VAGNER GONÇALVES JÚNIOR

**Estudos *in vivo* e *in vitro* da influência da ivermectina na produção de
testosterona e na atividade antitumoral em linhagem celular de
melanoma**

São Paulo
2020

VAGNER GONÇALVES JÚNIOR

**Estudos *in vivo* e *in vitro* da influência da ivermectina na produção de
testosterona e na atividade antitumoral em linhagem celular de
melanoma**

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa

São Paulo
2020

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. 3908 FMVZ	<p>Gonçalves Júnior, Vagner</p> <p>Estudos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> da influência da ivermectina na produção de testosterona e na atividade antitumoral em linhagem celular de melanoma / Vagner Gonçalves Júnior. – 2020.</p> <p>110 f. : il.</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2020.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.</p> <p>Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa.</p> <p>1. Testosterona. 2. Ivermectina. 3. Wnt/β-catenina. 4. mTOR. 5. Melanoma canino. I. Título.</p>
-----------------	--

São Paulo, 19 de junho de 2019
CEUA N 5241010216

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Helenice De Souza Spinosa
Área: Farmacologia

Título da proposta: "Estudos in vivo e in vitro da Influência da ivermectina na produção de testosterona e na atividade anti-tumoral em linhagem celular de melanoma".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 004871)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 24/abril/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Inicialmente, o objetivo do trabalho era avaliar a influência da ivermectina na produção de testosterona, in vivo e in vitro, empregando ratos e coelhos e células de adenocarcinoma (representam a esteroidogênese in vitro). Após realizarmos os experimentos, verificamos possível efeito anti-tumoral da ivermectina e, por isso, novos experimentos serão necessários para compreender este efeito. Em virtude dos resultados obtidos, será necessário ampliar os ensaios in vitro, empregando duas linhagens celulares (melanoma) disponíveis no laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia. Dessa forma, o título da tese também será alterado, ficando da seguinte maneira "Estudos in vivo e in vitro da Influência da ivermectina na produção de testosterona e na atividade anti-tumoral em linhagem celular de melanoma".".

Comentário da CEUA: "Foi solicitado alteração de título do projeto de "Influência da exposição à ivermectina in vitro e in vivo nos níveis de hormônios sexuais" para "Estudos in vivo e in vitro da Influência da ivermectina na produção de testosterona e na atividade anti-tumoral em linhagem celular de melanoma", visto que foi observada a ação anti-tumoral da ivermectina, e o estudo terá a necessidade de ampliar os ensaios in vitro".

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

GONÇALVES-JR, Vagner

Estudos *in vivo* e *in vitro* da influência da ivermectina na produção de testosterona e na atividade antitumoral em linhagem celular de melanoma

Tese 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 Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Agradecimentos

Os agradecimentos serão divididos em quatro partes. São elas:

1 – Deus:

Nada faria sentido se Deus não estivesse presente em minha vida e em minha família. Quanto mais eu estudo, busco respostas e observo os fenômenos da natureza, percebo a grandeza e cuidado de Deus em todas as coisas. Sou grato pela vida, sabedoria, força e paz que Ele me dá para que eu possa enfrentar todos os desafios.

2 – Família:

Agradeço pela vida da minha esposa maravilhosa (Daniela) e do meu filho (Tito) pela paciência, incentivo e suporte durante essa jornada. Também agradeço o esforço e investimento da minha mãe (Márcia) e avó (Áurea), desde o meu nascimento, para que eu pudesse alcançar os meus objetivos.

3 – Amigos e colegas:

Os amigos e colegas (Nicolle, Adriana, Herculano, Jorge F., Jorge O., Milena, Luciana, Renato, Natália, Victor, Jéssica, Júlia, Dennis, Prof Bruno, Profª Cláudia Mori, Profª Marta Bernardi, Profª Silvana, Profª Tânia, Ivone, Andréia, Taíssa, Fernando Pípole, Fernando Ponce, Juliana, Luana, Wanderley, Cássia) foram essenciais para que eu pudesse concluir essa etapa da minha vida. Além de colaborarem com a parte científica, também compartilharam experiências, críticas, sugestões, frustrações e todos os sentimentos que estão envolvidos na vida de um pós-graduando. Não vou detalhar todas as experiências aqui pois acredito que cada um que cruzou o meu caminho levará algo em seu coração e lembrará dos momentos que estivemos juntos na pós-graduação; espero que as lembranças sejam positivas.

4 – Orientadores/colaboradores:

Não poderia esquecer dos grandes mestres que estiveram comigo durante o doutorado. Agradeço a Profª Helenice pela paciência e cuidado com o meu projeto de pesquisa. Ela me ensinou a ter um olhar científico mais amplo e crítico, plantando em mim a semente da dúvida, me estimulando a procurar respostas para tudo. Levarei esse aprendizado para a minha vida profissional. Obrigado!

A Profª Cristina também foi outra pessoa maravilhosa que me orientou durante este período; acreditou em mim desde o início e sempre estendeu a mão para auxiliar em todas as coisas. Que ser humano fantástico!

Agradeço a Nicolle pela co-orientação desde o mestrado. Agradeço por todos os *insights*, apoio científico, amizade, inspiração e por todos os assuntos aleatórios.

Findo os agradecimentos com uma frase que traduz minha percepção sobre a vida, inclusive sobre a pós-graduação:

“O caminho é mais importante do que a caminhada” Carlos Drummond de Andrade

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), com auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”. (Aristóteles)

RESUMO

GONÇALVES-JR, V. **Estudos *in vivo* e *in vitro* da influência da ivermectina na produção de testosterona e na atividade antitumoral em linhagem celular de melanoma**. 2020. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A ivermectina é um antiparasitário de amplo espectro de ação (endectocida), de alta eficácia e com ampla margem de segurança introduzida na década 1970 para uso veterinário e, posteriormente, empregada também em medicina humana. Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa, em ratos, mostraram que a administração de ivermectina prejudicou o comportamento sexual de fêmeas, enquanto em machos reduziu os níveis de testosterona sem interferir na motivação sexual e na ereção peniana. Dando continuidade a esses estudos e visando contribuir para o entendimento dos mecanismos fisiológicos, farmacológicos e moleculares envolvidos nos efeitos da ivermectina, no presente trabalho avaliou-se a influência da exposição *in vivo* e *in vitro* à ivermectina nos níveis de testosterona. Foi também desenvolvido um método analítico em nossos laboratórios para quantificar ivermectina em amostra de sangue de ratos. Ainda, considerando que o reposicionamento de fármacos, no presente estudo avaliou-se também a possível atividade antitumoral da ivermectina, uma vez que os resultados do ensaio *in vitro* com essa molécula ensejaram essa possibilidade. Assim, o presente trabalho foi organizado em três capítulos. No primeiro capítulo avaliaram-se os efeitos da administração de ivermectina nos níveis séricos de testosterona em ratos e em coelhos. No segundo capítulo estudou-se a influência do vermelho de fenol (indicador de pH) e da ivermectina na produção de testosterona *in vitro*, empregando células H295R (originária de carcinoma adrenocortical humano) e Y1 (originária de tumor de camundongo que produz esteróides). E no terceiro capítulo avaliou-se a possível atividade antitumoral da ivermectina empregando um modelo em linhagens celulares de melanoma canino e avaliando-se as vias de sinalização Wnt e mTor. Os resultados mostraram: a) que a administração de ivermectina em ratos e em coelhos não alterou os níveis séricos de testosterona; b) que a presença do vermelho de fenol no cultivo celular pode prejudicar a produção de testosterona pelas células Y1, que as células H295R foram mais adequadas do que as células Y1 para avaliação *in vitro* da produção de testosterona e que a ivermectina não altera a produção desse hormônio em células H295R;

c) que a ivermectina possui efeito citotóxico para a célula tumoral de melanoma canino e também interfere na expressão de mTOR e β -catenina. Novos estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nos efeitos citotóxicos e antitumorais da ivermectina, a fim de caracterizar o seu reposicionamento com uma nova indicação terapêutica.

Palavras-chave: Testosterona. Ivermectina. Wnt/ β -catenina. mTOR. Melanoma canino.

ABSTRACT

GONÇALVES-JR, V. ***In vivo* and *in vitro* studies of ivermectin influence on testosterone production and antitumor activity in a melanoma cell line.** 2020. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Ivermectin is a highly effective antiparasitic with a broad spectrum of action (endectocide) and a wide safety margin introduced in the 1970s for veterinary use and later introduced in human medicine. Previous studies from our research group have shown that ivermectin administration impaired the sexual behavior of female rats, while it reduced testosterone levels in males without interfering with sexual behavior and penile erection. To continue these studies and aiming to contribute to the understanding of the physiological, pharmacological and molecular mechanisms involved in the effects of ivermectin, the influence of *in vivo* and *in vitro* exposure to ivermectin on testosterone levels was evaluated. Also, an analytical method was developed in our laboratories to quantify ivermectin in blood sample of rats. In addition, considering drug repurposing, the potential antitumor activity of ivermectin was evaluated, since the results of previous *in vitro* assays with this molecule gave rise to this possibility. Thus, the present work was organized in three chapters. In the first chapter, the effects of ivermectin administration on serum testosterone levels in rats and rabbits were evaluated. In the second chapter, the influence of phenol red (pH indicator) and ivermectin on testosterone production *in vitro* was studied, using H295R cells (originating from human adrenocortical carcinoma) and Y1 cells (originating from a mouse tumor that produces steroids). Finally, the third chapter is regarding to the potential *in vitro* antitumor activity of ivermectin in canine melanoma cell lines through assessment of the Wnt and mTor signaling pathways. The results showed: a) the administration of ivermectin in rats and rabbits did not alter serum testosterone levels; b) the presence of phenol red in cell culture may impair testosterone production by Y1 cells; also H295R cells were more suitable than Y1 cells for *in vitro* evaluation of testosterone production and that ivermectin does not alter this hormone production in H295R cells; c) ivermectin has a cytotoxic effect on canine melanoma cell and interferes with expression of mTOR and β -catenin. Further studies are needed to elucidate the mechanisms involved in the cytotoxic and antitumor effects of ivermectin, in order to confirm this drug as a new therapeutic indication.

