Substituintes
Componente A	R ₅	—CH ₃
Componente B	R ₅	—H
Componente 1	X	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{—CH—} \end{array}$
Componente 2	X	—CH=CH—
Componente a	R ₂₆	—CH ₂ —CH ₃
Componente b	R ₂₆	—CH ₃

Fonte: (MOREIRA, 2014).

O primeiro agente a ser comercializado, no ano de 1981, foi a ivermectina (Figura 3), um derivado semi-sintético constituído por uma mistura de 80% de 22, 23 diidroavermectina B_{1a} e 20% de 22, 23 diidroavermectina B_{1b}, recomendado como endectocida para animais de produção. Posteriormente, vieram a abamectina, doramectina, eprinomectina e selamectina, cada uma com propriedades distintas e relevantes para o controle de ecto- e endoparasitos (GEARY, 2005; ALMEIDA; AYRES, 2006).

Figura 3 - Estrutura química da ivermectina

Fonte: (MOREIRA, 2014).

A ivermectina é um dos antiparasitários mais utilizados mundialmente, sendo aprovado seu uso em ruminantes, suínos, equinos e cães como endectocida. As doses preconizadas, por via subcutânea (SC), são: 0,2 mg/kg para ruminantes e 0,3 mg/kg para suínos; para equinos, a dose é de 0,2 mg/kg por via oral (VO). Em cães, a ivermectina pode ser empregada como preventivo de dirofilariose (*Dirofilaria immitis*), na dose de 0,006-0,012 mg/kg, por VO, uma vez ao mês DELAYTE et al., 2006; SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA A SAÚDE ANIMAL, 2014). As doses recomendadas

apresentam uma considerável margem de segurança em ruminantes, suínos e equinos.

Com relação à toxicidade, a ivermectina é classificada como uma substância moderadamente tóxica. A sua dose letal 50% (DL50) oral em ratos é de 50 mg/kg, intraperitoneal de 55 mg/kg, enquanto a DL50 dérmica é de 660 mg/kg (TEMPLE; SMITH, 1994).

Atualmente, existem vários produtos veterinários registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a base de ivermectina, na forma de soluções injetáveis, soluções tópicas, preparações orais (pasta e pó *premix*), além de associações com outros princípios ativos; são 76 produtos registrados para bovinos, 13 para caprinos, 26 para ovinos, 24 para equinos e 9 para cães (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA A SAÚDE ANIMAL, 2014). Há também especialidades farmacêuticas para uso na espécie humana, como Ivermec®, Leverxtin®, Plurimec®, Revectina® e Vermectil® (DEF, 2011/2012).

As avermectinas, em geral, apresentam como características: alto peso molecular, baixa toxicidade, não atravessam facilmente a barreira hematoencefálica e são altamente lipofílicas, tendo, assim, pouca solubilidade em soluções aquosas (0,006 a 0,009 ppm), porém são facilmente solúveis em solventes orgânicos (CAMPBELL, 1989; GERENUTTI; SPINOSA, 1997). Esta última característica faz com que após ser absorvida, independentemente da via de administração, a molécula seja distribuída por todo o organismo animal, concentrando-se, particularmente, no tecido adiposo. Este tecido possui vascularização limitada, fazendo com que a liberação da droga para o plasma seja mais lenta, aumentando o tempo de sua permanência no organismo (GEARY, 2005; OMURA, 2008). Neste sentido, o período de carência da ivermectina para o abate, de modo geral, em bovinos é de 35 dias e para suínos de 18 dias após a última administração.

O MAPA define como limite máximo de resíduo (LMR) das lactonas macrocíclicas para o fígado bovino como sendo de 100 µg/kg para a abamectina, doramectina, ivermectina e moxidectina; no músculo, o LMR é de 10 µg/kg para a abamectina, doramectina e ivermectina, e para moxidectina de 20 µg/kg (BRASIL, 2013).

Em relação à toxicidade da ivermectina, ela está associada principalmente ao elevado número de formulações disponíveis no mercado e ao uso indiscriminado pelos proprietários dos animais na tentativa de obter maior sucesso terapêutico. A toxicidade ocorre quando a ivermectina atinge órgãos suscetíveis em concentrações suficientemente altas e por um tempo suficiente para iniciar a manifestação tóxica (DELGADO et al., 2009).

Os cães são particularmente sensíveis aos efeitos tóxicos da ivermectina, em especial, algumas raças, como, por exemplo, *Collie*, Pastor Australiano, *Old English Sheepdog*, Pastor de *Shetland*, *Afgan Hound* ou seus mestiços; os *Collies* são sensíveis a ivermectina, em doses tão baixas quanto 0,006 mg/kg (SAKATE, 2002; DELGADO et al., 2009). Nessas raças susceptíveis, há a participação do gene de resistência a múltiplas drogas denominado MDR1, que codifica a glicoproteína-P (Gp-P). Esta se encontra localizada em alguns tecidos, inclusive na barreira hematoencefálica, canais hepatobiliares e placenta, agindo como uma proteína de efluxo, levando do interior para fora das células certas drogas. A importância da relação entre a toxicidade das avermectinas, com a Gp-P se deve ao fato dela controlar a entrada de avermectinas em tecidos potencialmente sensíveis; sua presença serve para reduzir a distribuição nos tecidos, facilitando sua eliminação. No sistema nervoso central é encontrada dentro dos capilares endoteliais fazendo parte da barreira hematoencefálica. As avermectinas são, então, transportadas pela Gp-P do interior para fora da célula do endotélio, através do lúmen do vaso capilar, prevenindo, assim, a sua difusão no sistema nervoso central. Na deficiência ou ausência de Gp-P, as avermectinas são capazes de difundir-se livremente para o sistema nervoso central, e assim se acumulando (DELGADO et al., 2009). A intoxicação é resultado da alta concentração de ivermectina no sistema nervoso central, e os sinais clínicos incluem ataxia, hipermetria, desorientação, indiferença ao ambiente, hiperestesia, hiperreflexia, tremores, depressão, debilidade muscular, paralisia, ausência dos reflexos pupilares, cegueira, bradicardia, pulso fraco e em casos graves, coma e morte (SAKATE, 2002).

A biotransformação da ivermectina ocorre, exclusivamente, no fígado, a partir da enzima citocromo P450, isoenzima 3A4, resultado em aproximadamente 10 metabólitos, que em sua maioria são derivados hidroxilados e desmetilados (GEARY, 2005; OMURA, 2008). A sua eliminação e de seus metabólitos ocorre predominantemente pelas fezes, sendo 50% na forma inalterada; menos de 1% da dose administrada é eliminada pela urina e menos de 2% no leite materno (GEARY, 2005; OMURA, 2008).

O mecanismo de ação da ivermectina consiste na potencialização da ação inibidora do ácido gama-aminobutírico (GABA), o qual promove a hiperpolarização do neurônio, favorecendo a entrada do íon cloro e, assim, inibindo a transmissão nervosa (SIVILOTTI; NISTRI, 1991; PAREDES; AGMO, 1992). A ivermectina interage com os receptores GABAérgicos do neurônios de vertebrados (mamíferos), contudo apresenta maior afinidade (cerca de 100 vezes mais) aos receptores dos invertebrados; em invertebrados a ivermectina

atua também em receptores do glutamato (PAREDES; AGMO, 1992). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central de mamíferos (BORMANN, 2000).

Os receptores GABAérgicos estão distribuídos no sistema nervoso central e a administração de substâncias agonistas GABAérgicas desencadeiam efeitos generalizados, devido a ampla distribuição destes receptores. O bloqueio de receptores GABAérgicos, por processos fisiológicos e/ou tóxicos, desencadeia a excitabilidade neuronal (SIVILOTTI; NISTRI, 1991; PAREDES; AGMO, 1992; BORMANN, 2000).

Atualmente, são conhecidos três classes de receptores GABAérgicos: GABA_A, GABA_B e GABA_C (SIVILOTTI; NISTRI, 1991; BORMANN, 2000). Os receptores GABA_A e GABA_C são ionotrópicos, possuem canais iônicos (canais de cloreto) que se abrem após a ligação do neurotransmissor ao receptor, resultando em hiperpolarização. O receptor GABA_B é metabotrópico, um receptor que está ligado à proteína G, que ativa um segundo mensageiro.

Os receptores GABA_A de mamíferos são glicoproteínas transmembranas heterométricas formadas por cinco subunidades pertencentes a sete famílias. Para o funcionamento total desses receptores é necessário pelo menos uma subunidade α , uma β e uma γ . O GABA se liga a subunidade β desse receptor, enquanto os fármacos se ligam a subunidade α . O receptor GABA_A é responsável, principalmente, pela inibição pós-sináptica; seus agonistas são: muscimol, APSA (ácido 3-aminopropanesulfônico) e THIP (4,5,6,7-tetra-hidroisoxazol[5,4-c] piridina-3-ol); e seus antagonistas são a bicuculina (seletivo) e a picrotoxina (SIVILOTTI; NISTRI, 1991; BORMANN, 2000; RODRIGUES-ALVES et al., 2008).

Os receptores GABA_B se diferem tanto na forma, quanto na função dos receptores GABA_A e estão presentes em quantidades bem menores no organismo animal. Eles modulam os canais de cálcio através da subunidade γ , regulam a via da adenilciclase, através da subunidade α e aumentam a resposta do receptor de glutamato em sinapses excitatórias no cerebelo. O receptor GABA_B é responsável, principalmente, pela inibição pré-sináptica. Seu agonista é o baclofen, e os antagonistas são faclofen e sacoflen (SIVILOTTI; NISTRI, 1991; BORMANN, 2000; RODRIGUES-ALVES et al., 2008).

O terceiro tipo, o receptor GABA_C, é considerado uma das isoformas do receptor GABA_A, e é caracterizado por sua insensibilidade aos moduladores do receptor GABA_A (barbitúricos e benzodiazepínicos), bem como o seu antagonista (bicuculina). O receptor GABA_C também é insensível ao agonista do receptor GABA_B (baclofen) (SIVILOTTI; NISTRI, 1991; PAREDES; AGMO, 1992; BORMANN, 2000; RODRIGUES-ALVES et al., 2008).

Em mamíferos, o papel dos receptores GABAérgicos no comportamento sexual foram analisados a partir de estudos farmacológicos (AGMO; PAREDES, 1985). Estes estudos apontam que a administração intraperitoneal de THIP (agonista dos receptores GABA_A) inibiu o comportamento sexual de ratos machos. Por outro lado, a administração de bicuculina (antagonista de receptores GABA_A) não interferiu no comportamento sexual, porém quando administrada concomitante ao THIP produziu efeito inibitório intenso no comportamento sexual. Quando administrado o agonista do receptor GABA_B (baclofen), este promoveu inibição quase completa do comportamento sexual (AGMO; PAREDES, 1985).

Bitran e Hull (1987), levando em consideração que os receptores GABAérgicos são heterogêneos, atribuíram o fato de um antagonista potencializar a ação de um agonista, como consequência do bloqueio pré- e pós-sináptico de receptores GABA_A. Assim, o bloqueio pré-sináptico resultaria em liberação endógena do neurotransmissor GABA, o qual ativaria, preferencialmente, sítios GABA_B, uma vez que os sítios GABA_A estariam bloqueados pela bicuculina. Esta hipótese sugere também que o THIP pode ter algum efeito em receptor GABA_B, e que a inibição do comportamento sexual de machos pelo GABA é mediada pela ativação de receptores GABA_B.

A influência do GABA no reflexo de ereção peniana foi investigada por Leipheimer e Sachs (1988), que observaram que a administração de diferentes doses (1,0 e 2,0 mg/kg) de baclofen (agonista do receptor GABA_B) promoveu redução dose-dependente da proporção de ratos que exibiram ereção peniana. Porém, estas mesmas doses não tiveram efeito no comportamento sexual de ratos machos. Por outro lado, a administração de THIP ou de bicuculina (agonistas de receptores GABA_A) não afetaram a ereção peniana, nem o comportamento sexual. Os autores atribuíram estes achados a uma maior influência dos receptores GABA_B no reflexo de ereção peniana. No mesmo sentido, Meisel e Sachs (1994), avaliando o comportamento sexual de machos (como macaco, cão, gato, entre outras espécies, inclusive o homem), relataram que a estimulação de receptores GABA_B inibe os reflexos da ereção peniana, enquanto que os receptores GABA_A não têm influência sobre este comportamento.

Assim, fica evidente que existem profundas relações entre o sistema GABAérgico central e o comportamento sexual de mamíferos. Nesse sentido, considerando que a ivermectina pode interferir com a transmissão GABAérgica e que este sistema participa da manifestação do comportamento sexual, este trabalho avaliou os efeitos da ivermectina na esfera sexual de ratos e ratas. Para tanto, inicialmente, foi avaliado os efeitos da ivermectina na coordenação motora, a fim de averiguar sua possível interferência na manifestação do

comportamento sexual, seguido da avaliação da motivação e do desempenho sexual de ratos machos, do comportamento sexual de ratas e nos níveis de seus neurotransmissores e metabólitos no sistema nervoso central.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Considerando que as avermectinas podem interferir com a transmissão GABAérgica e que este sistema participa da manifestação do comportamento sexual, neste trabalho avaliaram-se os efeitos da ivermectina na coordenação motora, na motivação e no desempenho sexual de ratos machos e no comportamento sexual de ratas, bem como nos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos cerebrais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar em ratos machos os efeitos da administração da ivermectina na coordenação motora observada em trave elevada, na motivação sexual e na ereção peniana induzida pela apomorfina;
- Estudar em ratas os efeitos da administração de ivermectina no comportamento sexual;
- Avaliar os efeitos da ivermectina no peso relativos dos órgãos e no índice gonadossomático, bem como as possíveis alterações histopatológicas;
- Avaliar os efeitos da ivermectina na concentração sérica de testosterona;
- Avaliar os efeitos da ivermectina nos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos hipotalâmicos e estriatais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 150 ratos adultos, da linhagem Wistar, machos (N=90) e fêmeas (N=60), provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os animais com aproximadamente 90 dias de vida foram alojados em caixas de polipropileno com tampa metálica medindo 40 x 50 x 20 cm, em número de 5 animais por caixa. Estas caixas foram mantidas em salas com temperatura controlada por meio de aparelhos de ar condicionado ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz 12:12 h (luz acesa às 06:00 h) ou parcialmente invertido (luz acesa às 22:00 h) nos experimentos de motivação sexual de machos e comportamento sexual das fêmeas. Água e ração foram fornecidas *ad libitum* aos animais durante todo procedimento experimental.

O ciclo de luz foi parcialmente invertido para facilitar as observações comportamentais. Para tanto, os animais foram colocados na sala com o ciclo de luz parcialmente invertido, por pelo menos um mês antes do início do experimento; este período de acomodação é o suficiente para a adaptação do ciclo biológico dos animais ao novo regime de luz (RODRIGUES-ALVES, 2007). A motivação sexual e comportamento sexual sempre foram avaliados na fase escura do ciclo, iniciando-se três horas após o apagar das luzes, sendo a iluminação provida por uma luz infravermelha (25 W) para permitir a observação do comportamento. Deste modo, as observações ocorreram no período das 13:00 h às 17:00 h.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), sob o protocolo n° 2881/ 2013.

3.2 DROGAS

- Ivomec® injetável (ivermectina – Merial Saúde Animal Ltda., Paulínia/SP);
- Tween 80 (Labsynth Produtos para laboratório Ltda., Diadema/SP): usado para facilitar a dissolução da ivermectina (1 gota para 5 ml da droga);
- Apomorfina (Sigma-Aldrich, Steinheim - Alemanha): utilizada para indução de ereção peniana;
- Primogyna® (valerato de estradiol – Schering do Brasil, Química e Farmacêutica Ltda., São Paulo/SP): empregado para indução do cio.

O Ivomec® injetável foi preparado acrescentando-se um gota de Tween 80 para cada 5 ml de NaCl 0,9%, o qual foi adicionado gradativamente, obtendo-se as concentrações de 0,2 e 1,0 mg/ml de ivermectina. Empregou-se, com solução controle, a solução salina (NaCl 0,9%), a qual foi acrescida uma gota de Tween 80 para cada 5 ml. Ambas as soluções foram administradas por via intraperitoneal (IP). As doses de ivermectina administradas aos ratos foram de 0,2 e 1,0 mg/kg, sendo a primeira a dose terapêutica e a segunda foi escolhida considerando estudo prévio de nosso laboratório, no qual observou-se que essa dose promoveu redução na latência para a primeira monta e intromissão, sugerindo decréscimo do estado motivacional do rato (BERNARDI *et al.*, 2011). As observações comportamentais foram realizadas 15 minutos e 24 horas após a administração da ivermectina ou salina, considerando, respectivamente, estudo prévio do nosso laboratório (BERNARDI *et al.*, 2011) e a meia vida da ivermectina em ratos é de 1 – 2 dias (CHIU *et al.*, 1990).

A apomorfina foi diluída em água destilada, sendo administrada por via subcutânea (SC), na dose de 50 µg/kg. Esta solução foi preparada e mantida em gelo e ao abrigo da luz durante toda sessão experimental, de forma a evitar a sua degradação.

A preparação comercial de valerato de estradiol (Primogyna®) foi diluída em água destilada e administrada, por via SC, na dose de 0,5 mg/kg (FERRI *et al.*, 2013).

Todas as soluções foram administradas em volume de 1 ml/kg.

3.3 PROCEDIMENTOS

3.3.1 Avaliação da coordenação motora observada em trave elevada

A coordenação motora foi avaliada na trave elevada (Figura 4), conforme descrito anteriormente (RODRIGUES-ALVES et al., 2009). Brevemente, este aparelho consiste de uma trave de madeira com 2 m de comprimento e 18 mm de largura, tendo em cada extremidade uma plataforma de 10 x 10 cm (plataformas A e E), pintadas de branco; essa trave está apoiada sobre 3 suportes a 20 cm da superfície, sendo dois sob cada plataforma (A e E) e um ao centro (ponto C). A trave possui duas marcas limitando o espaço central de 1 m (pontos B e D), onde é observado o comportamento (Figura 5).

Figura 4 - Desenho esquemático da trave elevada

Fonte: (UDO, 2012).

Figura 5 - Ilustração da trave elevada mostrando um rato no espaço central do aparato

Fonte: (MOREIRA, 2014).

Para avaliar a coordenação motora, inicialmente o animal foi treinado a andar sobre a trave. Para tanto cada animal foi colocado, individualmente, por 5 minutos, sobre a trave diariamente por 10 dias consecutivos, antes do dia do teste para se habituar a caminhar na trave, recebendo, como reforço positivo, grãos de milho cozido, os quais foram depositados sobre ambas as plataformas. Assim, no primeiro dia de treino, o rato foi colocado sobre a plataforma (A), sendo oferecido pelo observador um grão de milho, o qual foi depositado sobre a plataforma oposta (E) e aguardou-se ele caminhar até lá. No segundo dia de treino, o rato foi colocado sobre a trave (B), próximo à plataforma (A) com o reforço, com a cabeça voltada para esta, sendo este procedimento repetido por 5 minutos. Nos dias subsequentes, o rato foi colocado sobre a trave, cada vez mais distante da plataforma com o reforço positivo, aguardando o seu deslocamento, até que o animal tivesse a capacidade de atravessar a trave por inteiro, atingindo a plataforma oposta (E). Uma vez que o animal conseguisse atravessar de uma plataforma a outra, o mesmo procedimento foi repetido para que ele aprendesse a fazer o caminho inverso, e se tornasse apto a fazer a travessia de uma plataforma para outra, no período de 5 minutos. Os animais foram considerados treinados quando, em 7 dias, foram capazes de fazer duas travessias completas ($A \leftrightarrow E$) sem parar, e com um mínimo de erros, dentro do tempo de 5 minutos; os demais foram eliminados do experimento. Entre o 7º e 10º dia os ratos continuaram em treinamento e no 11º dia foi realizado o teste.

O teste consistiu em avaliar o desempenho do rato na trave, atribuindo escores, conforme descrito no quadro 1. Assim, quando o rato caminhou na porção central (pontos B a D) atribuiu-se um escore para cada passo dado com o membro pélvico voltado para o observador. Ao término do teste, foram somados os escores obtidos por cada animal nas duas

travessias completas.

Ao término da observação de cada animal, a trave foi limpa com solução de álcool 5%. Foram intercalados animais dos grupos experimentais e controle.

Quadro 1 - Escores atribuídos ao comportamento do rato na porção central (1 metro) da trave elevada, observando a pata posterior voltada para o observador

Escore	Comportamento
0	O animal mantém a pata posterior totalmente apoiada sobre a superfície da trave
1	O animal apoia parte da pata sobre a superfície da trave, de modo a não ultrapassar a borda inferior.
2	O animal escorrega e a pata ultrapassa a borda inferior da trave.

Fonte: (RODRIGUES-ALVES, 2007).

3.3.2 Avaliação da motivação sexual

A avaliação da motivação sexual foi feita em um aparelho que fica apoiado sobre pés de metal com 60 cm de altura, consistindo de uma arena circular de madeira com 80 cm de diâmetro, circundada por uma parede metálica de 14,5 cm de altura, que possui externamente dois compartimentos de 30 x 30 cm localizados diametralmente oposto um ao outro, denominados de caixas incentivo (Figura 6). Estes compartimentos estão isolados da arena por uma tela de arame, permitindo somente o contato visual e olfativo. Durante a observação foi colocado maravalha sobre o piso destes compartimentos.

A arena, bem como as caixas incentivo são pintados de branco, com exceção da tela de arame. O chão da arena é dividido em três zonas: zona de incentivo do macho (ZIM), localizada mais próxima à caixa incentivo onde está o rato macho e formado por um quadrante (20 x 30 cm), delimitado por linhas pretas; zona de incentivo da fêmea (ZIF), localizada mais próxima à caixa incentivo onde é colocada a fêmea e formada por um quadrante de dimensão idêntica ao da zona do macho; e a zona neutra (ZN) definida pela zona restante da arena.

Para a observação da motivação sexual, são empregados dois ratos “iscas”, sendo um rato macho sexualmente experiente e uma rata fêmea, cujo estro foi induzido farmacologicamente pela administração 0,5 mg/kg de valerato de estradiol, 24 horas antes do

início do experimento.

Uma semana antes do experimento os ratos colocados foram colocados no aparato de observação da motivação sexual para familiarização, contudo sem a presença dos ratos “iscas” nas caixas incentivo. Cada rato foi colocado, individualmente, na arena para explorá-la por 5 minutos em três dias consecutivos.

No dia do teste da motivação sexual, os ratos “iscas” foram colocados nas caixas incentivo 20 minutos antes de ser dado início ao experimento para sua habituação. A seguir, cada rato a ser testado foi colocado individualmente no centro da arena e observado por 20 minutos, sendo avaliados os seguintes parâmetros: tempo em segundos de permanência na zona de incentivo da fêmea (ZIF) e do macho (ZIM); e frequência de visitas a cada um das zonas de incentivo (ZI) (número de vezes que o animal entra com as quatro patas na ZIF ou ZIM).

Ao término da observação de cada animal, a arena foi limpa com solução de álcool 5%. Foram intercalados animais dos grupos experimentais e controle.

Figura 6 - Ilustração do aparelho da motivação sexual

Legenda: ZIF = Zona de incentivo da fêmea; ZIM = Zona de incentivo do macho; ZN = Zona neutra

Fonte: (RODRIGUES-ALVES, 2007).

3.3.3 Avaliação da ereção peniana induzida pela apomorfina

A avaliação da ereção peniana foi observada em uma caixa de vidro, medindo 30 x 30 x 30 cm, com espelhos localizados na parede posterior e no piso da caixa, para melhor visualização do comportamento. A caixa está apoiada em quatro pés de metal com 10 cm de altura, sobre um espelho plano no piso da caixa medindo 40 x 40 cm (Figura 7).

Figura 7 - Ilustração do aparelho da ereção peniana

Fonte: (RODRIGUES-ALVES, 2007).

Para indução da ereção peniana foi administrado 50 µg/kg de apomorfina, por via SC, e imediatamente o rato foi colocado na caixa de vidro. Considerou-se ereção peniana quando a glândula do pênis emergiu da membrana prepucial, acompanhado por uma ligeira posição vertical dos membros pélvicos e intensa limpeza genital (*grooming genital*) (RODRIGUES-ALVES et al., 2008). Cada animal foi observado durante 60 minutos consecutivos, sendo avaliados os seguintes parâmetros:

- Latência para primeira ereção (minutos);
- Número de ereções penianas;
- Latência para primeiro bocejo (minutos);
- Número de bocejos;

A latência para primeira ereção foi convertida em escore, conforme mostrado no quadro 2.