Keywords: Testosterone. Ivermectin. Wnt / β -catenin. mTOR. Canine melanoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Estrutura molecular da ivermectina composta de uma mistura, na proporção 80:20, dos homólogos equipotentes 22,23 dehidro B1a e B1b.....	16
Figura 2.1 – Concentração sérica de testosterona (média e erro padrão) em ratos tratatados com ivermectina (0,2 mg/kg ou 1,0 mg/kg, n=18 por grupo) ou 1,0 mL/kg de NaCl (n=6).....	34
Figura 2.2 – Concentração sérica de testosterona (média e erro padrão) em coelhos (n=5 por grupo) tratados com solução salina (NaCl 0,9%), ivermectina 0,2 mg/kg.....	34
Figura 3.1 – Estrutura química do vermelho de fenol.....	45
Figura 3.2 – Vermelho de fenol, 40 μ M: cores num meio de cultura de células (DMEM) em uma faixa de variação de pH entre 6,0 a 8,0.....	46
Figura 3.3 – Fotomicrografias da linhagem de células H295R em baixa (esquerda) e alta (direita) densidade celular.....	48
Figura 3.4 – Fotomicrografias da linhagem de células Y1 em baixa (esquerda) e alta (direita) densidade celular.....	50
Figura 3.5 – Via esteroidogênica.....	51
Figura 3.6 – Análise da viabilidade das células H295R por citometria de fluxo. I – população total e o gate de exclusão de debris; II – controle negativo de morte em DMSO; III – controle positivo de morte em metanol; IV – procloraz 10-1 μ M (forte inibidor de testosterona); V – forskolina 10-1 μ M (forte indutor de testosterona).....	58

Figura 3.7 –	Gate de células H295R que incorporaram o iodeto de propídio (percentual de morte) expostas à ivermectina (I = 10-5 µM; II = 10-4; III = 10-3 µM; IV = 10-2 µM; V = 10-1 e VI = 5 µM).....	58
Figura 3.8 –	Análise da viabilidade das células Y1 por citometria de fluxo. I – população total e o gate de exclusão de debris; II – controle negativo de morte em DMSO; III – controle positivo de morte em metanol; IV – procloraz 10-1µM (forte inibidor de testosterona); V – forskolina 10-1 µM (forte indutor de testosterona).....	60
Figura 3.9 –	Gate de células Y1 que incorporaram o iodeto de propídio (percentual de morte) expostas à ivermectina (I= 10-3 µM; II = 10-2 µM; III = 10-1 µM; IV = 5 µM; V = 10 µM e VI = 50 µM).....	60
Figura 3.10 –	Efeitos da exposição à ivermectina na produção de testosterona (média e erro padrão) pelas linhagens celulares H295R (A) e Y1 (B) cultivadas na presença de vermelho de fenol ou não. Em (A), as letras indicam diferenças significantes entre os grupos (p<0,05, Anova de uma via, seguida do teste de Tukey) e sem diferenças entre a exposição ou não ao vermelho de fenol. Em (B), o asterisco indica diferença significativa entre a exposição ou não ao vermelho de fenol (p<0,05, Anova de uma via, seguida do teste de Tukey) e sem diferenças entre os grupos.....	62
Figura 4.1 –	Potenciais mecanismos envolvidos na apoptose e necrose induzida pela doxorubicina. DNA, ácido deoxirribonucleico; NFκβ, fator nuclear κβ; SUP, sistema ubiquitina proteassoma.....	71
Figura 4.2 –	Mecanismos antitumorais da ivermectina (IVM). Para detalhes, consulte o texto.....	74

- Figura 4.3 – Ativação oncogênica, sinalizada pela mTOR. Bim, BCL2-like 11; CDK2, quinase dependente de ciclina 2; Bcl-2, célula B CLL/linfoma 2; MMP9, metalopeptidase matriz 9; Fas-L, ligante Faz; p27Kip, inibidor de quinase dependente de ciclina 1B; cMyc, homólogo de oncogene viral mielocitomatose.....78
- Figura 4.3 – Kit rápido para detecção de micoplasma. 1 - Adicionar 40 µL do tampão A. 2 - Adicionar 10 µL da amostra. 3 – Oscilar gentilmente e deixar em temperatura ambiente por 5 minutos. 4 - Adicionar 40 µL do tampão B. 5 – Oscilar gentilmente e deixar em temperatura ambiente por 4 minutos. 6 - Adicionar 5 µL da solução de parada. 7 - Visualizar a mudança da coloração.....82
- Figura 4.4 – Fotomicrografia do cultivo primário das células tumorais. Notam-se células que variam do formato fusiforme ao predomínio de células estreladas com citoplasma amplo (40x).....86
- Figura 4.5 – Fotomicrografia de corte histológico de células de melanoma da cavidade oral canina (MeLn) incluídas em agarose 2% (cell block), exibindo celularidade moderada, população celular esférica a elípticas, dispostas em bloco, apresentando anisocitose, anisocariose com núcleos paracentrais em eventuais células (seta) e alteração da relação núcleo/citoplasma.....87
- Figura 4.6 – Fotomicrografia representativa da reação imunoistoquímica para Melan A (seta) de células tumorais provenientes de cultivo primário. Marcação positiva corada em castanho escuro. (40x).....88
- Figura 4.7 – Fotomicrografia representativa da reação imunoistoquímica para PNL-2 (seta) de células tumorais provenientes de cultivo primário. Marcação positiva corada em castanho escuro. (40x).....88

Figura 4.8 – Análise qualitativa para a presença de micoplasma no meio de cultura de células tumorais: controle negativo (c-); melanoma canino primário (MeLn); linhagem de melanoma humano (SKMel – controle de melanoma); e controle positivo (c+).	89
Figura 4.9 – Mortalidade de células melanoma canino primário (MeLn), avaliada por citometria de fluxo, após 48 h da exposição ao DMSO e a diferentes concentrações de ivermectina (IVM), doxorrubicina (DOX) e associação de ambas.	90
Figura 4.10 – Expressão gênica de mTOR e β -catenina em células de melanoma canino primário (MeLn) após 48 h da exposição ao DMSO e a diferentes concentrações de ivermectina (IVM), doxorrubicina (DOX) e associação de ambas.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Viabilidade da linhagem celular H295R exposta às diferentes concentrações de ivermectina, assim como os respectivos controles (DMSO) em cada placa de 24 poços.	57
Tabela 3.2 – Viabilidade da linhagem celular Y1 exposta às diferentes concentrações de ivermectina, assim como os respectivos controles (DMSO) em cada placa de 24 poços.....	59
Tabela 4.1 – Identificação das sondas Taqman para os genes de mTOR e β -catenina....	84

Sumário

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	20
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
2	CAPÍTULO 1: Efeitos da administração de ivermectina na concentração sérica de testosterona de ratos e coelhos.....	31
2.1	INTRODUÇÃO.....	31
2.2	OBJETIVOS.....	32
2.2.1	Objetivos específicos.....	32
2.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.3.1	Solução de ivermectina.....	32
2.3.2	Animais.....	33
2.3.3	Quantificação da testosterona sérica.....	33
2.3.4	Quantificação da ivermectina sérica.....	33
2.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	35
2.4.1	Avaliação da concentração de testosterona sérica.....	35
2.4.1.1	Ratos.....	35
2.4.1.2	Coelhos.....	35
2.4.2	Avaliação da concentração de ivermectina sérica em ratos.....	36
2.4.3	Análise estatística.....	36
2.5	RESULTADOS.....	36
2.5.1	Concentração de testosterona sérica.....	36
2.5.2	Ivermectina sérica.....	38
2.6	DISCUSSÃO.....	39
2.7	CONCLUSÃO.....	41
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
3	CAPÍTULO 2: Influência do vermelho de fenol e da ivermectina na produção de testosterona <i>in vitro</i>: estudo em células H295R e Y1.....	46
3.1	INTRODUÇÃO.....	46
3.1.1	Origem e características da linhagem de células H295R.....	48
3.1.2	Origem e características da linhagem de células Y1.....	50
3.3	OBJETIVO.....	53
3.3.1	Objetivos específicos.....	53

3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.4.1	Obtenção das células.....	53
3.4.2	Descongelamento e padronização do cultivo das células.....	54
3.4.3	Análise de viabilidade celular por citometria de fluxo.....	55
3.5	PREPARAÇÃO DA IVERMECTINA.....	56
3.6	QUANTIFICAÇÃO DA TESTOSTERONA.....	56
3.7	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	56
3.7.1	Citotoxicidade.....	56
3.7.2	Avaliação da concentração de testosterona <i>in vitro</i>	57
3.7.3	Análise estatística.....	57
3.8	RESULTADOS.....	57
3.8.1	Viabilidade das células H295R.....	57
3.8.2	Viabilidade das células Y1.....	54
3.8.3	Quantificação de testosterona no cultivo de células H295R e Y1.....	62
3.9	DISCUSSÃO.....	64
3.10	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
4	CAPÍTULO 3: Possível atividade anti-tumoral da ivermectina: modelo em cultivo primário de melanoma.....	68
4.1	REVISÃO DE LITERATURA.....	69
4.1.1	Melanoma.....	70
4.1.2	Atividade antitumoral da doxorrubicina.....	71
4.1.3	Atividade antitumoral da ivermectina.....	73
4.1.4	Via Wnt no melanoma.....	75
4.1.5	VIA mTOR no melanoma.....	78
4.5	OBJETIVOS.....	80
4.5.1	Objetivos específicos.....	80
4.6	MATERIAIS E MÉTODOS.....	80
4.6.1	Preparação da ivermectina.....	80
4.6.2	Preparação da doxorrubicina.....	81
4.6.3	Obtenção, cultivo e caracterização de células tumorais	81
4.6.3.1	Tratamento das células tumorais.....	83

4.6.4	Análise da citotoxicidade e da expressão gênica.....	83
4.6.4.1	Citotoxicidade.....	83
4.6.4.2	Expressão gênica.....	84
4.6.4.2.1	<i>Técnica de extração de RNA.....</i>	84
4.6.4.2.2	<i>Técnica de síntese de DNA</i>	84
4.6.4.2.3	<i>Quantificação do nível de expressão de mTOR e β-catenina.....</i>	85
4.6.5	Análise dos dados.....	86
4.7	RESULTADOS.....	86
4.7.1	Caracterização das células tumorais.....	86
4.7.2	Controle de micoplasma no cultivo	90
4.7.3	Citotoxicidade.....	90
4.7.4	Expressão gênica.....	91
4.8	DISCUSSÃO.....	92
4.9	CONCLUSÃO.....	96
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
5	CONCLUSÃO GERAL.....	110

1. INTRODUÇÃO GERAL

A ivermectina (figura 1.1) é um derivado semissintético da avermectina B1 e consiste de uma mistura 80:20 dos homólogos equipotentes 22,23 dehidro B1a e B1b. Foi descoberta na década de 1970, através de uma parceria entre a Merck & Co Inc, nos Estados Unidos, e o Instituto Kitasato, no Japão (CRUMP, 2017; GLOECKNER et al, 2010; BAI and OGBOURNE, 2016).

Este medicamento foi inicialmente destinado à medicina veterinária, em 1981, como antiparasitário (CAMPBELL, 2012). Devido ao seu amplo espectro de ação, alta eficácia, ampla margem de segurança e distribuição no organismo, a ivermectina foi introduzida na medicina humana em 1987, quando a *Merck Laboratories* tinha dados suficientes para registrar a ivermectina para uso contra a oncocercose (FISHER & MROZIK, 1989; STEEL, 1993; SPINOSA et al, 2008). A empresa anunciou que o medicamento seria fornecido sem custo para tratar a oncocercose, em qualquer parte do mundo, quando fosse necessário (LINDLEY, 1987).

Figura 1.1 – Estrutura molecular da ivermectina composta de uma mistura, na proporção 80:20, dos homólogos equipotentes 22,23 dehidro B1a e B1b.

Fonte: Página da ivermectina no wikipedia.¹

¹ Disponível em <<https://en.wikipedia.org/wiki/Ivermectin>>. Acesso em: 12 de outubro. 2019.