Quadro 2 - Escores atribuídos à latência (em minutos) para primeira ereção peniana de ratos tratados com 50 µg/kg de apomorfina por via subcutânea

Escore	Latência (minutos)
1	0 a 10
2	11 a 20
3	21 a 30
4	31 a 40
5	41 a 50
6	51 a 60
7	Não apresentaram ereção peniana

Fonte: (RODRIGUES-ALVES, 2007).

Após cada observação comportamental a caixa de vidro foi limpa com solução de álcool 5%. A seguir, outro rato foi colocado na caixa para avaliação da ereção peniana, sendo intercalados animais dos grupos experimentais e controle.

3.3.4 Avaliação do ciclo estral

O ciclo estral foi acompanhado por observações microscópicas diárias, durante aproximadamente 30 dias consecutivos, do material proveniente do esfregaço vaginal das ratas, que estavam alojadas em sala com ciclo de luz parcialmente invertido. As coletas dos esfregaços vaginais foram realizadas no período da manhã, entre às 08h30 e 10h00.

Para coletar dos esfregaços vaginais, delicadamente foi introduzido na vagina da rata um *swab* umedecido em solução salina (NaCl 0,9%), coletando o material. A seguir, esse material foi depositado em uma lâmina de vidro e, imediatamente, observado sob microscopia de luz (lente de aumento de 400x), para detecção da fase do ciclo estral.

Sob a microscopia de luz foi possível observar três tipos celulares, conforme descrito por Marcondes et al. (2002): 1) células epiteliais nucleadas e arredondadas; 2) células queratinizadas, irregulares e anucleadas e 3) leucócitos pequenos, circulares e bem definidos.

As diferentes fases do ciclo estral são: proestro, estro, metaestro e diestro, caracterizadas por diferentes proporções dos tipos celulares citados. São elas:

- Proestro: caracterizada pela predominância de células epiteliais nucleadas (Figura 8a);
- Estro: caracteriza-se, principalmente, pela presença de células queratinizadas e anucleadas, muitas vezes justapostas. É nesta fase que a fêmea está totalmente receptiva ao macho para copular (Figura 8b);
- Metaestro: nesta fase encontram-se todos os tipos celulares, em proporções variadas (Figura 8c);
- Diestro: distingue-se pela proeminente presença de leucócitos (Figura 8d).

Figura 8 - As diferentes fases do ciclo estral, vista sob microscopia de luz (400x)

Legenda: a) Proestro; b) estro; c) metaestro (E - célula epitelial; L - leucócito); d) diestro

Fonte: (MARCONDES et al., 2002).

3.3.5 Avaliação do comportamento sexual em fêmeas

A avaliação do comportamento sexual em fêmeas foi realizada no período escuro do ciclo de luz dos animais, iniciando-se três horas após o apagar das luzes, sendo a iluminação provida por uma luz infravermelha (25 W) para permitir a observação do comportamento. Deste modo, as observações ocorreram no período das 13h00 às 17h00.

O aparelho para observação do comportamento sexual consiste de uma caixa de madeira (56 x 32 x 32 cm) com uma cobertura móvel e com vidro frontal; o chão da caixa foi forrado com maravalha.

A avaliação do comportamento sexual das fêmeas foi feita de duas formas: induzida por hormônio e acompanhamento do ciclo natural. No primeiro caso, o ciclo estral foi induzido farmacologicamente pela administração de 0,5 mg/kg de valerato de estradiol, 24 horas antes do dia da avaliação do comportamento. Já para a avaliação do comportamento sexual em ciclo estral fisiológico foi realizado o esfregaço vaginal diariamente, pela manhã, conforme descrito no item 3.3.4, e quando a fêmeas estava no estro, esta teve seu comportamento sexual avaliado no período da tarde.

Para avaliação do comportamento sexual da fêmea, inicialmente foi introduzido um rato macho, sexualmente experiente, na caixa de observação para habituação, por 5 minutos, de modo que impregnasse seu odor na maravalha. Em seguida, a fêmea a ser avaliada foi introduzida na caixa, dando início a observação do comportamento sexual, por 10 montas. Esse comportamento foi avaliado de duas formas: pelo coeficiente e pela intensidade de lordose. A lordose foi caracterizada pela flexão côncava da coluna vertebral da fêmea, elevando a cauda e, assim, expondo a genitália (FELICIO et al., 1989; TEODOROV et al., 2005)

O coeficiente de lordose (em %) foi calculado pelo número de lordoses em 10 montas multiplicado por 100.

A intensidade de lordose foi avaliada atribuindo-se escores ao comportamento exibido pela fêmea (HARDY; DEBOLD, 1971) em cada uma das 10 montas, conforme descrito no quadro 3.

Quadro 3 - Escores atribuídos à lordose no comportamento sexual de ratas

Escore	Intensidade	Lordose
0	ausente	ausência da postura de lordose
1	moderada	leve flexão côncava da coluna vertebral e ligeira elevação da cabeça e base da cauda erguida
2	normal	flexão côncava da coluna vertebral, elevação da cabeça em ângulo de aproximadamente 30°, membros torácicos estendidos ligeiramente para frente, enquanto os membros pélvicos sustentam o quadril e a cauda para cima
3	intensa	proeminente flexão côncava da coluna, elevação da cabeça em ângulo igual ou superior a 45° e cauda bastante elevada

Fonte: (HARDY; DEBOLD, 1971).

Após a observação do comportamento sexual de cada fêmea, tanto a rata teste como rato-isca foram retirados da caixa, e trocou-se a maravalha. A seguir, o mesmo rato-isca foi recolocado na caixa, e seguiu-se o mesmo procedimento experimental descrito; cada macho foi empregado no máximo 3 vezes no mesmo dia. As observações foram feitas intercalando-se animais dos grupos experimentais e controle.

3.3.6 Avaliação do peso relativo dos órgãos, do índice gonadossomático e estudo histopatológico

Para avaliar o peso relativo dos órgãos e o índice gonadossomático, os ratos foram pesados individualmente e submetidos à eutanásia. Em seguida, foram removidos e pesados testículos, epidídimos, vesícula seminal (com e sem secreção), próstata e fígado.

O peso relativo (PR) destes órgãos foi calculado da seguinte forma: $PR = PO/PC \times 100$, onde PO = peso do órgão e PC = peso corporal.

Com as gônadas masculinas foi calculado o índice gonadossomático (IGS) da seguinte forma: $IGS = PG/PC \times 100$, onde PG = peso dos dois testículos e PC = peso corporal.

Fragmentos representativos de fígado, testículo e epidídimo foram fixados em formol a 10% desidratados, segundo Sousa (2007) e Borges et al. (2013), diafanizados e emblocados em parafina. A seguir, o material foi cortado com 5 µm de espessura em micrótomo e corado com hematoxilina-eosina (HE) para o estudo histopatológico.

3.3.7 Avaliação da concentração de testosterona no sangue

Para avaliação da concentração de testosterona no sangue, os ratos foram submetidos à eutanásia. A seguir, o sangue foi coletado e armazenado em tubos cônicos do tipo *Falcon*® (50 mL) sem anticoagulante para obtenção do soro. As amostras coletadas foram centrifugadas a 4.000 rpm, por 10 minutos, refrigeradas a 4°C (centrifuga Harrier 18/80 MSE da Sanyo®). Em seguida, o soro (sobrenadante) foi pipetado, com o auxílio de uma micropipeta automática, e armazenado em tubos de polipropileno do tipo *eppendorf*® (2 ml). As amostras do soro foram conservadas em freezer -80°C até o dia da análise.

Os níveis de testosterona plasmática foram determinados pela técnica de enzima imunoensaio de duplo-anticorpo, empregando-se kits comerciais apropriados (Cayman Chemical®, Ann Arbor, MI, EUA, catálogo n° 582701). As amostras foram diluídas 2x, 5x, 10x, 30x e 60x para verificar qual fator de diluição que melhor se enquadrava à curva padrão do kit; a diluição escolhida foi de 60x. Os demais procedimentos foram realizados, de acordo, com os descritos pelo fabricante.

3.3.8 Avaliação dos níveis de neurotransmissores cerebrais e seus metabólitos

Para avaliação dos neurotransmissores e seus metabólitos, os ratos foram submetidos à eutanásia por decapitação. Após este procedimento, o cérebro foi retirado da caixa craniana e, em seguida, dissecado sobre uma placa de petri contendo gelo seco no seu interior, de modo a obter um microambiente mais frio possível. As duas estruturais encefálicas de interesse, hipotálamo e estriado, foram coletadas e armazenadas separadamente em tubos de polipropileno da marca *eppendorf*® (devidamente identificados e anteriormente pesados), sendo estes colocados rapidamente em gelo seco para um célere congelamento. A seguir, as

estruturas dentro dos tubos foram pesadas e armazenadas, em freezer -80°C . Todo o procedimento foi concretizado, no máximo, em 3 minutos.

Para dar início as análises neuroquímicas das aminas e seus metabólitos, as estruturas encefálicas congeladas foram homogeneizadas, com o auxílio de uma sonda sonicadora de alta frequência, em uma solução gelada de ácido perclórico (HClO_4) 0,1 M (Merck®) contendo 0,02% de metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), EDTA dissódico e uma concentração conhecido como DHBA (ácido 3,4-dihidrobenzilamina), sendo esse o padrão interno para avaliação dos neurotransmissores e seus metabólitos. As diluições realizadas foram de 15x o peso do hipotálamo e 20x o peso do estriado.

Após a homogeneização, para melhor precipitação das proteínas e ácidos nucleicos, mantiveram-se os homogenatos em refrigerador (10°C) por uma noite (*overnight*). Na manhã seguinte, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm (centrífuga Harrier 18/80 MSE da Sanyo® – refrigerado a 4°C), por 30 minutos. Posteriormente a centrifugação, os sobrenadantes das amostras foram retirados com o auxílio de uma micropipeta automática e armazenados em *ependorf*®, sendo estocados em freezer -80°C para realização da quantificação, empregando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detector eletroquímico, conforme descrito por Felício *et al.* (1996). Sucintamente, utilizou-se um cromatógrafo líquido acoplado a um detector Decade® Eletroquímico (HPLC-ED – modelo LC-20A Prominence da marca Shimadzu®). O aparelho possui um sistema de bombas binárias de entrega de solvente, sistema de injeção automática com um auto-amostrador com capacidade para 76 amostras que podem ser refrigeradas a 4°C por meio de um sistema *peltier*, e um forno para manutenção da temperatura da coluna. A coluna utilizada possuía fase reversa contendo octadecilsilano (modelo Shim-pack C18 - Shimadzu®), medindo 150 x 4,6 mm e 5 μm de tamanho de partícula. O detector eletroquímico foi mantido com potencial de + 0,83 V no eletrodo do trabalho, enquanto o forno foi mantido em temperatura constante de 45°C .

A fase móvel utilizada foi preparada adicionando em 1L de água ultrapurificada do tipo 1 obtida por osmose reversa (com um equipamento de ultra purificação da marca MiliQ®): 4,20 g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), 7,16 g de fosfato de sódio dibásico (NaH_2PO_4), 556 mg de ácido heptanossulfônico ($\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NaO}_3\text{S}$), 40 mg de EDTA e 80 mL de metanol grau HPLC. Em seguida, a fase móvel foi filtrada em um sistema à vácuo por 30 minutos antes de ser incorporado ao sistema cromatográfico, onde permaneceu circulando por uma noite (*overnight*), com fluxo constante de 1,2 ml/min.

As soluções-padrão foram preparadas usando 1 nM de cada uma dos seguintes

padrões: ácido 3,4 dihidroxibenzilamina (DHBA), cloridrato de dopamina (DA), ácido 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC – metabólito da DA), ácido homovanílico (HVA – metabólito da DA), cloridrato de serotonina (5HT), ácido 5-hidroxitriptofano (5HTP – metabólito da 5HT) e noradrenalina (NOR). Os padrões foram diluídos em solução de ácido perclórico (HClO_4) 0,1 M e 0,02% de metabissulfito ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) em meio aquoso, distribuídos em microtubos descartáveis de 1,5 ml e, em seguida, estocados em freezer -80°C até o momento da análise. Para o desenvolvimento da curva de calibração os padrões foram descongelados e diluídos 5.000, 10.000 e 20.000x em ácido perclórico (HClO_4) 1M, filtrados, para assim serem injetados no cromatógrafo. Os neurotransmissores e seus metabólitos foram distinguidos a partir do seu tempo de retenção na coluna cromatográfica, comparando-as com os padrões e a determinação da concentração dos mesmos foi feita usando-se o valor da área do pico na equação obtida para a curva de calibração. O limite de detecção foi de 0,2 ng para a DA, DOPAC, HVA, 5HT, 5HTP e NOR.

Para a dosagem do neurotransmissor GABA, 200 μL dos homogenatos de cada amostra foram armazenados em microtubos descartáveis de 2 ml, acondicionados em caixa térmica com gelo seco e encaminhadas aos cuidados do Dr. Ivo Lebrun do Instituto Butantan (Unidade de Bioquímica e Biofísica), que gentilmente processou as amostras. Sucintamente, as amostras foram analisadas utilizando um cromatógrafo líquido ultra rápido (UFLC – Shimadzu), com uma coluna C18, fase reversa (ACE 3 C18-300®, 150 x 3.0 mm), acoplado a um PDA (*photo diode array*), ajustado no comprimento de onda de 254 nm, utilizando dois canais (A e B), sendo o canal A (94%) contendo solução tampão e 6% acetonitrila, e o canal B possuía solução composta por 80% acetonitrila, 20% água milli-Q e 0,02% EDTA. A análise foi realizada em 46 minutos, fluxo 0,3 mL/min. Os resultados da análise foram dados em comparação com a análise do padrão para calcular a concentração de GABA. O limite de detecção para o GABA foi de 20 pg.

3.3.9 Análise Estatística

Para as análises estatísticas foi empregado o programa GraphPad Prism 6,01® (GraphPad software Inc., San Diego, Ca, USA). A homocedasticidade foi verificada por meio do teste F ou de Bartlett. A normalidade foi conferida pelo teste de Brown-Forsythe. Para os dados paramétricos comparando-se mais de dois grupos foi utilizada a ANOVA de uma ou de

duas vias, sendo esta última empregada quando existiam dois fatores (tempo e tratamento) para serem avaliados. Quando se empregou a ANOVA de uma via foram utilizados os testes de comparações múltiplas de Dunnett ou Turkey para indicar as diferenças entre os grupos. Após a ANOVA de duas vias empregou-se como pós-teste, o de Sidak. Para a análise não paramétrica foi utilizado Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn.

Em todas as análises as diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, média $\pm$ erro padrão ou como mediana e respectivos limites mínimo e máximo.

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE IVERMECTINA NA COORDENAÇÃO MOTORA OBSERVADA EM TRAVE ELEVADA

Foram empregados 30 ratos machos, os quais foram treinados na trave elevada. Dentre esses animais, 21 conseguiram, em 7 dias, fazer o percurso de duas travessias completas dentro do período de 5 minutos. Esses animais foram distribuídos em três grupos, sendo dois experimentais e um controle. Os ratos dos grupos experimentais receberam 0,2 (N=6) ou 1,0 (N=7) mg/kg de ivermectina, por via IP; os ratos do grupo controle (N=8) receberam pela mesma via 1,0 ml/kg de solução controle. Após 15 minutos e 24 horas da administração de ivermectina ou solução controle, foi feita a avaliação da coordenação motora, conforme descrito no item 3.3.1.

A tabela 1 e a figura 9 mostram os efeitos da administração de ivermectina na coordenação motora dos ratos observados na trave elevada. Tanto aos 15 minutos, como às 24 horas o teste de Kruskal-Wallis mostrou diferenças significantes entre os grupos ($KW_{15min}=9,836$, $p=0,003$; $KW_{24h}=10,730$, $p=0,016$) e o teste de Dunn mostrou aumento da soma de escores dos grupos 0,2 e 1,0 mg/kg de ivermectina em relação ao grupo controle.

Tabela 1 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) na coordenação motora de ratos observados em trave elevada, após 15 minutos e 24 horas da administração. São apresentadas as medianas da soma dos escores e os respectivos limites inferior e superior. N = número de animais/ grupo

Tempo após administração	Controle (N=8)	Ivermectina (mg/kg)	
		0,2 (N=6)	1,0 (N=7)
15 minutos	7,0 (5 - 13)	14,0 (11 - 25)*	13,5 (9 - 18)*
24 horas	5,0 (1 - 6)	8,0 (7 - 21)*	11,0 (3 - 19)*

* $p<0,01$, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, em relação ao controle.

Fonte: (MOREIRA, 2014).

Figura 9 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (C = controle – 1,0 ml/kg) na coordenação motora de ratos observados em trave elevada, após 15 minutos e 24 horas da administração. N = 6 - 8 animais/grupo

Legenda: C = controle; 0,2 = 0,2 mg/kg; 1,0 = 1,0 mg/kg.

Nota: * $p < 0,01$, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, em relação ao controle.

Fonte: (MOREIRA, 2014).

4.2 EXPERIMENTO 2: EFEITOS DA IVERMECTINA NA MOTIVACAO SEXUAL DE MACHOS

Foram empregados 30 ratos machos, os quais foram distribuídos em três grupos iguais de 10 ratos cada, sendo dois experimentais e um controle. Os ratos dos grupos experimentais receberam 0,2 ou 1,0 mg/kg de ivermectina, por via IP; os ratos do grupo controle receberam pela mesma via 1,0 ml/kg de solução controle. Após 15 minutos e 24 horas da administração de ivermectina ou solução controle, foi feita a avaliação da motivação sexual dos ratos, conforme descrito no item 3.3.2.

A tabela 2 e a figura 10 mostram os efeitos da administração de ivermectina nos parâmetros da motivação sexual dos ratos. A ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significantes em nenhum dos parâmetros da motivação sexual, tanto em relação aos grupos, como em relação ao tempo.

Tabela 2 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) na motivação sexual de ratos, após 15 minutos e 24 horas da administração. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão. N = número de animais/grupo

Tempo após administração	Parâmetros	Controle (N=10)	Ivermectina (mg/kg)	
			0,2 (N=10)	1,0 (N=10)
15 minutos	Frequência ZIM	17,11±5,67	18,90±5,38	18,20±7,60
	Frequência ZIF	15,10±4,84	17,60±3,01	16,00±6,91
	Tempo total ZIM (s)	442,11±124,39	462,90±72,54	609,11±212,31
	Tempo total ZIF (s)	392,36±161,84	358,90±74,31	394,89±199,16
24 horas	Frequência ZIM	22,00±6,68	19,56±4,30	20,29±11,97
	Frequência ZIF	20,67±6,04	22,22±6,59	13,80±5,14
	Tempo total ZIM (s)	609,60±382,21	299,00±139,59	327,00±134,08
	Tempo total ZIF (s)	305,13±82,21	403,22±232,64	368,70±211,74

p>0,05, ANOVA de duas vias.

Fonte: (MOREIRA, 2014).

Figura 10 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (controle – 1,0 ml/kg) em parâmetros da motivação sexual de ratos, após 15 minutos e 24 horas da administração. N = 10 ratos/grupo

Legenda: ZIM = zona de incentivo do macho, ZIF = zona de incentivo da fêmea.

Nota: * $p < 0,05$, ANOVA de duas vias seguido do teste de Sidak, em relação ao controle.

Fonte: (MOREIRA, 2014).

4.3 EXPERIMENTO 3: EFEITOS DA IVERMECTINA NA ERECAO PENIANA INDUZIDA PELA APOMORFINA

Foram empregados 18 ratos machos, os quais foram distribuídos em três grupos iguais de 6 ratos cada, sendo dois experimentais e um controle. Os ratos dos grupos experimentais receberam 0,2 ou 1,0 mg/kg de ivermectina, por via IP; os ratos do grupo controle receberam pela mesma via 1,0 ml/kg de solução controle. Após 15 minutos e 24 horas da administração de ivermectina ou solução controle, foi feita a administração de 50 µg/kg de apomorfina, por via SC, dando início a observação da ereção peniana, conforme descrito em 3.3.3.

A tabela 3 e a figura 11 mostram os efeitos da administração de ivermectina nos parâmetros da ereção peniana. Tanto aos 15 minutos, como às 24 horas não foram observadas diferenças significantes entre os grupos para os escores de latência para a primeira ereção peniana (teste de Kruskal-Wallis) e no número de ereções (ANOVA de duas vias). Quanto ao bocejo, a ANOVA de duas vias mostrou diferenças entre os grupos apenas no número de bocejo [$F(2,30)=4,580$, $p<0,0184$], sem alteração no tempo e interação entre os grupos no número de bocejos; o teste de Sidak revelou aumento deste parâmetro na dose de 0,2 mg/kg no tempo de 15 minutos. Quanto à latência para o primeiro bocejo a ANOVA não mostrou diferenças significantes entre os grupos.

Tabela 3 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) na ereção peniana. Após 15 minutos e 24 horas da administração de ivermectina ou solução controle, foi induzida a ereção peniana pela administração de 50 µg/kg de apomorfina, por via subcutânea. São apresentadas as medianas e respectivos limites dos escores da latência para a 1ª ereção peniana (EP) e para os demais parâmetros, as médias e os respectivos desvios padrão. N = número de animais/grupo

Tempo após administração	Parâmetros	Controle (N=6)	Ivermectina (mg/kg)	
			0,2 (N=6)	1,0 (N=6)
15 minutos	Escore da latência 1ª EP	1,0 (1 - 2)	1,0 (1 - 2)	1,0 (1 - 7)
	Nº EP	2,67±1,63	3,67±0,82	2,83±2,32
	Latência 1º bocejo (min)	9,83±4,62	6,67±1,51	6,17±2,40
	Nº bocejos	21,00±8,10	52,83±6,79**	25,33±19,64
24 horas	Escore da latência 1ª EP	1,0 (1 - 2)	1,0 (1 - 1)	1,5 (1 - 2)
	Nº EP	4,50±2,59	4,00±0,89	3,17±1,33
	Latência 1º bocejo (min)	5,50±1,76	5,67±1,03	6,50±2,35
	Nº bocejos	36,33±16,07	39,00±12,25	39,00±20,03

**p<0,01, ANOVA de duas vias seguida do teste de Sidak.

Fonte: (MOREIRA, 2014).

Figura 11 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou não (controle – 1,0 mL/kg) na latência para a primeira ereção peniana, no número de ereções penianas, na latência para o primeiro bocejo e no número de bocejos, após 15 minutos e 24 horas da administração. São apresentadas as medianas e respectivos limites dos escores da latência para a 1ª ereção peniana (EP) e para os demais parâmetros, as médias e os respectivos desvios padrão. N = 6 ratos/grupo

Legenda: EP = ereção peniana.

Nota: ** $p < 0,01$, ANOVA de duas vias seguida do teste de Sidak, em relação ao controle.

Fonte: (MOREIRA, 2014).

4.4 EFEITOS DA IVERMECTINA NO COMPORTAMENTO SEXUAL EM FEMEAS, EM CICLO ESTRAL FARMACOLOGICO E FISIOLOGICO

4.4.1 Experimento 4: efeitos da ivermectina no comportamento sexual de fêmeas, em ciclo estral farmacológico

Foram empregadas 30 ratas, as quais foram distribuídas em três grupos iguais de 10 ratas cada, sendo dois experimentais e um controle. As ratas dos grupos experimentais receberam 0,2 ou 1,0 mg/kg de ivermectina, por via IP; as ratas do grupo controle receberam pela mesma via 1,0 ml/kg de solução controle. Independente do grupo, em cada uma das ratas foi administrado 0,5 mg/kg de valerato de estradiol, 24 horas antes do experimento, para induzir o cio. No dia seguinte, após os 15 minutos da administração de ivermectina ou solução controle, foi avaliado o comportamento sexual, conforme descrito no item 3.3.5.

A tabela 4 mostra os escores obtidos em cada uma das montas das ratas dos grupos controle e experimentais. O teste de Kruskal-Wallis mostrou diferença significativa na intensidade da lordose de ratas entre os grupos na primeira (KW=13,70, $p<0,001$), na segunda (KW=9,49, $p=0,009$), na terceira (KW=8,18, $p=0,01$), na quinta (KW=6,12, $p=0,04$), na oitava (KW=6,58, $p=0,04$) e décima (KW=8,04, $p=0,02$) montas. O teste de Dunn indicou que houve diminuição na intensidade de lordose das ratas tratadas com 0,2 mg/kg de ivermectina na primeira e terceira montas, enquanto as ratas tratadas com a maior dose de ivermectina mostraram redução na intensidade de lordose na primeira, segunda, quinta, oitava e décima montas, em relação ao grupo controle.