A oncocercose, também chamada de "cegueira dos rios" ou "mal do garimpeiro", é uma doença parasitária crônica produzida pelo nematódeo *Onchocerca volvulus*, que se aloja no tecido subcutâneo das pessoas atingidas. A transmissão da oncocercose se dá pela picada do inseto *Simulium* (popularmente chamado de borrachudo ou pium) infectado com larvas do parasita. O ciclo de transmissão se inicia quando o inseto pica uma pessoa infectada e suga microfilárias juntamente com o sangue. A seguir, ocorre a maturação das microfilárias no interior do inseto, transformando-se em formas infecciosas e numa próxima picada do inseto, o parasita é injetado na circulação do indivíduo. Transcorrido cerca de um ano, o parasita se transforma em verme adulto e passa a produzir grande número de microfilárias, as quais se disseminam por todo o corpo, formando nódulos subcutâneos palpáveis (oncocercomas); eventualmente, as microfilárias podem causar cegueira quando presentes no globo ocular. A produção de microfilárias pode causar prurido, exantemas cutâneos, perda de elasticidade da pele, pápulas, áreas da pele com despigmentação, febre e, ao migrarem para os olhos, pode ocorrer perda parcial da capacidade visual e até cegueira total (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Em 1991, a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) decidiu eliminar a oncocercose das Américas e para tanto lançou um programa. Em agosto de 1993, o Brasil entrou efetivamente no Programa de Eliminação da Oncocercose para as Américas (OEPA - *Onchocerciasis Elimination Program in the Americas*), do qual já faziam parte outros cinco países (Venezuela, Equador, Colômbia, Guatemala e México) (PY-DANIEL, 1994).

No Brasil foi a Fundação Nacional de Saúde (FNS) que assumiu a coordenação do Programa Brasileiro de Eliminação da Oncocercose (PBEO) em 1993 e passou a executar trabalhos de campo com vistas à caracterização epidemiológica do foco, bem como planejar e implantar atividades profiláticas. Estima-se que, no final da década de 1980, cerca de 500 mil pessoas no Brasil, Colômbia, Equador, Guatemala, México e Venezuela corriam o risco de contrair essa doença (OPAS, 2019).

Após anos de esforços contínuos e o compromisso assumido, em 1991, pela OPAS de interromper a transmissão da oncocercose, entre os anos de 2013 e 2016, Colômbia, Equador, Guatemala e México conseguiram eliminar a oncocercose.

Atualmente, na América Latina, o último foco da doença está localizado no território onde as populações indígenas Yanomami e Ye'Kuana vivem, entre Brasil (Amazonas e

Roraima) e Venezuela; é uma área de difícil acesso no interior da floresta amazônica (OPAS, 2019).

O diagnóstico da oncocercose é feito pela palpação dos nódulos de parasitas adultos, os quais podem ser identificados por exames de imagem (tomografia computadorizada ou ecografia), ou por análise microscópica de amostra de biópsia, sendo este o principal diagnóstico. As microfilárias são detectadas em biópsias da pele e também podem ser vistas diretamente pela observação do fundo do olho com um oftalmoscópio. Há também a técnica de detecção do DNA do parasita por reação em cadeia da polimerase (PCR).

O tratamento da oncocercose é realizado com a administração de 150 µg/kg de ivermectina (atividade microfilaricida), em dose única, com intervalos semestrais a todas as pessoas que transitam ou habitam a área endêmica. A prevenção é feita evitando-se a exposição prolongada ao inseto vetor, pelo uso de roupas que cubram maior parte do corpo, pelo uso de repelentes e mosquiteiros.

Nos seres humanos, além do tratamento da oncocercose, a ivermectina é indicada para o tratamento da strongiloidíase (causada pelo nematoide *Strongyloides stercoralis*), filariose (causada pelo nematoide do grupo dos Filarídeos, o *Wuchereria bancrofti*, e transmitida por mosquitos do gênero *Culex*), ascaridíase (causada pelo nematódeo da família Ascarididae, o *Ascaris lumbricoides*), escabiose (ou sarna humana, produzida pelo ácaro *Sarcoptes scabiei*) e pediculose (dermatose produzida pelo ectoparasito *Pediculus humanus capitis*). Atualmente, a ivermectina é aprovada para uso em seres humanos não só no Brasil, como também em vários países, como, por exemplo, Austrália, França, Japão, Holanda e Estados Unidos (PACQUE, 1989; DREYER et al., 1995; BELL, 1998; CONTI DIAZ, 1999; HUGGINS et al., 2001; BELIZÁRIO et al., 2003; SCHALLER et al., 2017).

A ivermectina imobiliza os helmintos induzindo uma paralisia tônica da musculatura. A paralisia é mediada pela potencialização e/ou ativação direta dos canais de cloro sensíveis às avermectinas, controlados pelo glutamato (YOVANY et al., 2010). Esses canais estão presentes somente nos nervos e células musculares dos invertebrados e, uma vez potencializados, causam aumento da permeabilidade da membrana celular aos íons cloreto, com hiperpolarização dos nervos ou células musculares, resultando em paralisia e morte do parasita. As avermectinas podem também interagir com canais de cloro mediados por outros neurotransmissores, como o ácido gama-aminobutírico (GABA).

Os canais de cloro controlados pelo glutamato provavelmente servem como um dos locais de ação da ivermectina também nos insetos e crustáceos. A falta de receptores com alta afinidade para as avermectinas em cestodos e trematodos pode explicar porque estes helmintos não são sensíveis à ivermectina.

Nos casos de infestações por *Onchocerca*, a ivermectina atua sobre as larvas em desenvolvimento e bloqueia a saída das microfilárias do útero dos vermes fêmeas adultos. Sua atividade contra *Strongyloides stercoralis* é limitada aos estágios intestinais.

A atividade seletiva das avermectinas sobre endoparasitos e ectoparasitos pode ser atribuída ao fato de que nos mamíferos, os canais iônicos mediados pelo GABA só estão presentes no cérebro e a ivermectina não atravessa a barreira hematoencefálica em situações normais; além disso, os nervos e as células musculares dos mamíferos não apresentam canais de cloro controlados por glutamato.

A farmacocinética da ivermectina tem sido amplamente estudada em vários mamíferos, incluindo humanos. É um medicamento solúvel em gordura, com volume de distribuição de 46,9 L; tem pico médio de nível plasmático de aproximadamente 4 h após a administração oral, com um segundo pico às 6 - 12 h devido ao ciclo entero-hepático (CRUMP, 2017), e possui depuração oral de 1,2 L/h (OTTESEN & CAMPBELL, 1994). Com 93% de ligação com as proteínas de plasmáticas (OTTESEN & CAMPBELL, 1994), este medicamento apresenta baixa biotransformação dentro do organismo (ZHANG et al., 2016; ALBERICH et al., 2014; ZHANG, 2017). A concentração máxima no plasma ocorre 4 - 5 h depois da sua administração oral e sua meia-vida é de aproximadamente 19 h. A biotransformação ocorre no fígado, pelos citocromos CYP1A e CYP3A4, gerando 10 metabólitos, a maioria desmetilada e hidroxilada. A maior concentração tissular é encontrada no fígado e no tecido adiposo apesar da lipossolubilidade da ivermectina; isso ocorre pelo fato dela não atravessar a barreira hematoencefálica dos mamíferos em situações normais. Sua excreção é principalmente pelas fezes em um período estimado de 12 dias e apenas 1% é excretada na urina (BARAKA et al., 1996).

A ivermectina tem ampla margem de segurança em ruminantes, suínos e equinos, bem como na maioria das raças de cães (MCKELLAR et al, 1996; BURKHART, 2000).

A toxicidade aguda da ivermectina foi investigada em várias espécies de animais e os sinais de toxicidade foram semelhantes após administração oral e intraperitoneal em ratos e camundongos, e os efeitos consistiram em ataxia, tremores e atividade reduzida

(UMBENHAUER et al., 1997). Nos estágios iniciais de desenvolvimento, a ivermectina em doses de 0,4 - 0,8 mg/kg em camundongos, 10 mg/kg em ratos e 3 - 6 mg/kg em coelhos, aumentou a incidência de fissura de palato, mas não foi considerada como embriotóxica, já que a frequência de anomalias era muito baixa (LANKAS et al, 1989). Os efeitos tóxicos têm sido relacionados à sua interação com a glicoproteína-P, que limita seu acesso ao sistema nervoso central (SNC). A ausência dessa proteína determina o acúmulo de ivermectina no cérebro de camundongos transgênicos que não a expressam. Em macacos *Rhesus* adultos que ingeriram diariamente por 16 dias a 1,2 mg/kg, nenhum efeito indesejável foi detectado (LANKAS et al, 1989).

A superdose de ivermectina pode causar uma combinação de efeitos colaterais clínicos que variam de leve a extremamente grave (EPSTEIN & HOLLINGSWORTH, 2013). A maioria dos sinais e sintomas clínicos dominantes de intoxicação por ivermectina, em animais selvagens, são depressão do SNC e, às vezes, coma, frequentemente resultando em morte (TRAILOVIC & NEDELJKOVIC, 2011). As propriedades centrais e periféricas do GABA estão envolvidas na toxicidade da ivermectina em mamíferos e indicam a participação também do sistema colinérgico na sua toxicidade (TRAILOVIC & NEDELJKOVIC, 2011). Além dos efeitos sobre o SNC, a ivermectina apresentou efeitos marcantes em alguns enzimas hepáticas, como aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT) e γ -glutamiltanspeptidase (GGT) em doses terapêuticas e tóxicas de ivermectina para ratos albinos (ASHANG, 2009).

A dose letal para 50% da população estudada (DL50) em ratos é de 25 mg/kg administrada por via oral, cuja dose equivalente humana (DEH) é de 2,02 mg/kg (REAGAN-SHAW et al, 2008). A DL50 aumenta até 30 mg/kg quando a ivermectina é administrada intraperitonealmente em ratos (DEH = 2,43 mg/kg). Em coelhos a DL50 é 406 mg/kg em aplicação tópica, enquanto em cães é de 80 mg/kg administrada por via oral (DEH = 43,24 mg/kg) (WANG, 2011). Fica evidente que quanto mais alto o animal encontra-se na escala filogenética, menor a toxicidade da ivermectina.

Estudo retrospectivo sobre intoxicação causada por avermectinas em seres humanos foi feito por Chung et al., em 1999. Esses autores avaliaram pacientes atendidos em um centro de intoxicação no período de setembro de 1993 a dezembro de 1997, em Taiwan. Foram identificados 18 pacientes intoxicados com abamectina e um com ivermectina, sendo 14 homens e cinco mulheres, com idade variando entre 15 e 83 anos.

A maioria dos pacientes atendidos (14 pessoas) foi devido à tentativa de suicídio. A via de exposição mais comum foi a ingestão oral (15 pacientes). Quatro pacientes não apresentaram nenhum sintoma e oito apresentaram sintomas menores após a ingestão média de 23 mg/kg de abamectina (4,2 a 67 mg/kg) ou após contato dérmico e inalatório. Sete pacientes manifestaram sintomas graves, como coma (7 pacientes), aspiração de material do orofaringe com insuficiência respiratória (4 pacientes) e hipotensão (3 pacientes), após a ingestão média de 100,7 mg/kg de avermectina (15,4 mg/kg para ivermectina e 114,9 mg/kg para abamectina). Todos os sete pacientes receberam cuidados intensivos de suporte; um paciente morreu após 18 dias, devido à falência múltipla de órgãos.

Em seres humanos, considera-se que a ivermectina apresenta baixos níveis de toxicidade porque seus alvos de ação estão confinados dentro do SNC. De fato, a maioria dos pacientes tratados com ivermectina não apresentam reações adversas, além daquelas causadas pelas respostas imune e inflamatória contra o parasita, tais como febre, prurido, erupções cutâneas e mal-estar (OTTESEN & CAMPBELL, 1994; DOURMISHEV et al, 2005), e quando presentes, aparecem dentro de 24 - 48h após o tratamento (SOLE et al., 1989). Os sintomas moderados como artralgia, tontura, febre, edema de pele, dispneia e hipotensão podem estar mais relacionados com a carga do parasita morto no organismo do paciente do que com a toxicidade intrínseca da ivermectina (SOLE et al., 1990). Relatos de casos de encefalopatia em pacientes co-infectados com oncocercose e filariose linfática após 48 h de tratamento com ivermectina podem ser encontrados na literatura (BOUSSINESQ et al, 2003), mas acredita-se que essa reação adversa se deva à obstrução da microcirculação de artérias cerebrais devido ao acúmulo de parasitas mortos ou paralisados, o que leva à embolia cerebral (BOUSSINESQ et al., 2006).