Tabela 4 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle), após 15 minutos da administração, na intensidade de lordose de ratas, em cada uma das 10 montas. O cio foi induzido com 0,5 mg/kg de valerato de estradiol, via SC, 24 horas antes da avaliação comportamental. São apresentadas as medianas dos escores e os respectivos limites inferior e superior. N = número de animais/grupo

Monta	Controle (N=10)	Ivermectina (mg/kg)	
		0,2 (N=10)	1,0 (N=10)
1º	3,0 (0)	0,0 (0 - 3)**	0,0 (0 - 3)**
2º	3,0 (2 - 3)	3,0 (0 - 3)	2,5 (0 - 3)*
3º	3,0 (0)	1,5 (0 - 3)*	2,0 (0 - 3)
4º	3,0 (0 - 3)	3,0 (0 - 3)	1,0 (0 - 3)
5º	3,0 (2 - 3)	3,0 (0 - 3)	3,0 (0 - 3)*
6º	3,0 (0)	3,0 (0 - 3)	3,0 (0 - 3)
7º	3,0 (0)	3,0 (0 - 3)	2,5 (0 - 3)
8º	3,0 (0)	3,0 (0 - 3)	3,0 (0 - 3)*
9º	3,0 (2 - 3)	3,0 (0 - 3)	3,0 (0 - 3)
10º	3,0 (0)	3,0 (0 - 3)	2,0 (0 - 3)*

**p<0.01, * p<0.05, teste de Kruskall-Wallis seguido do teste de Dunn.

Fonte: (MOREIRA, 2014).

A tabela 5 e a figura 12 mostram os efeitos da administração de ivermectina, após 15 minutos, no comportamento sexual de ratas, em ciclo estral farmacológico. No coeficiente de lordose, o teste de Kruskal-Wallis mostrou diferenças significantes entre os grupos (KW=8,71, p=0,013; Figura 12A) e o teste de Dunn revelou diminuição neste parâmetro nas ratas tratadas com 1,0 mg/kg de ivermectina, em relação ao grupo controle (p<0,05). Em relação à intensidade de lordose, o teste de Kruskal-Wallis mostrou diferenças entre os grupos (KW=11,04, p=0,004; Figura 12B) e o teste de Dunn revelou redução deste parâmetro em ratas do grupo 1,0 mg/kg em relação ao grupo controle (p<0,01). Quanto à porcentagem de ratas que apresentaram lordose intensa, o teste de Kruskal-Wallis mostrou diferenças entre os grupos e o teste de Dunn revelou diminuiu em ambos os grupos tratados com a ivermectina (p<0,001; Figura 12C), em relação ao grupo controle. Quanto ao número de ratas que exibiram o comportamento de lordose, o teste de Kruskal-Wallis não mostrou diferenças entre os grupos (p>0,05; Figura 12D).

Tabela 5 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle), após 15 minutos da administração. O cio foi induzido com 0,5 mg/kg de valerato de estradiol, via SC, 24 horas antes da avaliação comportamental. São apresentados as medianas e respectivos limites. N = número de animais/grupo

Tempo após administração	Parâmetros	Controle (N=6)	Ivermectina (mg/kg)	
			0,2 (N=6)	1,0 (N=6)
15 minutos	Coefficiente de lordose (%)	100 (80 – 100)	90 (40 – 100)	80 (20 – 100)*
	Escore da intensidade de lordose	30,0 (23 - 30)	24,5 (0 - 29)	22,0 (0 - 30)*
	Lordose intensa	10 (0 - 10)	0 (0 - 0)***	0 (0 - 10)***
	Fêmeas que apresentaram lordose (%)	100 (100 – 100)	90 (40 – 100)	90 (20 – 100)

***p<0.01, * p<0.05, teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

Fonte: (MOREIRA, 2014).

Figura 12 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou não (controle – 1,0 mL/kg) no comportamento sexual de ratas, após 15 minutos. São apresentadas as medianas e respectivos limites. N = 10 ratas/grupo

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, teste de Kruskal-Wallis, seguido por teste de Dunn, em relação ao controle.

Fonte: (MOREIRA, 2014).

4.4.2 Experimento 5: efeitos da ivermectina no comportamento sexual de fêmeas, em ciclo estral fisiológico

Foram empregadas 30 ratas, as quais foram distribuídas em três grupos iguais de 10 ratas cada, sendo dois experimentais e um controle. As ratas dos grupos experimentais receberam 0,2 ou 1,0 mg/kg de ivermectina, por via IP; as ratas do grupo controle receberam pela mesma via 1,0 ml/kg de solução controle. Foi realizado em cada uma das ratas no período da manhã o esfregaço vaginal para verificar a fase do ciclo estral, conforme descrito no item 3.3.4. Uma vez examinado o ciclo estral, após os 15 minutos da administração de ivermectina ou solução controle, foi avaliado o comportamento sexual das fêmeas; este foi feito de maneira idêntica àquela descrita no item 3.3.5.

A tabela 6 mostra os escores obtidos em cada uma das montas das ratas dos grupos experimentais e controle. O teste de Kruskal-Wallis mostrou diferença significativa na intensidade de lordose de ratas entre os grupos na segunda monta (KW=6,67, $p<0,03$), na sexta monta (KW=8,78, $p=0,01$), sétima monta (KW=9,78, $p=0,008$) e oitava monta (KW=7,72, $p=0,02$). O teste de Dunn indicou que houve diminuição na intensidade de lordose das ratas tratadas com 0,2 ou 1,0 mg/kg de ivermectina na segunda, terceira, sexta, sétima e oitava montas, enquanto as ratas tratadas com a maior dose de ivermectina mostraram redução na intensidade de lordose na segunda, quinta, sexta, sétima, oitava e décima montas, em relação ao grupo controle.

Tabela 6 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) na intensidade de lordose de ratas, em cada uma das 10 montas, após 15 minutos da administração. A avaliação comportamental foi observada na fase estro do ciclo estral. São apresentadas as medianas dos escores e os respectivos limites inferior e superior. N = 10 animais/grupo

Montas	Controle	Ivermectina (mg/kg)	
	(N=10)	0,2 (N=10)	1,0 (N=10)
1 ^a	3.0 (0-3)	1 (0-3)	1.5 (0-3)
2 ^a	3.0 (0)	1.5 (0-3)*	2.0 (0-3)*
3 ^a	3.0 (2-3)	2.0 (0-3)*	2.0 (0-3)
4 ^a	3.0 (0-3)	2.0 (0-3)	1.0 (0-3)
5 ^a	3.0 (0-3)	1.5 (0-3)	1.0 (0-3)*
6 ^a	3.0 (0)	1.5 (0-3)**	1.5 (0-3)**
7 ^a	3.0 (0-3)	1.0 (0-3)**	1.5 (0-3)**
8 ^a	3.0 (0)	1.0 (0-3)**	1.0 (0-3)**
9 ^a	3.0 (2-3)	1.0 (0-3)	1.0 (0-3)
10 ^a	3.0 (0)	1.5 (0-3)	1.0 (0-3)*

*p < 0.05, **p < 0.01, teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

Fonte: (MOREIRA, 2014).

A tabela 7 e a figura 13 mostram os efeitos da administração de ivermectina no comportamento sexual de ratas, em ciclo estral fisiológico, após 15 minutos da administração. No coeficiente de lordose, o teste de Kruskal-Wallis não mostrou diferenças significantes entre os grupos (KW=1,87, p=0,39; Figura 13A). Em relação à intensidade de lordose, o teste de Kruskal-Wallis mostrou diferenças entre os grupos (KW=6,13, p=0,04; Figura 13B) e o teste de Dunn revelou diminuição neste parâmetro nas ratas tratadas com 0,2 e 1,0 mg/kg de ivermectina, em relação ao grupo controle (p<0,05). Quanto à porcentagem de ratas que apresentaram lordose intensa, o teste de Kruskal-Wallis mostrou diferenças entre os grupos e o teste de Dunn revelou diminuição em ambos os grupos tratados com a ivermectina (p < 0,001; Figura 13C), em relação ao grupo controle. Quanto ao número de ratas que exibiram o

comportamento de lordose, o teste de Kruskal-Wallis não mostrou diferenças entre os grupos ($p > 0,05$; Figura 13D).

Tabela 7 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle), após 15 minutos da administração. A avaliação do comportamento foi realizada na fase estro do ciclo estral. São apresentados as medianas e respectivos limites. N = número de animais/grupo

Tempo após administração	Parâmetros	Controle	Ivermectina (mg/kg)	
		(N=6)	0,2 (N=6)	1,0 (N=6)
15 minutos	Coefficiente de lordose (%)	100 (70 – 100)	90 (0 – 100)	80 (0 – 100)
	Escore da intensidade de lordose	30 (21 - 30)	14 (0 - 29)*	15 (0 - 30)*
	Lordose intensa	10 (0 - 10)	0 (0 - 0)***	0 (0 - 10)***
	Fêmeas que apresentaram lordose (%)	100 (100 – 100)	90 (40 – 100)	90 (20 – 100)

*** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

Fonte: (MOREIRA, 2014).

Figura 13 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou não (controle - 1,0 ml/kg) no comportamento sexual de ratas, após 15 minutos. São apresentadas as medianas e respectivos limites. N = 10 ratas/grupo

Nota: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, teste de Kruskal-Wallis, seguido por teste de Dunn, em relação ao controle.

Fonte: (MOREIRA, 2014).

4.4.3 Experimento 6: comparação dos efeitos da ivermectina sobre a intensidade de lordose das ratas com ciclo estral farmacológico e fisiológico

Neste Experimento foram considerados os escores de intensidade de lordose das ratas dos Experimentos 4 e 5; foram comparados os efeitos da ivermectina sobre a intensidade de lordose das ratas com ciclo estral farmacológico e fisiológico, nas 10 montas. Assim, a tabela 8 e a figura 14 mostram os efeitos da ivermectina no comportamento sexual de ratas em ciclo estral farmacológico e fisiológico, após 15 minutos da administração. Quanto à ausência de lordose, a ANOVA de duas vias mostrou diferenças significantes apenas entre os ciclos estrais [$F(2,52)=8,207$, $p=0,0008$; Figura 14A) e o teste de Bonferroni ($p<0,05$) revelou aumento neste parâmetro nas ratas tratadas com 0,2 e 1,0 mg/kg de ivermectina, tanto em ciclo estral farmacológico como fisiológico, em relação ao grupo controle. Em relação à lordose moderada, a ANOVA de duas vias mostrou diferenças significantes entre o ciclo estral [$F(2,5)=6,135$, $p=0,0041$; Figura 17B] e os grupos [$F(2,5)=6,135$, $p=0,0041$; Figura 14B], sem interação entre os fatores; o teste de Bonferroni ($p<0,05$) revelou aumento neste parâmetro na dose de 1,0 mg/kg de ivermectina, no ciclo estral fisiológico, em relação ao grupo controle. Quanto à lordose normal, a ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significantes em nenhum dos parâmetros observados ($p>0,05$; Figura 14C). Quanto à lordose exagerada, a ANOVA de duas vias mostrou diferenças significantes apenas entre os grupos [$F(2,52)=16,22$, $p<0,0001$; Figura 14D] e o teste de Bonferroni revelou aumento do comportamento da lordose intensa nas ratas dos grupos 0,2 e 1,0 mg/kg de ivermectina, tanto em ciclo estral farmacológico como fisiológico, em relação ao grupo controle.

Tabela 8 - Comparação dos efeitos da ivermectina sobre a intensidade de lordose das ratas com ciclo estral farmacológico e fisiológico (em 10 montas). Quinze minutos após a administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) foi observado o comportamento das ratas na fase de estro. São apresentados as médias e respectivos erros padrão; N = número de animais/grupo

Parâmetros	Controle	Ivermectina (mg/kg)	
		0,2	1,0
Ciclo estral farmacológico			
	(N=10)	(N=10)	(N=10)
Ausência de lordose	0,1±0,10	3,0±0,93*	3,9±1,13*
Lordose moderada	0,0±0,00	0,2±0,13	0,5±0,31
Lordose normal	1,2±0,87	0,8±0,20	0,9±0,31
Lordose intensa	9,6±0,16	6,1±1,00*	4,7±1,25*
Ciclo estral fisiológico			
	(N=10)	(N=10)	(N=10)
Ausência de lordose	0,4±0,3	5,4±1,5*	2,1±1,3*
Lordose moderada	0,00±0,00	0,60±0,33	3,75±1,83*
Lordose normal	0,60±0,42	1,30±0,20	0,63±0,4
Lordose intensa	9,00±0,51	2,80±1,18*	3,75±1,49*

*p<0,001, ANOVA, seguido por teste de Bonferroni

Fonte: (MOREIRA, 2014).

Figura 14 - Comparação dos efeitos da ivermectina sobre a intensidade de lordose das ratas com ciclo estral farmacológico e fisiológico (em 10 montas). Quinze minutos após a administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) foi observado o comportamento das ratas na fase de estro. São apresentados as médias e respectivos erros padrão. N = 10 ratas/grupo

Nota: * $p < 0,001$, ANOVA, seguido por teste de Bonferroni, em relação ao controle.

Fonte: (MOREIRA, 2014).

4.5 EXPERIMENTO 7: EFEITOS DA IVERMECTINA NO PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS, NO ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO E ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Neste experimento foram empregados os ratos provenientes do Experimento 1, os quais foram devidamente pesados e avaliados quanto ao peso relativo dos órgãos, o índice gonadossomático e estudo histopatológico, conforme descrito nos itens 3.3.6.

A tabela 9 e a figura 15 mostram a avaliação do peso relativo dos órgãos e o índice gonadossomático de ratos machos após 24 horas da administração de ivermectina. Quanto ao peso relativo dos órgãos, a ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes entre os grupos [$F(2,18)=8,407$, $p<0,05$] e o teste de Dunnett revelou aumento do peso relativo do fígado nos animais tratados com 0,2 e 1,0 mg/kg de ivermectina, em relação ao grupo controle. Em relação ao índice gonadossomático, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos.

O estudo histopatológico, realizado em microscopia de luz, não revelou alterações em nenhum dos tecidos investigados.

Tabela 9 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) no peso relativo dos órgãos (fígado, próstata, testículos, epidídimos e vesícula seminal) e no índice gonadosomático (IGS) de ratos, após 24 horas da administração. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão. N = número de animais/grupo

Órgão	Controle (N=8)	Ivermectina (mg/kg)	
		0,2 (N=6)	1,0 (N=7)
Fígado	2,15±0,29	2,55±0,19*	2,58±0,23*
Próstata	0,04±0,02	0,05±0,01	0,05±0,02
Testículo direito	0,50±0,02	0,52±0,07	0,51±0,02
Testículo esquerdo	0,51±0,02	0,52±0,05	0,51±0,03
Epidídimo direito	0,17±0,01	0,17±0,02	0,16±0,02
Epidídimo esquerdo	0,17±0,02	0,16±0,02	0,16±0,01
Vesícula seminal cheia	0,26±0,04	0,28±0,04	0,28±0,05
Vesícula seminal vazia	0,11±0,03	0,12±0,02	0,13±0,02
IGS (♂)	0,29±0,02	0,29±0,06	0,29±0,04

*p<0,05, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.

Fonte: (MOREIRA, 2014).

Figura 15 - Peso relativo dos órgãos e índice gonadossomático de ratos machos após 24 horas da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou não (controle – 1,0 ml/kg). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão. N = 6 - 8 animais/grupo

Nota: * $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett, em relação ao controle.

Fonte: (MOREIRA, 2014).

4.6 EXPERIMENTO 8: EFEITOS DA IVERMECTINA NO NÍVEL DE TESTOSTERONA NO SANGUE

Neste experimento foram empregados os ratos provenientes do Experimento 1, os quais foram devidamente pesados e avaliados quanto os níveis séricos de testosterona, conforme descrito nos itens 3.3.7.

A tabela 10 e a figura 16 mostram a avaliação dos níveis séricos de testosterona de ratos machos após 24 horas da administração de ivermectina. A ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes entre os grupos [$F(2,18)=4,372$, $p=0,0283$] e o teste de Dunnett revelou redução do nível de testosterona na dose de 1,0 mg/kg, em relação ao grupo controle.

Tabela 10 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) na concentração de testosterona no sangue de ratos machos, após 24 horas da administração. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão. N = número de animais/grupo

Controle (N=8)	Ivermectina (mg/kg)	
	0,2 (N=6)	1,0 (N=7)
37,59±21.67	21,99±18.31	11,63±7,329*

* $p<0,05$, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett

Fonte: (MOREIRA, 2014).

Figura 16 - Avaliação dos níveis séricos de testosterona de ratos machos após 24 horas da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou não (controle – 1,0 ml/kg). N = 6 – 8 animais

Nota: * $p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Dunnett, em relação aos controles

Fonte: (MOREIRA, 2014).

4.7 EXPERIMENTO 9: EFEITOS DA IVERMECTINA NOS NÍVEIS DE NEUROTRANSMISSORES CEREBRAIS E SEUS METABÓLITOS

Neste experimento foram empregados os ratos provenientes do Experimento 1, os quais foram avaliados quanto aos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos, conforme descrito nos itens 3.3.8.

A tabela 11, a figura 17 e 18 mostra a avaliação dos níveis de neurotransmissores e metabólitos após 24 horas da administração de ivermectina. No hipotálamo, a ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes entre os grupos nos níveis de 5 HT [$F(2,15)=12,53$, $p < 0,05$] e seu metabólito 5 HIAA [$F(2,16)=16,73$, $p < 0,05$], bem como nos níveis de GABA [$F(2,20)=12,15$, $p < 0,05$]. No estriado, a ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes entre os grupos nos níveis de 5 HT [$F(2,18)=21,75$, $p < 0,05$] e seu metabólito 5 HIAA [$F(2,18)=38,59$, $p < 0,05$], bem como nos níveis de DOPAC [$F(2,18)=44,88$, $p < 0,05$] e GABA [$F(2,19)=7,43$, $p < 0,05$]. O teste Dunnett mostrou redução de 5 HT no hipotálamo na dose de 0,2 mg/kg, e no estriado houve redução em ambas as doses empregadas; os níveis de 5 HIAA estavam reduzidos no hipotálamo em ambas as doses e no estriado apenas na menor dose; os níveis de DOPAC estavam reduzidos no estriado em ambas as doses empregadas; os níveis de GABA estavam reduzidos no hipotálamo em ambas as doses e no estriado apenas na menor.

Tabela 11 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) nos níveis de neurotransmissores e seus metabólicos (ng/g de tecido), no hipotálamo e estriado de ratos machos, após 24 horas da administração. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão. GABA=ácido gama aminobutírico; 5HT=serotonina e seu metabólito 5HIAA=ácido 5 hidroxí-indolacético; DA=dopamina e seu metabólito DOPAC=ácido di-hidróxi-fenilacético; NOR=noradrenalina e seu metabólito VMA=ácido vanilmandélico. N = número de animais/grupo

Parâmetro	Controle (N=8)	Ivermectina (mg/kg)	
		0,2 (N=6)	1,0 (N=7)
Hipotálamo			
GABA	0,40±0,06	0,240±0,09*	0,309±0,06*
5HT	1894,10±433,76	954,200±274,28*	1720,38±295,54
5HIAA	2648,63±643,33	1012,57±311,10*	1895,82±502,88*
5HIAA/5HT	1,46±0,20	1,07±0,17*	1,11±0,26*
DA	248,79±79,59	298,55±358,33	337,26±107,51
DOPAC	65,29±23,81	69,48±62,20	59,34±30,09
DOPAC/DA	0,31±0,05	0,13±0,03*	0,18±0,09*
NOR	1226,35±254,50	1211,20±356,25	1511,18±378,99
VMA	297,09±79,97	209,67±61,45	305,18±64,72
VMA/NOR	0,29±0,11	0,18±0,06	0,21±0,08
Estriado			
GABA	0,42±0,06	0,32±0,02*	0,41±0,06
5HT	936,55±204,67	373,68±140,04*	608,86±110,04*
5HIAA	2944,86±351,76	1573,73±185,18*	2786,34±333,20
5HIAA/5HT	3,52±0,69	4,64±1,66	4,68±0,85
DA	5949,78±469,87	5466,13±725,62	6418,90±467,06
DOPAC	1349,15±225,59	737,92±108,34*	1786,90±223,65*
DOPAC/DA	0,24±0,04	0,14±0,01*	0,28±0,04
NOR	140,90±72,72	234,35±108,84	185,24±66,83
VMA	280,59±84,09	246,93±62,64	277,87±75,63
VMA/NOR	3,40±1,30	1,18±0,43*	2,91±2,41

*p <0,05, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett, em relação ao controle

Fonte: (MOREIRA, 2014).

Figura 17 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) nos níveis de neurotransmissores e seus metabólicos (ng/g de tecido), no hipotálamo de ratos machos, após 24 horas da administração. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão. GABA=ácido gama aminobutírico; 5HT=serotonina e seu metabólito 5HIAA=ácido 5 hidróxi-indolaacético; DA=dopamina e seu metabólito DOPAC=ácido di-hidróxi-fenilacético; NOR=noradrenalina e seu metabólito VMA=ácido vanilmandélico. N=6 - 8 animais

Nota: *p < 0,05, ANOVA seguida do teste de Dunnett, em relação ao controle.

Fonte: (MOREIRA, 2014).

Figura 18 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg – grupo controle) nos níveis de neurotransmissores e seus metabólicos (ng/g de tecido), no estriado de ratos machos, após 24 horas da administração. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão. GABA=ácido gama aminobutírico; 5HT=serotonina e seu metabólito 5HIA=ácido 5 hidróxi-indolacético; DA=dopamina e seu metabólito DOPAC=ácido di-hidróxi-fenilacético; NOR=noradrenalina e seu metabólito VMA=ácido vanilmandélico. N=6 - 8 animais

Nota: *p < 0,05, ANOVA seguida do teste de Dunnett, em relação ao controle.

Fonte: (MOREIRA, 2014).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foram usadas as doses de 0,2 e 1,0 mg/kg de uma formulação comercial de ivermectina para avaliar seus efeitos no comportamento sexual de ratos e ratas. Estas doses foram escolhidas considerando que a primeira é a dose usualmente empregada em clínica para diferentes espécies animais e a segunda foi escolhida considerando os resultados obtidos por Bernardi et al. (2011). Neste trabalho, os autores observaram que a dose de 1,0 mg/kg (5x a dose terapêutica), administrada por via IP, foi capaz de aumentar a latência para a primeira monta e intromissão, sendo atribuído esse efeito ao prejuízo na fase apetitiva do comportamento sexual de ratos machos.

As observações comportamentais, no presente estudo, foram realizadas aos 15 minutos após a administração de ivermectina, uma vez que esse período de tempo foi empregado em estudo anterior (BERNARDI et al., 2011), e o período de 24 horas após administração foi escolhido porque a meia-vida da ivermectina que é de 24 a 48 horas (JACKSON, 1989; CHIU et al., 1990).

Os modelos comportamentais são úteis para mostrar os efeitos de diferentes substâncias químicas sobre o sistema nervoso central. Por isso, no presente trabalho alguns modelos foram empregados para estudar os possíveis efeitos centrais da ivermectina, em particular, na coordenação motora, na motivação e no desempenho sexual de ratos machos e no comportamento sexual de ratas.