Embora as avermectinas tenham sido consideradas substâncias químicas de baixa toxicidade para uma grande variedade de animais, estudos do nosso grupo, acerca dos efeitos comportamentais da administração aguda de lactonas macrocíclicas, mostraram prejuízo no comportamento sexual de ratos, sendo associados esses efeitos com o sistema GABAérgico central. Assim, Rodrigues-Alves et al (2008) observaram que a moxidectina reduziu o comportamento sexual, a ereção peniana e os níveis hipotalâmicos de GABA em ratos machos adultos. Posteriormente, Moreira et al (2017) observaram que a administração de ivermectina prejudicou o comportamento sexual de ratas, enquanto em

machos reduziu os níveis de testosterona sem interferir na motivação sexual e na ereção peniana (Moreira et al., 2017).

Dando continuidade aos nossos estudos e visando contribuir para o entendimento dos mecanismos fisiológicos, farmacológicos e moleculares envolvidos nos efeitos da ivermectina na esfera reprodutiva, no presente trabalho avaliou-se a influência da exposição *in vivo* e *in vitro* à ivermectina nos níveis de testosterona. Foi também desenvolvido um método analítico em nossos laboratórios para quantificar ivermectina em amostra de sangue de ratos.

Ainda, considerando que o reposicionamento de fármacos, ou seja, a busca de nova indicação terapêutica para um medicamento aprovado pelos órgãos competentes, ganha relevância, pois diminui tempo e custos na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos, no presente estudo avaliou-se também a possível atividade antitumoral da ivermectina, uma vez que os resultados do ensaio *in vitro* com essa molécula ensejaram essa possibilidade.

Optou-se por apresentar a presente tese na forma de três capítulos. No primeiro capítulo avaliaram-se os efeitos da administração de ivermectina nos níveis séricos de testosterona de ratos e de coelhos. No segundo capítulo estudou-se a influência do vermelho de fenol (indicador de pH) e da ivermectina na produção de testosterona *in vitro*, empregando células H295R (originária de carcinoma adrenocortical humano, usada para avaliar o efeito desregulador endócrino de substâncias químicas) e Y1 (originária de tumor de camundongo que produz corticosterona como um dos principais esteróides e responde à corticotrofina - ACTH). E no terceiro capítulo avaliou-se a possível atividade antitumoral da ivermectina empregando um modelo em linhagens celulares de melanoma canino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERICH M, MÉNEZ C, SUTRA JF, LESPINE A. Ivermectin exposure leads to up-regulation of detoxification genes in vitro and in vivo in mice. **Eur J Pharmacol.** 2014;740:428–35.

ASHANG, B.U., 2009. Effect of therapeutic and toxic doses of ivermectin (Mectizan) on total serum proteins and hepatic enzymes of wistar albino rats. **Int. J. Biol. Chem.**, 3: 142-147. DOI: 10.3923/ijbc.2009.142.147.

BAI SH and OGBOURNE S. Eco-toxicological effects of the avermectin family with a focus on abamectin and ivermectin. **Chemosphere** 2016; 154: 204-214.

BARAKA OZ, MAHMOUD BM, MARSCHKE CK, GEARY TG, HOMEIDA MM, WILLIAMS JF. Ivermectin distribution in the plasma and tissues of patients infected with *Onchocerca volvulus*. **Eur J Clin Pharmacol.** 1996;50:407–10.

BELIZÁRIO, V.Y.; AMARILLO, M.E.; LEON, W.U.; et al. A comparison of the efficacy of single doses of albendazole, ivermectin and diethylcarmazine alone or in combinations against *Ascaris* and *Trichuris* spp. **Bull W Health Org**, v. 81, p. 35-42, 2003.

BELL, T. A. Treatment of *Pediculus humanus* var. *capitis* infestation in Cowlitz County, Washington, with ivermectin and the LiceMeister® comb. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 17, n. 10, p. 923-924, 1998.

BOUSSINESQ M, GARDON J, GARDON-WENDEL N, CHIPPAUX JP. Clinical picture, epidemiology and outcome of Loa-associated serious adverse events related to mass ivermectin treatment of onchocerciasis in Cameroon. **Filaria J.** 2003;2(Suppl 1):S4.

BOUSSINESQ M, KAMGNO J, PION SD, GARDON J. What are the mechanisms associated with post-ivermectin serious adverse events? **Trends Parasitol.** 2006;22:244–6.

BURKHART CN. Ivermectin: an assessment of its pharmacology, microbiology and safety. **Vet Hum Toxicol.** 2000;42:30–5.

CAMPBELL W. History of Avermectin and Ivermectin, with Notes on the History of Other Macrocyclic Lactone Antiparasitic Agents. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 2012, 13, 853-865.

CHUNG K, YANG C, WU ML, DENGJF, TSAI WJ. Agricultural avermectins: an uncommon but potentially fatal cause of pesticide poisoning. **Ann Emerg Med**. 1999;34:51–7.

CONTI DIAZ, J.A. et al. Treatment of human scabies with oral ivermectin. **Sao Paulo: Rev Inst Trp**, v. 41, p. 259-261, 1999.

CRUMP A. Ivermectin: enigmatic multifaceted ‘wonder’ drug continues to surprise and exceed expectations. **J Antibiot** (Tokyo) 2017; 70.

DOURMISHEV AL, DOURMISHEV LA, SCHWARTZ RA. Ivermectin: pharmacology and application in dermatology. **Int J Dermatol**. 2005;44:981–8.

DREYER, G.; NOROES, J.; AMARAL, F.; et al. Direct assessment of the adulticidal efficacy of a single dose of ivermectin in bancroftian filariasis Transactions of the **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, p. 441-443, 1995.

EPSTEIN, S.E. AND S.R. HOLLINGSWORTH, 2013. Ivermectin-induced blindness treated with intravenous lipid therapy in a dog. **J. Vet. Emerg Crit. Care** (San Antonio), 23: 58-62. PMID: 23317101.

FISHER M, MROZIK H. CHEMISTRY. In W. C. Campbell (ed.), Ivermectin and abamectin: **Springer, New York**, 1989 pp. 1–23.

GLOECKNER C, GARNER AL, MERSHA F, OKSOV Y, TRICOCHÉ N, EUBANKS LM, LUSTIGMAN S, KAUFMANN GF, JANDA KD. Repositioning of an existing drug for the neglected tropical disease Onchocerciasis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107: 3424-9.

HUGGINS, D.; MEDEIROS, L.B.; TAVARES, E.; et al. Tratamento da estrogiloidíase humana e outras parasitoses intestinais com dose única de ivermectina. **Pediatr Mod**, v. 58, p. 168-170, 2001.

LANKAS GR, MINSKER DH, ROBERTSON RT. Robertson, effects of ivermectin on reproduction and neonatal toxicity in rats. **Food Chem Toxicol**. 1989;27:523–9.

LINDLEY D. Merck's new drug free to who for river blindness programme. **Nature** 329:752 (1987).

MCKELLAR QA, BENCHAOUI HA. Avermectins and milbemycins. **J Vet Pharmacol Ther.** 1996;19:331–51.

MINISTÉRIO DA SAUDE. **Oncocercose**: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Disponível em <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/oncocercose>. Acesso em 29 de maio de 2019.

OPAS (Organização Pan-Americana de Saúde). **Oncocercose**: último foco da doença ocorre em comunidade indígena entre Brasil e Venezuela. Disponível em https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5725:oncocercose-ultimo-foco-da-doenca-ocorre-em-comunidade-indigena-entre-brasil-e-venezuela&Itemid=812. Acesso em 29 de maio de 2019).

OTTESEN EA, CAMPBELL WC. Ivermectin in human medicine. **J Antimicrob Chemother.** 1994;34:195–203.

PACQUE, M.C. et al. Community-based treatment of onchocerciasis with ivermectin: acceptability and early adverse reactions. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 67, n. 6, p. 721-730, 1989.

PY-DANIEL, V. Oncocercose em expansão no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 2, p. 173-174, 1994.

REAGAN-SHAW S, NIHAL M, AHMAD N. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB J.** 2008;22:659–61.

SCHALLER M, GONSER L, BELGE K, et al. Dual anti-inflammatory and antiparasitic action of topical ivermectin 1% in papulopustular rosacea. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** 2017; 31:1907–11.

SOLE G, AWADZI K, REMME J, DADZIE KY, BA O, GIESE J, KARAM M, KEITA FM, OPOKU NO. A community trial of ivermectin in the onchocerciasis focus of Asubende, Ghana. II. Adverse reactions. **Trop Med Parasitol.** 1989;40:375–82.

SOLE G, AWADZI K, REMME J, DADZIE KY, BA O, GIESE J, KARAM M, KEITA FM, OPOKU NO. Lack of adverse reactions in ivermectin treatment of onchocerciasis. **Lancet**. 1990;335:1106–7.

SPINOSA, H. S., GÓRNIAC S. L., PALERMO-NETO, J. **Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 1aEd., São Paulo, Ed. Manole, 2008. 960p.

STEEL J.W. Pharmacokinetics and metabolism of avermectins in livestock. **Vet. Parasitol** 48:45–77 (1993).

TRAILOVIC, S.M. AND J.T. NEDELJKOVIC, 2011. Central and peripheral neurotoxic effects of ivermectin in rats. **J. Vet. Med. Sci.**, 73: 591-599. DOI: 10.1292/jvms.10-0424.

UMBENHAUER DR, LANKAS GR, PIPPERT TR, WISE LD, CARTWRIGHT ME, HALL SJ, BEARE CM. Identification of a P-glycoprotein-deficient subpopulation in the CF-1 mouse strain using a restriction fragment length polymorphism. **Toxicol Appl Pharmacol**. 1997;146:88–94.

WANG J, editor. Pharmacology/Toxicology NDA review and evaluation. 2011 20/12/2017] ; Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2012/202736Orig1s000PharmR.pdf.

YOVANY, M., F.N. JOSEPH, S. JONATHAN, D.M. CHARLES AND G.G. TIMOTHY, 2010. Ivermectin disrupts the function of the excretory-secretory apparatus in microfilariae of *Brugia malayi*. **PNAS**, 107: 20120-20125.

ZHANG Y, LUO M, XU W, YANG M, WANG B, GAO J, LI Y, TAO L. Avermectin confers its cytotoxic effects by inducing DNA damage and mitochondria-associated apoptosis. **J Agric Food Chem**. 2016;64:6895–902.

ZHANG Y, WU J, XU W, GAO J, CAO H, YANG M, WANG B, HAO Y, TAO L. Cytotoxic effects of Avermectin on human HepG2 cells in vitro bioassays. **Environ Pollut**. 2017;220:1127–1137.