A coordenação motora dos ratos avaliada na trave elevada permitiu a observação fácil e direta do comportamento exibido pelo animal. Foi possível constatar que a ivermectina prejudicou a coordenação motora dos animais. Este efeito foi observado na menor dose de ivermectina (0,2 mg/kg), após 15 minutos da administração, permanecendo até às 24 horas; a maior dose de ivermectina (1,0 mg/kg) foi capaz de prejudicar a coordenação motora após as 24 horas da administração. Achados semelhantes foram obtidos por Rodrigues-Alves et al. (2009), empregando a moxidectina (uma milbemicina que apresenta mecanismo de ação semelhante à ivermectina) (MEROLA; EUBIG, 2012), sendo observado prejuízo na coordenação motora de ratos após 24 e 72 horas da administração de 0,2, 2,0 e 20 mg/kg de moxidectina. Esses autores atribuíram este efeito a atuação da droga no sistema GABAérgico central, em particular, em receptores GABA_B. Sabe-se que os receptores GABA_A e GABA_B tem papel modulador no controle da locomoção, exercendo efeitos opostos na regulação desse comportamento (TEGNÉR et al., 1993; KRIEM et al., 1998; RODRIGUES-ALVES et al.,

2009). A estimulação do receptor GABA_B diminui a atividade locomotora, enquanto o receptor GABA_A não está envolvido com este efeito (PAREDES; AGMO, 1989). Ainda foi observado, no presente estudo, a diminuição da relação DOPAC/DA (*turnover* de dopamina), na dose de 0,2 mg/kg após 24 horas da administração, em particular na região estriatal, o que pode estar associado com a redução da função motora. De fato, a função motora está ligada diretamente à dopamina da região do estriado, por meio da participação de duas famílias de receptores: *D1-like* e *D2-like*; a primeira compreende os subtipos D1 e D5, e a *D2-like* os receptores D2, D3 e D4. Esses receptores (do tipo lento – GUYTON; HALL, 1997) exercem suas funções biológicas através da ligação e ativação de diferentes proteínas G (NEVES et al., 2004). Portanto, o prejuízo na coordenação motora provocado pela ivermectina pode ser atribuído a sua atuação em receptores GABA_B e ao sistema dopaminérgico estriatal.

Bernardi et al. (2011), avaliando o comportamento sexual de ratos machos, observaram que a administração de 0,6 e 1,0 mg/kg de ivermectina, via IP, aumentou a latência para a primeira monta e primeira intromissão após 15 minutos da administração, sendo atribuído esses efeitos a uma possível interferência na motivação sexual. Esses autores apontam que quando se observa o comportamento sexual de ratos machos, são analisados dois aspectos distintos: fase apetitiva (motivação ou libido) e fase consumatória (desempenho ou potência). A fase apetitiva é caracterizada pela facilidade pelo qual o comportamento sexual é ativado ou a libido gerada, enquanto a fase consumatória caracteriza-se pela execução dos atos copulatórios. Todavia, apesar da distinção destas fases estas estão intimamente relacionadas (AGMO; PAREDES, 1985).

No presente estudo, para testar a hipótese de que a ivermectina pode interferir na motivação, utilizou-se um modelo comportamental que analisa somente este aspecto do comportamento sexual de ratos machos. Deste modo, a literatura descreve que na motivação sexual quando ratos sexualmente inexperientes são expostos a um incentivo sexual (fêmea receptiva) e um incentivo social (macho), estes optam em permanecer junto ao incentivo sexual (AGMO, 2014). Os dados aqui obtidos não mostraram nenhuma alteração entre os grupos na motivação sexual; isso indica que o prejuízo no comportamento sexual não pode ser atribuído a aspectos motivacionais e, tão pouco, que a ivermectina seja capaz de prejudicar o estado motivacional dos ratos.

A ausência de efeitos da ivermectina na motivação sexual corroboram os achados de Rodrigues-Alves et al. (2008), no qual empregando a moxidectina nas doses de 0,2, 2,0 e 20 mg/kg, por via SC, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos na motivação sexual; porém, neste estudo não foi avaliado as concentrações de

neurotransmissores cerebrais. Por outro lado, no presente estudo foi avaliada a concentração de neurotransmissores no hipotálamo, região associada com o comportamento motivacional sexual e, em particular, com o sistema dopaminérgico, que tendo sua atividade reduzida, diminuiria o estado sexual motivacional (NEVES et al., 2004). Assim, foi observada redução da relação DOPAC/DA no hipotálamo de ratos expostos à ivermectina em ambas as doses, o que poderia causar redução da motivação sexual, fato aqui não observado. Todavia, a figura 10 mostra uma tendência de redução na frequência de entradas na ZIM e ZIF às 24 horas após a administração de ivermectina, o que pode sugerir redução da motivação sexual.

O sistema serotoninérgico também está envolvido com a manifestação do comportamento sexual e é regulado por várias áreas cerebrais. Os receptores da serotonina são divididos em sete tipos (5-HT₁₋₇), podendo estes serem inibitórios ou excitatórios, os quais podem ou não ser classificados em subtipos, e que diferem quanto a via de transdução de sinal e a sua distribuição. A maioria está ligada à proteína G, associada à adenilciclase ou a fosfolipase C, com exceção do tipo 5-HT₃ que é um canal iônico de sódio (HULL; MUSCHAMP; SATO, 2004).

Popova e Amstislavskaya (2002) levantaram a hipótese de que o receptor serotoninérgico do subtipo 5-HT_{1A} estaria envolvido na motivação sexual de camundongos machos induzidos por fêmeas sexualmente receptivas, uma vez que este receptor é relatado como principal responsável pelo estímulo da ejaculação e inibitório de ereções penianas (HULL; MUSCHAMP; SATO, 2004; SNOEREN et al., 2013). Esses autores observaram que o tratamento com 8-OH-DPAT (0,1, 0,25, 0,5 e 2,0 mg/kg), agonista do receptor 5HT_{1A}, induziu redução dose-dependente na quantidade de tempo gasto pelos camundongos machos perto da divisória onde a fêmea se encontrava, o que é considerado o principal padrão de motivação sexual. O tratamento com o p-MPPI (0,1, 0,2 e 0,4 mg/kg), antagonista do receptor 5HT_{1A}, apresentou efeito contrário ao agonista, contudo não mostrou diferença significativa nos parâmetros observados na motivação sexual de camundongos machos. Assim, considerando esses achados e que no presente estudo foi observada redução da atividade do sistema serotoninérgico hipotalâmico (redução da relação 5HIAA/5HT) de ratos expostos à ivermectina em ambas as doses, este fato pode sugerir que houve redução do estado motivacional sexual de machos.

Foi avaliado também, neste presente estudo, os efeitos da ivermectina sobre a fase consumatória (desempenho) do comportamento sexual de ratos. Para tanto, foi avaliada a ereção peniana induzida pela apomorfina em ratos expostos a ivermectina. A apomorfina é um agonista não seletivo de receptores dopaminérgicos, com maior afinidade aos receptores

da família *D2-like* do que nos receptores da família *D1-like* (*D2-like*>*D1-like*), e em baixas doses induz repetidos episódios de bocejo, ereção peniana e limpeza genital (*grooming* genital) em ratos (RODRIGUES-ALVES et al., 2008). Os dados aqui obtidos mostraram aumento no número de bocejos, na dose de 0,2 mg/kg após 15 minutos da administração de ivermectina. Deste modo, os resultados sugerem atuação da apomorfina em receptores dopaminérgicos *D2-like* induzindo os repetidos episódios de bocejo; porém, a ivermectina não foi capaz de interferir na fase consumatória (desempenho) do comportamento sexual. Zarrindast e Farahvash (1994), avaliando a participação dos receptores GABA_A e GABA_B na ereção peniana, sugeriram que agonistas desses receptores, respectivamente muscinol e baclofen, quando injetados no núcleo paraventricular do hipotálamo seriam capazes de inibir a ereção peniana de ratos induzida por apomorfina. Esses autores observaram diminuição da ereção peniana após a administração dos agonistas dos receptores GABA_A e GABA_B, indicando a participação do sistema GABAérgico no desempenho sexual de ratos machos, envolvendo esse receptores. Por outro lado, Rodrigues-Alves et al., 2008 observaram redução na frequência de ereções penianas e na concentração de GABA hipotalâmico em ratos tratados com 0,2 mg/kg de moxidectina, enquanto no presente estudo observou-se apenas redução nos níveis hipotalâmicos de GABA. Esses autores atribuíram às ações da moxidectina em mecanismos de liberação do GABA e não uma ação direta nos receptores GABAérgicos.

O sistema serotoninérgico participa também da modulação do desempenho sexual; foi observado que o receptor 5-HT_{1A} promove o estímulo da ejaculação e inibe as ereções penianas, enquanto o receptor 5-HT_{2C} tem efeito oposto (SNOEREN et al., 2013). Por outro lado, no presente estudo, foi observado diminuição da atividade do sistema serotoninérgico hipotalâmico (diminuição da relação 5HIAA/5HT), na dose de 0,2 e 1,0 mg/kg após 24 horas da administração de ivermectina, sem contudo interferir com a ereção peniana (desempenho sexual); portanto, não se pode especular sobre o envolvimento da ivermectina com o sistema serotoninérgico hipotalâmico.

Vale comentar aqui que, embora a ivermectina tenha prejudicado a coordenação motora dos ratos, esta não interferiu na motivação sexual e na ereção peniana dos animais, uma vez que não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos.

Em roedores uma característica relevante do comportamento de receptividade sexual da fêmea é a postura durante a cópula, denominada comportamento ou reflexo de lordose. Este movimento caracteriza-se por uma flexão dorsal da coluna vertebral em resposta a monta do macho, tendo papel importante na monta para a intromissão peniana (NELSON, 1995).

O comportamento de lordose é iniciado na presença de hormônios sexuais, estrógeno e

progesterona, e ocorre em resposta a informação sensorial tátil, normalmente provida pela monta do macho. Além de depender da ação dos hormônios esteróides gonadais, o comportamento de lordose é resultado de uma circuitaria neural e, por este motivo, muitas estruturas estão envolvidas na execução deste reflexo (AGMO; SORIA; PAREDES, 1989; NELSON, 1995). Assim, a medula espinhal é a estrutura que recebe as informações somatossensoriais durante a cópula e é responsável por modular a saída dos neurônios motores que resultam no movimento de lordose. A integração da informação da postura é realizada no tronco cerebral inferior. O mesencéfalo, por sua vez, recebe informações do hipotálamo e de outros locais do cérebro, traduz e integra estes sinais. O hipotálamo é a estrutura responsável por adicionar o componente endócrino ao mecanismo comportamento da lordose (NELSON, 1995).

No presente estudo, foram avaliados os efeitos da ivermectina no coeficiente de lordose e intensidade de lordose de ratas, em duas condições: no ciclo estral farmacológico e no ciclo estral fisiológico. No ciclo estral farmacológico, levantou-se a hipótese de que a ivermectina não seria capaz de inibir o comportamento de lordose a partir de uma atividade modulada pelos altos níveis séricos de estradiol (administração de 0,5 mg/kg valerato de estradiol), enquanto no ciclo estral fisiológico os níveis do hormônio são normais. Os resultados mostraram que, no ciclo estral farmacológico, houve diminuição no coeficiente de lordose na dose de 1,0 mg/kg de ivermectina após 15 minutos da administração; em relação à intensidade de lordose, observou-se diminuição do comportamento na dose de 0,2 mg/kg de ivermectina nas primeira e terceira montas, enquanto na dose de 1,0 mg/kg este efeito ocorreu na primeira, segunda, quinta, oitava e décima montas, sugerindo redução no desempenho desse comportamento. Quanto à lordose intensa, houve em ambas as doses diminuição neste parâmetro e não houve alteração no número de fêmeas que apresentaram lordose.

Os resultados obtidos na avaliação do comportamento sexual de ratas no ciclo estral fisiológico apresentaram um perfil semelhante aos das ratas no ciclo estral farmacológico. Assim, em relação ao coeficiente de lordose, ambas as doses de ivermectina não foram capazes de revelar qualquer alteração significativa. Quanto à intensidade de lordose, a dose de 0,2 mg/kg de ivermectina diminuiu o comportamento de lordose na segunda, terceira, sexta, sétima e oitava montas, enquanto as ratas tratadas com 1,0 mg/kg de ivermectina mostraram redução na intensidade de lordose nas segunda, quinta, sexta, sétima, oitava e décima montas. Assim como no ciclo estral farmacológico, as ratas do ciclo estral fisiológico observaram-se em ambas as doses diminuição da lordose intensa e não houve alteração no número de fêmeas que apresentaram lordose.

Comparando-se os efeitos da ivermectina sobre a intensidade de lordose das ratas com ciclo estral farmacológico e fisiológico, constatou-se que a ivermectina foi capaz de manifestar os seus efeitos independentemente da modulação do estradiol. Esse fato sugere possível interferência da ivermectina no comportamento de lordose e, assim, consequentemente, intervindo na ação dos hormônios esteróides gonadais (estrógeno e progesterona) e/ou na circuitaria neural. A respeito da circuitaria neuronal na manifestação do comportamento sexual de ratas, sugere-se a participação tanto do sistema GABAérgico, como o dopaminérgico. O primeiro sistema atua no controle da lordose dependente de hormônios esteróides, a partir de atuação em receptores GABA_A e GABA_B da área pré-óptica medial (WADA; YAMADA; YAMANOUCHI, 2008). O segundo é importante para o controle da fase apetitiva do comportamento sexual em ratas. A dopamina atua na área pré-óptica medial sobre os receptores *D1-like* e *D2-like* (GRAHAM; PFAUS, 2010). Portanto, pode-se sugerir que a redução do coeficiente e da intensidade de lordose em ratas expostas a ivermectina poderia ser consequência de sua ação sobre os sistemas GABAérgico e dopaminérgico. No presente estudo não foi feita a avaliação dos níveis de neurotransmissores cerebrais das ratas por causa da impossibilidade de conciliar a curta duração da fase do estro com a coleta das estruturas cerebrais, as quais ocorreram após 24 horas da administração da droga.

No presente estudo foram avaliados também o peso relativo de vários órgãos, o índice gonadossomático e o estudo histopatológico de alguns tecidos. Os dados obtidos mostraram apenas aumento no peso relativo do fígado em ratos tratados com 0,2 e 1,0 mg/kg de ivermectina; porém não foram encontradas alterações histopatológico neste tecido. Quanto ao índice gonadossomático, não foram observadas alterações entre os grupos.

Considerando que o comportamento sexual do macho é dependente de testosterona, no presente estudo foram avaliados os níveis séricos desse hormônio. Os resultados mostraram que 1,0 mg/kg de ivermectina foi capaz de reduzir os níveis séricos de testosterona. Esse achado, embora não justifique a ausência de efeitos da ivermectina na motivação sexual dos machos, corrobora àquele de Bernardi et al. (2011) que observaram prejuízo do comportamento sexual de ratos machos tratados com a mesma dose de ivermectina.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

A administração de ivermectina em ratos:

- Promoveu prejuízo na coordenação motora de machos;
- Não interferiu na motivação sexual e na ereção peniana de machos;
- Prejudicou o comportamento sexual de ratas;
- Não alterou o peso relativo dos testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal, porém aumento o peso relativo do fígado; não modificou o índice gonadossomático de machos, bem como não foram observadas alterações no estudo histopatológico;
- Reduziu os níveis séricos de testosterona de machos;
- Diminuiu os níveis de GABA hipotalâmico e estriatal, bem como reduziu a atividade dos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico hipotalâmicos e, no estriado, reduziu a atividade do sistema dopaminérgico.

Os resultados foram discutidos considerando a interferência da ivermectina nos sistemas de neurotransmissão central.

REFERÊNCIAS

AGMO, A. Animal models of female sexual dysfunction: basic considerations on drugs, arousal, motivation and behavior. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 121, p. 03–15, 2014.

AGMO, A.; PAREDES, R. GABAergic drugs and sexual behaviour in the male rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 112, p. 371-378, 1985.

AGMO, A.; SORIA, P.; PAREDES, R. GABAergic drugs and lordoses behavior in female rats. **Hormones and Behavior**, v. 23, p. 363-380, 1989.

ALMEIDA, M. A. O.; AYRES, M. C. O. Agentes antinematódeos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 453-465, 2006.

BERNARDI, M. M.; KIRSTEN, T. B.; SPINOSA, H. S.; MANZANO, H. Ivermectin impairs sexual behavior in sexually naïve, but not sexually experienced male rats. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 77-81, 2011.

BITRAN, D.; HULL, E. M. Pharmacological analysis of male rat sexual behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 11, p. 365-389, 1987.

BORGES, E. M.; BRANCO, E.; LIMA, A. R.; LEAL, L. M.; MARTINS, L. L.; REIS, A. C. G.; BRUZ, C.; MACGADO, M. R. F.; MIGLINO, M. A. Morfologia e topografia dos órgãos genitais masculinos externos da paca (*Cuniculus paca* Linnaeus, 1766). **Biotemas**, v. 26, p. 209-220, 2013.

BORMANN, J. The “ABC” of the GABA receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, p. 16-19, 2000.

BRASIL – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 17**, Brasília, 29 de Maio de 2013.

BURG, R. W.; MILLER, B. M.; BAKER, E. E.; BIRNBAUM, J.; CURRIE, S. A.; HARTMAN, R.; KONG, Y. L.; MONAGHAN, R. L.; OLSON, G.; PUTTER, I.; TUNAC, J. B.; WALLICK, H.; STAPLEY, E. O.; OIWA, R.; OMURA, S. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 15, p. 361-367, 1979.

CAMPBELL, W. C. **Ivermectin and Abamectin**. New York: Springer Verlag, 1989.

CHIU, S.H.L.; GREEN, M. L.; BAYLIS, F. P.; ELINE, D.; ROSEGAY, A.; MERIWETHER, H.; JACOB, T. A. Absorption, tissue distribution and excretion of tritium-labeled ivermectin in cattle, sheep and rat. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**, v. 38, p. 2072-2078, 1990.

DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS 2011/ 2012. Rio de Janeiro. EPUC, 2012.

DELAYTE, E. H.; OTSUKA, M.; LARSSON, C. E.; CASTRO, R. C. C. Efficacy of systemics macrocyclic lactones (ivermectin and moxidectin) for the treatment of generalized canine demodicosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 1, p. 31-38, 2006.

DELGADO, F. E. F.; LIMA, W. S.; CUNHA, A. P.; Bello, A. C. P. P.; DOMINGUES, L. N.; WANDERLEY, R. P. B.; LEITE, P. V. B.; LEITE, R. C. Cattle helminthiasis: farmers perception in Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, 2009.

FELICIO, L. F.; PALERMO-NETO, J.; NASELLO, A. G. Perinatal bromopride treatment: effects on sexual behavior of male and female rats. **Behavioral and Neural Biology**, v. 52, p. 145-151, 1989.

FELICIO, L. F.; FLÓRIO, J. C.; SIDER, L. H.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; BRIDGES, R. S. Reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopamine levels in pregnant rats. **Brain Research Bulletin**, v. 40, p. 253-256, 1996.

FERRI, R.; TODON, E. S. A. F.; CABRAL, D.; MOREIRA, N.; SPINOSA, H.S.; BERNARDI, M. M. Doramectin reduces sexual behavior and penile erection in male rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 39, p. 63-68, 2013.

GEARY, T. G. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. **Trends in Parasitology**, v. 21 n. 11, p. 530-532, 2005.

GERENUTTI, M.; SPINOSA, H. S. Avermectinas: revisão do uso e da ação sobre o SNC. **Biotemas**, n. 2, v. 10, p. 07-27, 1997.

GRAHAM, M. D.; PFAUS, J. G. Differential regulation of female sexual behaviour by dopamine agonists in the medial preoptic area. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 97, p. 284-92, 2010.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

HULL, E. M.; MUSCHAMP, J. W.; SATO, S. Dopamine and serotonin: influences on male sexual behavior. **Physiology & Behavior**, v. 83, p. 291-307, 2004.

JACKSON, H. Ivermectin as a systemic insecticide. **Parasitology Today**, v. 5, p. 146-155, 1989.

KRIEM, B.; CAGNIARD, B.; BOUQUET, C.; ROSTAIN, J. C.; ABRAINI, J. H., Modulation by GABA transmission in the substantia nigra compacta and reticulata of locomotor activity in rats exposed to high pressure. **Neuropharmacology and Neurotoxicology**, v. 9, p. 1343-1347, 1998.

HARDY, D. F.; DEBOLD, J. F. The relationship between levels of exogenous hormones and the display of lordosis by the female rat. **Hormones and Behavior**, v. 2, p. 287-297, 1971.

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

LEIPHEIMER, R. E.; SACHS, B. D. GABAergic regulation of penile reflexes and copulation in rats. **Physiology & Behavior**, v. 42, p. 351-357, 1988.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, p. 609-614, 2002.

MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.

MEISELL, R. L.; SACHS, B. D. The physiology of male sexual behavior. In KNOBILL, E.; NEILL, J.D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, p. 3-105, 1994.

MEROLA, V. M.; EUBIG, P. A. Toxicology of avermectinas and milbemycins (macrocylic lactones) and the role of P-Glycoprotein in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal**, v. 42, p. 313-333, 2012.

MORAGAS, W. M.; SCHNEIDER, M. O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos da Geografia**, v. 3, n. 10, p. 26-40, 2003.

NELSON, R. J. An introduction to behavioral endocrinology. 2^a ed. Sinaver Associates, Inc Publishers Sunderland, Massachussetts, 1995.

NEVES, G.; RATES, S. M. K.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Dopaminergic agents and erectile dysfunction treatment. **Química Nova**, v. 27, n. 6, 2004.

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

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde. (**Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**). Representação do Brasil. Brasília: OPAS, 1996.

PAREDES, R.; AGMO, A. Stereospecific actions of baclofen on sociosexual behavior, locomotor activity and motor execution. **Psychopharmacology**, v. 97, p. 358-364, 1989.

PAREDES, R.; AGMO, A. GABA and behavior: the role of receptor subtypes. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 16, p. 145-170, 1992.

POPOVA, N. K.; AMSTISLAVSKAYA, T. G. Involvement of the 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} serotonergic receptor subtypes in sexual arousal in male mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 27, p. 609-618, 2002.

RODRIGUES-ALVES, P. S. B. **Interferência da moxidectina na motivação sexual e na ereção peniana de ratos: envolvimento de neurotransmissores hipotalâmicos e estriatais**. 2007. 72 f. Tese (Doutorado em Neurociências e Comportamento). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo.

RODRIGUES-ALVES, P. S. B.; LEBRUN, I.; FLÓRIO, J. C.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Moxidectin interference on sexual behavior, penile erection and hypothalamic GABA levels of male rats. **Research in Veterinary Science**, v. 84, p. 100-106, 2008.

RODRIGUES-ALVES, P. S. B.; LEBRUN, I.; FLÓRIO, J. C.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H.S. Moxidectin interference on motor activity of Rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 883-891, 2009.

SAKATE, M. Manual de terapêutica das intoxicações. In: ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca, p. 524-529, 2002.

SHOOP, W. L.; HAINES, H. W.; MICHAEL, B. F.; EARY, C. H. Mutual resistance to avermectins and milbemycins: oral activity of ivermectin and moxidectin against ivermectin-resistant and susceptible nematodes. **The Veterinary Record**, v. 30, p. 445-447, 1993.

SILVILOTTI, L.; NISTRI, A. GABA Receptor mechanism in the central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 36, p. 35-92, 1991.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA A SAÚDE ANIMAL. Disponível em: <<http://www.cpv.com.br/cpv/default.aspx>>. Acesso em: 04 jun. 2014.

SNOEREN, E. M.; VEENING, J. G.; OLIVIER, B.; OOSTING, R. S. Serotonin 1A receptors and sexual behavior in female rats: a review. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 121, p. 43-52, 2014.

SOUSA, J. A. **Morfologia dos órgãos reprodutores masculinos da ema (*Rhea americana americana*)**. 2007. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 2007.

TEMPLE, W. A.; SMITH, M. A. Ivermectin. New Castle, United Kingdom: **International Programme on Chemical Safety**, 1994. PIM 292. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/ivermect.htm>>. Acesso em: 24 de Abril de 2014.

TEODOROV, E.; MORAES, A. P.; FELICIO, L. F.; VAROLLI, F. M.; BERNARDI, M. M. Bernardi, Perinatal maternal exposure to picrotoxin: effects on sexual behavior in female rat offspring. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 81, p. 935-42, 2005.

UDO, M. S. B. **Avaliação dos efeitos tóxicos da exposição pré-natal ao fipronil na prole de ratas Wistar**. 2012. 143 f. Dissertação de (Mestrado em Ciências). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 2012.

VERCRUYSSSE, J.; REW, R. S. **Macrocyclics lactones in antiparasitic therapy**. New York: Cabi Publishing, 2002.

WADA, S.; YAMADA, S.; YAMANOUCHI, K. Additive inhibition of lordosis by simultaneous treatments with GABA(A) and GABA(B) receptor agonists, muscimol and baclofen, in female rats. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 90, p. 590–593, 2008.

ZARRINDAST, M.R.; FARAHVASH, H. Effects of GABA-ergic drugs on penile erection induced by apomorphine in rats. **Psychopharmacology**, v. 115, p. 249–253, 1994.