2 CAPÍTULO 1: Efeitos da administração de ivermectina na concentração sérica de testosterona de ratos e coelhos

2.1 INTRODUÇÃO

A testosterona é o principal hormônio sexual masculino; é responsável pelas características sexuais masculinas (físicas e comportamentais) (RAMASWAMY & WEINBAUER, 2014) e pelo controle da espermatogênese. Esse hormônio é um esteroide anabolizante secretado principalmente pelas células de Leydig presentes nos testículos, em resposta ao hormônio luteinizante (LH) liberado pela hipófise.

A ivermectina é um antiparasitário de amplo espectro de ação (endectocida), de alta eficácia e com ampla margem de segurança introduzida na década 1970 para uso veterinário e, posteriormente, empregada também em medicina humana. Moreira et al. (2017) mostraram que a administração de ivermectina em ratos, por via intraperitoneal, reduziu os níveis séricos de testosterona, bem como prejudicou a coordenação motora, devido a redução dos níveis estriatais do ácido gama-aminobutírico (GABA) e de dopamina no sistema nervoso central (SNC).

O GABA é um neurotransmissor no SNC e também é encontrado em gônadas e nos órgãos reprodutivos acessórios, exercendo efeito direto na esteroidogênese testicular e na viabilidade e motilidade dos espermatozoides (ERDO et al., 1993; FRUNGIERI et al., 1996). Os receptores GABAérgicos foram identificados em célula de Leydig de roedores e de seres humanos adultos (HE et al., 2001; GEIGERSEDER et al., 2003; HAUET et al., 2005), e também em testículos e espermatozoides de ratos (HE et al., 2001; HE et al., 2003; LI et al., 2008). Os receptores GABAérgicos localizados nas células de Leydig parecem ter participação local na regulação da síntese de hormônios sexuais (HE et al., 2001; HE et al., 2003; LI et al., 2008).

Considerando que alguns estudos mostram que a ivermectina pode interferir na produção de testosterona (COUSENS et al., 1997; ONAKPA et al., 2010; EL-FAR, 2013; KHAWLA et al., 2015; KADRY & HAZEM, 2015) e em outros não foi observada alteração nos níveis desse hormônio (POUL et al., 1988; LANKAS et al., 1989; MOREIRA et al., 2017), no presente trabalho avaliou-se os efeitos da administração de ivermectina nos níveis séricos de testosterona de ratos e de coelhos. Foi também desenvolvido um método

analítico em nossos laboratórios para quantificar ivermectina em amostra de sangue de ratos, a fim de correlacionar os níveis séricos de ivermectina com aqueles de testosterona.

2.2 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da administração de ivermectina nos níveis séricos de testosterona de ratos e coelhos.

2.2.1 Objetivos específicos

- Quantificar testosterona sérica em ratos, nos períodos de 24, 48 e 72 horas, após a administração de ivermectina (0,2 e 1,0 mg/kg), por via subcutânea;
- Quantificar testosterona sérica em coelhos, nos períodos de 0, 2, 7, 15 e 30 dias, após a administração de ivermectina (0,2 mg/kg), por via subcutânea.
- Otimizar a técnica analítica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS) para quantificação de ivermectina sérica, nos períodos de 24, 48 e 72 horas, após a administração de ivermectina (0,2 mg/kg), por via subcutânea, em ratos.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Solução de ivermectina

A solução de trabalho foi obtida a partir do Ivomec® injetável (ivermectina – Merial Saúde Animal Ltda., Paulínia/SP). Utilizou-se uma gota de Tween 80 para cada 5 mL de NaCl 0,9%, o qual foi adicionado gradativamente, obtendo-se as concentrações desejadas para contemplar as doses de 0,2 mg/kg de ivermectina nos animais tratados. Empregou-se solução salina (NaCl 0,9%) nos animais do grupo controle, no mesmo volume (1 ml/kg) e via de administração dos outros animais experimentais. Ambas as soluções foram administradas por via subcutânea (sc).

2.3.2 Animais

Foram utilizados 42 ratos adultos, da linhagem Wistar, machos, oriundos do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). 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).

Foram utilizados 10 coelhos adultos, da raça Branco da Nova Zelândia, provenientes do biotério do Centro de Pesquisa em Toxicologia Veterinária (CEPTOX) do Departamento de Patologia da FMVZ/USP. Os animais com aproximadamente 12 meses de vida ficaram alojados individualmente em gaiolas de metal. Estas gaiolas 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 acessa às 06:00 h).

Água e ração foram fornecidas *ad libitum* aos animais durante todo procedimento experimental.

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ/USP, sob o protocolo Nº 5241010216.

2.3.3 Quantificação da testosterona sérica

A concentração de testosterona sérica foi determinada pela técnica enzimática de imunoensaio de duplo-anticorpo, empregando-se *kit* comercial ELISA (Cayman Chemical®, Ann Arbor, MI, EUA, catálogo nº582701).

2.3.4 Quantificação da ivermectina sérica

A quantificação da ivermectina sérica foi realizada no Laboratório de Resíduos de Pesticidas, Instituto Biológico, São Paulo – SP, com a colaboração da Dr^a Cláudia H. P. Ciscato e Cláudia M. Barbosa.

A concentração sérica de ivermectina em ratos foi avaliada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS), sistema *Agilent Technologies 1260 Infinity* com uma bomba binária, desgaseificador, amostrador automático e forno com coluna para o espectrômetro de massa triplo quadrupolo (3200 QTRAP) da *Applied Biosystem MDS Siex* com *TurbolonSpray*. O *software* de controle do LC-MS/MS foi o *Analista V1.5.1* e a coluna foi a *Agilent Zorbax XDB C18* (50 mm x 2,1 mm e 3 µm diâmetro). O forno da coluna foi mantido a 40 °C.

A eluição do gradiente foi realizada com metanol e solução aquosa a 20 mM de formato de amônio (20:80 v/v) em “A” e metanol e 20 mM de formato de amônio (90:10 v/v) em “B”. Foi utilizado um fluxo de 200 µL/min: 0-3 min: 0% B → 100% B; 3 a 15 min: 100% B → 0% B; 15 a 30 min: 0% B → 0% B. O volume de injeção foi de 10 µL. A determinação de massa foi realizada em modo positivo de eletropulverização com monitoramento de mais três MS/MS abundante (precursor/produtos) 892,7–569; 892,7–551,3; 892,7-566,9.

As condições de origem do MS foram as seguintes: gás de cortina (CUR) 10 psi, íon de pulverização de 5.000 V, gás de dissociação ativado colisionalmente (CAD) médio, nebulizador de gás (GS1 e GS2) 45 psi e temperatura da fonte 300°C.

As curvas de calibração foram realizadas por meio da fortificação do branco, após a extração, na faixa de 2,5 a 100 ng/mL do padrão.

Otimizou-se a técnica de extração líquido-líquido *subzero-temperature* (YOSHIDA & AKANE, 1999) para realizar a extração das amostras. Em um microtubo para centrifugação com capacidade para 2,0 mL, adicionou-se 1 mL de acetronila e 0,25 mL de soro de rato. A mistura de acetronila e soro foi centrifugada a 1.800 rpm (centrífuga Harrier 18/80 MSE da Sanyo®) por 9 min. Cada amostra foi resfriada a -20°C por 20 min para separar as fases orgânica e aquosa. Uma alíquota de 100 µL foi transferida para um *vial* com *insert* (150 µL) e 10 µL do extrato foi injetado no LC-MS/MS. A recuperação foi avaliada por meio da análise de três replicatas no nível de 5 ng/mL e os resultados situaram-se no intervalo de 70 a 120%, viáveis para a concentração.

2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

2.4.1 Avaliação da concentração de testosterona sérica

2.4.1.1 Ratos

Os ratos foram distribuídos em três grupos, sendo que dois grupos receberam ivermectina, por via SC, nas doses de 0,2 (n=18) ou 1,0 (n=18) mg/kg e o outro grupo recebeu solução salina (NaCl 0,9%, n=6), pela mesma via. Para avaliação da concentração sérica de testosterona, a coleta de sangue, por punção cardíaca, foi feita pelo emprego de anestesia profunda (1,0 mg/kg de acepromazina + 10 mg/kg de xilazina + 60 mg/kg de cetamina, por via IP), às 0, 24, 48 e 72 h após a administração de ivermectina ou NaCl.

Após a coleta, o sangue foi colocado em tubos cônicos do tipo *Falcon*® (15 mL), sem anticoagulante, para obtenção do soro. Essas amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C (centrífuga Harrier 18/80 MSE da Sanyo®). Em seguida, o soro (sobrenadante) foi pipetado, com auxílio de uma micropipeta automática, e armazenado em microtubos de polipropileno (2 mL) e conservadas em freezer -80°C até o dia da análise.

2.4.1.2 Coelhos

Foram utilizados 10 coelhos, sendo 5 animais para o grupo tratado com ivermectina 0,2 mg/kg e 5 para os animais do grupo controle (NaCl 0,9%).

Para avaliação da concentração sérica de testosterona, os coelhos foram submetidos à coleta de sangue a partir da veia auricular nos tempos 0, 2, 7, 15 e 30 dias após a aplicação. Para tal, os animais foram previamente sedados com acepromazina 1%, na dose de 0,75 mg/kg, pela via intramuscular. Os animais foram imobilizados na caixa de contenção e a veia auricular dilatada com uma luz incandescente. Após a vasodilatação, foi feita a antisepsia com álcool 70% e introduzida a agulha no vaso central ou marginal da orelha. A seguir, o sangue coletado foi armazenado em tubos cônicos do tipo *Falcon*® (15 mL) sem anticoagulante para obtenção do soro. Adotou-se o mesmo procedimento de armazenamento e análise utilizados para os ratos.

2.4.2 Avaliação da concentração de ivermectina sérica em ratos

Foram empregadas as mesmas amostras de sangue de ratos descritas no item 2.4.1.1 e empregaram-se os procedimentos descritos no item 2.3.4.

2.4.3 Análise estatística

Para as análises estatísticas foi empregado o software Instat (Prism 6.01, GraphPad, San Diego, CA, EUA). Os níveis séricos de testosterona foram analisados pela ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Concentração de testosterona sérica

As figuras 2.1 e 2.2 mostram o efeito da administração de ivermectina na concentração sérica de testosterona em ratos e coelhos, respectivamente. A análise ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett não mostrou diferenças significantes entre os grupos, indicando que a ivermectina não foi capaz de alterar os níveis séricos de testosterona de ratos (0,2 e 1,0 mg/kg) e de coelhos (0,2 mg/kg).

Figura 2.1 – Concentração sérica de testosterona (média e erro padrão) em ratos tratados com ivermectina (0,2 mg/kg ou 1,0 mg/kg, n=18 por grupo) ou 1,0 mL/kg de NaCl (n=6).

Figura 2.2 – Concentração sérica de testosterona (média e erro padrão) em coelhos (n=5 por grupo) tratados com solução salina (NaCl 0,9%), ivermectina 0,2 mg/kg.

2.5.2 Ivermectina sérica

A figura 2.3 ilustra um cromatograma do padrão de ivermectina (7,5 ng/ml) obtido após a otimização da técnica empregada no presente estudo.

A figura 2.4 mostra a concentração sérica de ivermectina em ratos tratados com 0,2 mg/kg ou 1,0 mg/kg de ivermectina. A análise estatística não mostrou diferenças significantes entre os grupos e os tempos após a administração, indicando que os níveis séricos de ivermectina mantiveram-se semelhantes por até 72 horas após a administração de ambas as doses.

Figura 2.3 - Cromatograma (LC-MS/MS) do padrão de ivermectina (7,5 ng/ml).

Figura 2.4 – Concentração sérica da ivermectina (média e erro padrão) em ratos (n = 18 por grupo) que receberam a dose de 0,2 e 1,0 mg/kg.

2.6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, avaliamos a influência da ivermectina nos níveis de testosterona *in vivo*.

A administração da dose terapêutica de ivermectina foi incapaz de alterar os níveis séricos de testosterona em ratos até 72 h após a administração de ivermectina e, em coelhos, até o 30º dia da administração. A concentração sérica de ivermectina, em ratos, foi similar entre os dois grupos experimentais (0,2 e 1,0 mg/mL) e o teste *Two-way ANOVA* não mostrou diferenças significantes entre os grupos tratados em relação ao grupo controle em ambas espécies.

Os níveis de testosterona medidos neste experimento são similares àqueles relatados por outros autores (OZCAN et al., 2015; HWANG et al., 2016; ABO-ELSOUND et al., 2019). Por outro lado, El-Far (2013), utilizando a dose de 0,5 mg/kg de ivermectina, em coelhos, observou aumento significativo LDH, CPK, estresse oxidativo, bem como aumento dos níveis de testosterona. Estes resultados foram atribuídos aos efeitos tóxicos renais e hepáticos da ivermectina nesta espécie.

Outros pesquisadores mostraram, através de estudos pré-clínicos, redução nos níveis séricos de testosterona em diferentes espécies animais. Onakpa et al (2010) relataram a diminuição da concentração de sêmen em bodes tratados com ivermectina.

Este efeito foi relacionado com a diminuição dos níveis de testosterona sérica e estimulação hormonal folicular causada pela ivermectina. Estudos em carneiros mostraram que a ivermectina, na dose terapêutica (0,2 mg/kg), reduziu os níveis de testosterona no plasma após três dias da aplicação subcutânea, mas o efeito foi reversível após o sétimo dia (NAOMAN, 2012). El Maddawy e Abd El Naby (2018) relataram diminuição significativa níveis de testosterona de ratos machos tratados com ivermectina em comparação com os controles.

Moreira et al. (2017) mostrou que a administração de 1,0 mg/kg de ivermectina, porém, por via intraperitoneal (na qual a ivermectina é depositada na cavidade abdominal que é revestida pelo peritônio, e este reveste também a bolsa escrotal), promoveu redução nos níveis séricos de testosterona. Provavelmente, esse achado pode ser atribuído a ação direta e imediata da ivermectina em receptores GABAérgicos periféricos presentes nos testículos (HE et al., 2001; HE et al., 2003; LI et al., 2008), os quais, quando ativados, reduziram prontamente a liberação de testosterona.

Sabe-se que na idade adulta a testosterona está envolvida em várias funções, como manutenção da libido, força e massa muscular, densidade óssea e produção de esperma. Esse hormônio, produzido pelas células de Leydig, é controlado no SNC por um sistema de retroalimentação no qual o hipotálamo e a hipófise liberam substâncias gonadotróficas que, por sua vez, controlam os níveis de testosterona produzidos pelas células de Leydig (RAMASWAMY E WEINBAUER, 2014).

As células de Leydig são responsáveis pela produção de andrógenos, como a testosterona (RAMASWAMY e WEINBAUER, 2014), e esse hormônio, nessas células, é sintetizado pela ação de enzimas presentes na mitocôndria e no retículo endoplasmático liso (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008; LEU et al., 2011). Na mitocôndria, a etapa inicial da síntese da testosterona, consiste na conversão do colesterol em pregnenolona. Essa, por sua vez, é então transportada ao retículo endoplasmático liso, sendo convertida a progesterona pela enzima 3- β hidroxisteroide desidrogenase. Em etapa conseguinte, a progesterona é convertida em androstenediona, que, pela ação da enzima 17- β hidroxisteroide desidrogenase, é convertida a testosterona (MOLINA, 2007; LEU et al., 2011). A testosterona, secretada pelas células de Leydig em resposta ao LH, atua juntamente com o FSH sobre as células de Sertoli, sendo fundamentais para espermatogênese (RAMASWAMY e WEINBAUER, 2014).

A espermatogênese é um processo complexo que envolve a divisão celular mitótica, meiose e o processo de espermiogênese. A regulação da espermatogênese envolve mecanismos endócrinos e parácrinos (SOFIKITIS et al., 2008). As células de Sertoli também fornecem fatores necessários para a progressão bem-sucedida da espermatogonia em espermatozóides (KRETZER et al., 1998). A somatostatina é um peptídeo regulador que desempenha um papel na regulação da proliferação dos gametas masculinos (KRETZER et al., 1998). A activina A, a folistatina e o FSH desempenham um papel na maturação das células germinativas durante o período em que os gonócitos retomam a mitose para formar as células-tronco espermatogonais e diferenciar as populações de células germinativas (KAIPIA et al., 1992). Assim, estudos detalhados sobre as células de Sertoli são necessários para investigar se lesões nessas células estão envolvidas na função testicular da ivermectina.

A administração de ambas as doses de ivermectina não modificou os níveis plasmáticos de testosterona e esse efeito pode estar relacionado à ausência de alterações nos parâmetros histológicos das células de Leydig (CORDEIRO et al., 2018).

Esses achados, tomados em conjunto com os resultados de Cordeiro et.al (2018), indicam ausência de efeitos da ivermectina nas vias da síntese e secreção dos hormônios hipofisários-gonadais de ratos e coelhos machos.

2.7 CONCLUSÃO

A administração de ivermectina em ratos (0,2 ou 1,0 mg/kg) e em coelhos (0,2 mg/kg) não foi capaz de alterar os níveis séricos de testosterona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABO-ELSOUUD M.A., HASHEM N.M., NOUR EL-DIN A.N.M., KAMEL K.I., HASSAN G.A., Soybean isoflavone affects in rabbits: Effects on metabolism, antioxidant capacity, hormonal balance and reproductive performance. **Animal Reproduction Science**, Volume 203, 2019, Pages 52-60.

CORDEIRO F., GONÇALVES-JR V., MOREIRA N., SLOBODTICOV J.I., DE ANDRADE GALVÃO N., DE SOUZA SPINOSA H., BONAMIN L.V., BONDAN E.F., CISCATO C.H.P., BARBOSA C.M., BERNARDI M.M.4. Ivermectin acute administration impaired the spermatogenesis and spermiogenesis of adult rats. **Res Vet Sci**. 2018 Apr;117:178-186.

COUSENS, S. N., A. CASSELS-BROWN, I. MURDOCH, O. E. BABALOLA, D. JATAU, N. D. ALEXANDER, J. E. EVANS, P. DANBOYI, A. ABIOSE, B. R. JONES (1997): Impact of annual dosing with Ivermectin on progression of onchocercal visual field loss. **Bull. World Health Org.** 75, 229-236.

EL-FAR, AL. Effect of therapeutic and double therapeutic doses of ivermectin on oxidative status and reproductive hormones in male rabbits. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**. 2013, v8, 128-133.

EL MADDAWY, ZK, ABD EL NABY, WSH. Effects of ivermectin and its combination with alpha lipoic acid on expression of IGFBP-3 and HSPA1 genes and male rat fertility. **Andrologia**. 2018; 50:e12891.

ERDO, S. I.; NEMET, I.; SZPORNY, I. The occurrence of GABA in vas deferens, prostate, epididymis, seminal vesicle and testicles of the rat. **Acta Biologica Hungarica**, v. 34, p. 435-437, 1993.

FRUNGIERI, M.; GONZALEZ GALVAR, S.; CALANDRA, R. Influence of photoinhibition of GABA and glutamic acid levels, and on glutamate decarboxylase activity in the testis and epididymis of the golden hamster. **International Journal of Andrology**, v. 19, p. 171-178, 1996.

GEIGERSEDER, R. DOEPNER, A. THALHAMMER, M.B. FRUNGIERI, K. GAMEL-DIDELON, R.S. CALANDRA, F.M. KÖHN, A. MAYERHOFER. Evidence for a GABAergic system in rodent and human testis: local GABA production and GABA receptors. **Neuroendocrinology**, 77 (2003), pp. 314-323.

HAUET T., YAO Z.-X., BOSE H.S., WALL C.T., HAN Z., LI W., HALES D.B., MILLER W.L., CULTY M., V. Papadopoulos Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into leydig cell mitochondria. **Molecular Endocrinology**, Volume 19, Issue 2, 1 February 2005, Pages 540–554.

HE X.B., HU J.H., WU Q., YAN Y.C., KOID S.S. E. Identification of GABA(B) receptor in rat testis and sperm. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 283 (2001), pp. 243-247.

HE X., ZHANG Y., YAN Y., LI Y., Koide S.S. Identification of GABABR2 in rat testis and sperm. **J. Reprod. Dev.**, 49 (2003), pp. 397-402.

HWANG, I., LEE, H., YU, H. S., KIM, M. E., LEE, J. S. AND PARK, K. (2016), Testosterone modulates endothelial progenitor cells in rat corpus cavernosum. **BJU Int**, 117: 976-981.

JUNQUEIRA , L.C., CARNEIRO, J. Histologia Básica. **11 ed. Rio de Jneiro: Guanabara-Koogan**, 2008.

KADRY S., HAZEM S. (2015). The biochemical effects of ivermectin on reproductive hormones and mineral homeostasis in Baladi cows post parturition. **Veterinary Archives**. 85. 95-103.

KAIPIA A., PENTTILA T.L., SHIMASAKI S., LING N., PARVINEN M., TOPPARI J. Expression of inhibin-bA and Inhibin-bB, follistatin and Activin-A receptor messenger ribonucleic acids in the rat seminiferous epithelium. **Endocrinology**, 131 (1992), pp. 2703-2710.

KHAWLA H. Z., BAN N. A.Q., SUHAD H. M. The effect of toxoplasmosis on the level of some sex hormones in males blood donors in Baghdad. **J Parasit Dis**. 2015 Sep; 39(3): 393–400.

KRETZER D. M., LOVELAND, K. L., MEINHARDT, A., SIMORANGKIR, D., AND WREFORD, N. (1998). Spermatogenesis. **Hum. Reprod**. 13, 1–8.

LANKAS GR, MINSKER DH, ROBERTSON RT. ROBERTSON. Effects of ivermectin on reproduction and neonatal toxicity in rats. **Food Chem Toxicol**. 1989;27:523–9.

LI S., ZHANG Y., LIU H., YAN Y., LI Y. Identification and expression of GABAC receptor in rat testis and spermatozoa. **Acta Biochim. Biophys. Sin. Shanghai**, 40 (2008), pp. 761-767.

LEU, S.F., POON, S. L., PAO, H. Y., HUANG, B. M. The in vivo and in vivo stimulatory effects of cordycepin on mouse Leydig cell steroidogenesis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.75, p.723-731, 2011.

MOLINA, P.E. **Fisiologia Endócrina, 2ed. São Paulo: Mc Graw Hill**, 2007.

MOREIRA, N.; SANDINI, T.M.; REIS-SILVA, T.M.; NAVAS-SUÁREZ, P.; AUADA, A.V.V.; LEBRUN, I.; FLÓRIO, J.C.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Ivermectin reduces motor coordination, serum testosterone, and central neurotransmitter levels but does not affect sexual motivation in male rats. **Reproductive Toxicology**, v. 74, p. 195-203, 2017.

NAOMAN D. Effect of Ivermectin on semen characteristics of Iraqi Awassi ram. **Al-Anbar J. Vet. Sci.** Vol.: 5 No. (2), 2012.

ONAKPA, MONDAY; AJAGBONNA; OLATUNDE; ONIFADE, K.I.; AKANDE, MOTUNRAYO. Effects of diminazene aceturate and ivermectin on semen and serum parameters of the red Sokoto buck. **International Journal of ChemTech Research**, 2010, v2, 738-743.

OZCAN S, HURI E, DOLUOGLU O, KARAKAN T, OZER E, FIDANCI V, EROGLU M, HUCUMENOGLU S. The Effect of Testicular Cryoablation on Testosterone Level in Rats: An Experimental Model of Histopathological Orchiectomy. **Urology Journal** / Vol 12, No 4 (2015).

PY-DANIEL, V. Oncocercose em expansão no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 2, p. 173-174, 1994.

POUL, J. M. Effects of Perinatal Ivermectin Exposure on Behavioral Development of Rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 10, p. 267-722, 1988.

RAMASWAMY, S.; WEINBAUER, G. F. Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. **Spermatogenesis**. v. 4, p. e996025, 2014.

SOFIKITIS N., GIOTITSAS N., TSOUNAPI P., BALTOGIANNIS D., GIANNAKIS D., PARDALIDIS N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, 109 (2008), pp. 323-330.

YOSHIDA M., AKANE. A Subzero-temperature liquid-liquid extraction of benzodiazepines for high-performance liquid chromatography. **Anal. Chem.**, 71 (1999), pp. 1918-1921.

3 CAPÍTULO 2: Influência do vermelho de fenol e da ivermectina na produção de testosterona *in vitro*: estudo em células H295R e Y1

3.1 INTRODUÇÃO

O vermelho de fenol (figura 3.1) é amplamente utilizado em meios de cultura de células como indicador de pH. Sua cor exibe uma transição gradual (figura 3.2) de amarelo ($\lambda_{\text{max}} = 443 \text{ nm}$) para vermelho ($\lambda_{\text{max}} = 570 \text{ nm}$) na faixa de pH entre 6,8 a 8,2 (SAHA & MUKHERJEA, 2015; MILLS & SKINNER, 2011). Acima do pH 8,2, o vermelho de fenol adquire a cor rosa brilhante (fúcsia). Na forma cristalina, e em solução sob condições muito ácidas (pH baixo), o composto existe como um *zwitterion* (molécula que tem pelo menos dois grupos funcionais: um com uma carga positiva e o outro com uma carga negativa, cuja carga total é zero), como mostra a figura 3.2, na qual o grupo sulfato tem carga negativa e o grupo cetona possui um próton adicional. Esta forma é às vezes simbolicamente escrita como H_2^+PS^- e é laranja-vermelho. Se o pH é aumentado ($\text{pK}_a = 1,2$), o próton do grupo cetona é perdido, resultando no íon amarelo, carregado negativamente, denotado como HPS^- . Em um pH ainda mais alto ($\text{pK}_a = 7,7$), o grupo hidroxila do fenol perde seu próton, resultando no íon vermelho denotado como PS_2^- (TAMURA & MAEDA, 1997).

Figura 3.1 - Estrutura química do vermelho de fenol.

Figura 3.2 - Vermelho de fenol, 40 μ M: cores num meio de cultura de células (DMEM) em uma faixa de variação de pH entre 6,0 a 8,0.

Fonte: Adaptado de Schwalbe (2015).²

O vermelho de fenol, além de indicador de pH, é um fraco mimetizador de estrogênio e, em culturas de células, pode aumentar o crescimento de células que expressam o receptor de estrogênio (BERTHOIS et al., 1986). No entanto, o impacto relativo do vermelho de fenol na esteroidogênese é controverso, uma vez que a sensibilidade dos diferentes tipos de células ao indicador, dentre outros fatores, pode ter influência na resposta das células do meio de cultura (WELSHONS et al., 1988).

Há modelos alternativos *in vitro* que podem ser úteis para detectar substâncias que afetam a produção de hormônios sexuais. Neste sentido, a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organization for Economic Co-operation and Development* – OCDE) estabeleceu e padronizou o Ensaio 456, a fim de avaliar potenciais desreguladores endócrinos, empregando a linhagem celular de carcinoma adrenocortical humano H295R (OECD, 2011). Outra linhagem de células tumorigênicas produtoras de esteróide é a Y1.

² Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phenol_red_pH_6,0_-_8,0.jpg>. Acesso em: 12. Jan.2020.

3.1.1 Origem e características da linhagem de células H295R

Em 1980, usando tomografia computadorizada, um carcinoma adrenocortical foi identificado em uma mulher negra de 48 anos que apresentou perda de peso, acne, hirsutismo facial, edema, diarreia e cessação da menstruação (GAZDAR et al., 1990). Esse tumor removido tinha dimensões de 14 × 13 × 11 cm e foi usado para estabelecer a linhagem celular NCI-H295 original. O tecido tumoral foi finamente macerado e a suspensão resultante foi mantida em vários meios de cultivo, contendo ou não soro, pelo período de um ano.

Com base nos esteróides secretados, as células tumorais aparentavam conter todos os sistemas de enzimas adrenocorticais que presumivelmente estavam presentes no tumor original, incluindo CYP11A, HSD3B2, CYP11B1, CYP21, CYP17, CYP11B2, 3-hidroxiesteroide sulfotransferase e baixos níveis de aromatase (CYP19).

Três subtipos de linhagens foram adaptados a partir da NCI-H295, usando condições de crescimento alternativas para incentivar adesão ao substrato e tempos de ciclo celular mais curtos. As células NCI-H295 cultivadas em Ultrosor G – suplemento produzido na França substituto ao soro fetal bovino – demonstravam aumento da taxa de crescimento, mas as células continuavam a crescer como agregados flutuantes ou células ligeiramente aderidas ao substrato. Durante um período de três meses, no qual o meio de cultura foi renovado a cada três dias e as células não aderentes foram descartadas, foram selecionadas apenas as células com melhor aderência aos plásticos de garrafas e placas de cultivo celular. Após a caracterização, essa sub-linhagem adaptada foi designada como H295R para diferenciá-la das células originais. Em comparação com a célula H295 original, células H295R crescem como uma monocamada fortemente aderente com um tempo de duplicação da população reduzido de cinco para dois dias (figura 3.3).

Figura 3.3 – Fotomicrografias da linhagem de células H295R em baixa (esquerda) e alta (direita) densidade celular.

ATCC Number: **CRL-2128**
Designation: **NCI-H295R**

Fonte: American Type Culture Collection (ATCC).

A sub-linhagem de células H295R é propagada em meio DMEM contendo fator F12 de Ham (1:1) suplementado com piridoxina, L-glutamina, HEPES 15 mM, 1% ITS *plus Collaborative Biomedical Products*, contendo insulina (6,25 μ g/ml), transferrina (6,25 μ g/ml), selênio (6,25 ng/ml), mais albumina de soro bovino (1.25 mg/ml) e ácido linoleico (5,35 μ g/ml), 1% de penicilina/ estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,01% de gentamicina e 2% de Ultrosor G (BioSeptra SA, Villeneuve la Garenne Cedex, França). Em razão da dificuldade na importação do Ultrosor G, substituto de soro necessário para manter as células NCI-H295R, uma população dessas células foi selecionada para crescer em um substituto de soro fetal bovino comercialmente disponível nos Estados Unidos (Nu-Serum type I – *Collaborative Biomedical Products*). A linhagem que pode ser cultivada em Nu-Serum está disponível pela *American Type Culture Collection* (ATCC) sob o número CRL-2128.

A capacidade das células H295R de produzirem esteroides com origens de múltiplas zonas da glândula adrenal mostra que essa linhagem mantém-se pluripotente no que concerne a diferenciação adrenocortical. Esse grande espectro de esteroides produzidos pelas células H295R encontra-se fora das vias “normais” de esteroidogênese por células adrenais. Essa produção de vasta gama de esteroides foi demonstrada mesmo em condições basais de cultivo.

Da forma que os tecidos adrenocorticais normais, as células H295R são responsivas a estímulos da via PKC (proteína cinase C), usando ésteres de forbol, resultando em diminuição da CYP11A1 e CYP17, mas um acúmulo da CYP21. Assim como em outras células adrenais de mamíferos, os níveis de mRNA das enzimas CYP17 e 3 β -HSD parecem ser diferencialmente regulados nas NCI-H295R. Estímulos para a via PKA, como forskolina, aumentam 3 β -HSD, mas possuem maior efeito sobre os níveis de mRNA da CYP17. Sendo assim, nas células H295R, a ativação de vias PKC tendem a corroborar uma expressão esteroidogênica com perfil semelhante à zona glomerulosa, enquanto a ativação de PKA promove expressões semelhantes à zona fasciculada.

3.1.2 Origem e características da linhagem de células Y1

A linhagem celular Y1 foi derivada de tumor que surgiu em um camundongo adulto LAF1 (cruzamento C57L $\times$ A/HeJ) macho, o qual foi exposto à radiação (SCHIMMER, 1979). Não foi definido se o tumor foi induzido pela radiação ou espontaneamente. O tumor produz corticosterona como um dos principais esteróides e responde à corticotrofina (ACTH) com taxas aumentadas de esteroidogênese, indicando origem da zona fasciculada do córtex da adrenal.

O tumor foi propagado por transplante intramuscular e foi altamente metastático por meio de passagens iniciais *in vivo*. No entanto, com passagens subsequentes, o tumor perdeu sua propriedade metastática e, embora tenha mantido sua capacidade esteroidogênica e capacidade de resposta para a ACTH, também perdeu a capacidade de produzir corticosterona. Esse tumor transplantável foi adaptado, então, para crescer *ex vivo* por alternância de propagação de células tumorais dispersas como monocamadas em cultura e como tumores em camundongos. Essa técnica pareceu selecionar variantes de células resistentes que mantiveram sua diferenciação fenotípica, mas teve uma capacidade

aprimorada para crescer em cultura. A linhagem celular Y1 foi clonada a partir deste tumor adaptado à cultura e depositado na *American Type Culture Collection* (ATCC) sob o número CCL-79.

As células Y1, em sua maior parte, crescem em cultura como células achatadas, aderentes com formas poliédricas mantidas por uma rede de fibras de estresse e adesões focais perto da superfície celular (figura 3.4). As células possuem núcleos ovais, nucléolos proeminentes e mitocôndrias alongadas com cristas lamelares e semelhantes a prateleiras. Ocasionalmente, células arredondadas características de mitose também são observadas. Em resposta ao ativador de adenilato ciclase, a forskolina, a qual aumenta níveis intracelulares de cAMP, as células Y1 retraem seu citoplasma estendido e tornam-se esféricas com processos curtos e destacam-se facilmente do substrato em que são cultivadas. A suplementação com soro fetal bovino é essencial para a proliferação da linhagem Y1. A redução do teor de soro para concentrações menores que 0,2% diminui a síntese de DNA após uma rodada de replicação e retém a divisão celular no início do estágio G1 do ciclo celular.

Figura 3.4 – Fotomicrografias da linhagem de células Y1 em baixa (esquerda) e alta (direita) densidade celular.

Fonte: American Type Culture Collection (ATCC).

O atual clone Y1 fornecido pela ATCC produz esteroides a uma taxa de 0,72 µg/mg de proteína por hora, mas não responde ao ACTH. Os efeitos do cAMP na forma celular estão intimamente ligados aos efeitos deste agente na esteroidogênese e, possivelmente, refletem um envolvimento do citoesqueleto na disponibilidade de colesterol às mitocôndrias.

A linhagem celular Y-1 também é um modelo muito útil no estudo dos efeitos esteroidogênicos nas glândulas adrenais, pois possui características semelhantes às daquelas da linhagem H295R (YASUMURA et al., 1966).

Sucintamente, via esteroidogênica está ilustrada pela figura 3.5.

Figura 3.5 – Via esteroidogênica.

Num trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foi observado que a ivermectina, medicamento de uso humano e veterinário empregado amplamente como antiparasitário, promoveu alterações comportamentais (redução da coordenação motora), bem como reduziu os níveis séricos de testosterona e de neurotransmissores do sistema nervoso central de ratos machos (MOREIRA et al., 2017). A fim de contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na redução dos níveis de testosterona, no presente estudo empregou-se um ensaio de esteroidogênese para avaliar se a ivermectina e o vermelho de fenol podem afetar a via da produção de testosterona.

3.3 OBJETIVO

Avaliar a influência da exposição à ivermectina, nos níveis de testosterona, em células das linhagens H295R (humana) e Y1 (animal).

3.3.1 Objetivos específicos

- Padronizar o cultivo de linhagens celulares comerciais de carcinoma adrenocortical (H295R e Y1).
- Utilizar diferentes concentrações de ivermectina (10^{-4} a 10^{-1} μ M) como estímulo teste em cultura de células H295R e Y1.
- Identificar se existe influência do vermelho de fenol na produção de testosterona *in vitro*.
- Comparar a viabilidade celular entre as células H295R e Y1, por meio de citometria de fluxo.
- Quantificar testosterona em meio de cultura proveniente das linhagens celulares H295R e Y1.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Obtenção das células

As células H295R e Y1, empregadas no presente trabalho, foram gentilmente cedidas pela Prof.^a Dra. Claudimara Ferini Pacicco Lotfi, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo.

Este ensaio utiliza como base o protocolo desenvolvido pela OECD 456 (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) que aplica o cultivo de células humanas e de animais para identificar xenobióticos, cujo alvo são componentes

intracelulares da via que se inicia após a atuação nos receptores de hormônios gonadotrópicos até a produção de hormônios esteroidais sexuais (testosterona e estradiol).

3.4.2 Descongelamento e padronização do cultivo das células

As células foram descongeladas e diluídas em meio de cultura e centrifugadas por 5 minutos a 160 g (centrífuga Eppendorf 5804R) para retirar o DMSO. O sobrenadante foi descartado e o meio de cultura com soro foi acrescentado, aos poucos e lentamente, no volume permitido pela garrafa. As células foram delicadamente ressuspensas e adicionadas em garrafa de cultura para acompanhar a adesão e o espalhamento.

As células permaneceram em garrafas até a terceira passagem, onde a confluência estava de acordo com a recomendação da ATCC, a qual estabelece o mínimo de 300.000 mil células/mL para a realização do ensaio. O meio de cultura foi substituído a cada três dias para reposição de nutrientes e remoção de sub-produtos.

O cultivo das células H295R foi realizado em dois meios de cultura, um com vermelho de fenol (RPMI 1640– Sigma-Aldrich) e outro sem este indicador de pH (DMEM F12 – Sigma-Aldrich), ambos contendo 2% de Soro Fetal Bovino (SFB, Sigma-Aldrich) e 1% de ITS+ (Sigma-Aldrich) como suplementos. As células Y1 também foram mantidas nos mesmos meios de cultura, contendo 10% de SFB. Penicilina/estreptomicina/gentamicina foram adicionadas nas concentrações usualmente preconizadas para cultura de células. As linhagens foram semeadas em triplicata na densidade de 3×10^5 células/poço, em placas de 24 poços e sua adesão ocorreu ao longo de 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Em seguida, adicionou-se ao meio soluções contendo diferentes concentrações de reagentes controle positivo e negativo da produção de testosterona (forskolina e procloraz), e ivermectina em diluente preconizado pela OECD, o dimetilsulfóxido (DMSO). As células foram incubadas por mais 48 horas. Ao término da incubação, o sobrenadante (meio de cultura) foi coletado e mantido a -80°C até o momento da quantificação da testosterona e as células foram avaliadas quanto a sua viabilidade pelo kit LIVE/DEAD® (Invitrogen - Molecular Probes) e citometria de fluxo.

3.4.3 Análise de viabilidade celular por citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi realizada em citômetro FACSCalibur (BD Biosciences) equipado com dois lasers. Inicialmente, as células foram delimitadas em um *gate* para a exclusão de debris. Em seguida, a leitura das amostras foi realizada em dois canais: FL1 (verde, calceína AM) e FL2 (vermelho, homodímero de brometo de etídeo). Para o ajuste dos valores negativos de fluorescência, utilizou-se uma amostra de células sem qualquer marcação. Já para o ajuste de compensação (sobreposição entre os canais verde e vermelho), utilizou-se uma amostra de células sabidamente vivas coradas apenas com verde, e uma amostra de células sabidamente mortas, coradas apenas com vermelho. Confirmou-se a adequação do ajuste com um controle positivo de células mortas coradas com ambos, calceína e brometo de etídeo. Para todas as amostras foram salvos 10.000 eventos (células) do *gate* para exclusão de debris.

Os arquivos gerados pelo citômetro foram transferidos para outro computador, no qual os dados foram analisados por meio de *software* FlowJo, versão 7.6.4. A análise seguiu os mesmos passos: delimitação de *gate* de células para exclusão de debris e avaliação do padrão de marcação em FL1 e FL2, considerando primeiramente os controles positivos e negativos de morte. O percentual de células mortas em relação aos 10.000 eventos salvos foi exportado para uma planilha de Excel e a viabilidade foi encontrada a partir do cálculo $\text{viabilidade} = 100\% - \% \text{ de morte}$.

Utilizou-se o kit LIVE/DEAD® (Invitrogen - Molecular Probes), em citometria de fluxo, para avaliar a viabilidade das células H295R e Y1 expostas a diferentes concentrações de ivermectina, assim como nos respectivos grupos controles. A calceína AM e o brometo de etídeo homodímero 1 promovem a fluorescência de duas cores e possibilita mensurar a atividade de esterases intracelulares e a integridade da membrana plasmática. As células vivas fluorescem verde e as mortas em vermelho.

Para a análise, após a coleta do meio de cultivo, as células foram lavadas uma vez com 1 mL de tampão PBS 1X. Como as células são aderentes, foi adicionado 100 µL de tripsina 0,25% para que ocorresse o destacamento completo das células. A ação da tripsina foi interrompida com 250 µL de PBS 1x contendo 10% de soro fetal bovino. As triplicatas foram recolhidas e adicionadas em um único tubo de citometria de fluxo. Em seguida, foram centrifugadas por 5 minutos a 160 g; o sobrenadante foi descartado e o botão de células foi

ressuspendido em PBS 1X contendo calceína 2 μM e brometo de etídeo 4 μM . Após 15 minutos de incubação, procedeu-se a leitura das células por citometria de fluxo.

3.5 PREPARAÇÃO DA IVERMECTINA

Para o ensaio *in vitro* optou-se pela utilização do padrão secundário de ivermectina (Hebei Veyong Animal Pharmaceutical Co. Ltd.) para excluir possíveis variáveis oriundas dos excipientes utilizados na formulação comercial. Para tanto, a partir de uma solução estoque de ivermectina $10^2 \mu\text{M}$ em DMSO, realizou-se diluições em água ultrapura para obtenção da molaridade do fármaco desejada em cada poço. A molaridade variou de 10^{-5} a $10^2 \mu\text{M}$ para o ensaio de citotoxicidade e de 10^{-4} a $10^{-1} \mu\text{M}$ para a avaliação da concentração de testosterona. O volume utilizado da solução de ivermectina foi de 1 μL por poço da placa de 24 poços.

3.6 QUANTIFICAÇÃO DA TESTOSTERONA

Os níveis de testosterona em meio de cultura de células foram determinados pela técnica de enzima imunoensaio de duplo-anticorpo, em triplicata, empregando-se kit comercial ELISA (Cayman Chemical®, Ann Arbor, MI, EUA, catálogo nº582701).

3.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.7.1 Citotoxicidade

As células (H295R e Y1) foram diluídas em meio de cultura e centrifugadas por 5 minutos a 160 g para retirar o DMSO. O sobrenadante foi descartado e o meio de cultura com soro foi acrescentado, aos poucos e lentamente, no volume permitido pela garrafa. As células foram delicadamente ressuspendidas e adicionadas em garrafa de cultura para acompanhar a adesão e o espraçamento. Elas permaneceram em garrafas até a terceira passagem, onde a confluência estava de acordo com a recomendação da ATCC, a qual estabelece o mínimo de 300.000 mil células/mL para a realização do ensaio. O meio de

cultura foi substituído a cada três dias para reposição de nutrientes e remoção de subprodutos.

Após atingir a confluência almejada, as células foram semeadas em placas de 24 poços e sua adesão ocorreu em 24 horas em estufa, a 37°C, com 5% de CO₂. Em seguida, foram adicionados ao meio 1 µL de diferentes soluções de ivermectina para a obtenção das concentrações desejadas em cada poço da placa de 24 poços, as quais variaram de 10⁻⁵ a 3 µM para as células H295R e 10⁻³ a 10² µM para as células Y1. A seguir, as células foram incubadas por mais 48 horas. Ao término da incubação, as células foram avaliadas quanto a sua viabilidade por citometria de fluxo.

3.7.2 Avaliação da concentração de testosterona *in vitro*

Para a quantificação da concentração de testosterona no cultivo de células H295R e Y1, foi considerada a citotoxicidade da ivermectina para essas células.

O meio de cultivo de ambas as células de cada poço foi armazenado em freezer - 80°C até o dia da análise da concentração de testosterona, conforme descrito no item 3.6.

3.7.3 Análise estatística

Para as análises estatísticas foi empregado o software InStat (Prism 6.01, GraphPad, San Diego, CA, EUA). A análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey foi empregada para analisar a concentração de testosterona no cultivo celular. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

3.8 RESULTADOS

3.8.1 Viabilidade das células H295R

A tabela 3.1 apresenta os resultados do percentual de mortalidade e viabilidade das células H295R e as figuras 3.6 e 3.7 ilustram a região da população de células H295R selecionadas para a análise de viabilidade por citometria de fluxo, assim como a

porcentagem de morte celular frente aos diferentes estímulos experimentais. Nota-se que apenas o grupo controle de morte (metanol) apresentou reduzida (14,90%) viabilidade celular; os demais grupos apresentaram viabilidade superior a 80%.

Tabela 3.1 – Viabilidade da linhagem celular H295R exposta às diferentes concentrações de ivermectina, assim como os respectivos controles (DMSO) em cada placa de 24 poços.

Grupos	% viabilidade
Controle I (DMSO)	90,66
Controle II (DMSO)	92,64
Forscolina 10^{-1} μ M	91,19
Forscolina 10 μ M	93,82
Ivermectina 10^{-5} μ M	91,42
Ivermectina 10^{-4} μ M	91,10
Ivermectina 10^{-3} μ M	93,05
Ivermectina 10^{-2} μ M	89,90
Ivermectina 10^{-1} μ M	90,55
Ivermectina 5 μ M	84,70
Procloraz 10^{-2} μ M	93,95
Procloraz 10^{-1} μ M	91,09
Controle de morte (metanol)	14,90

Figura 3.6 – Análise da viabilidade das células H295R por citometria de fluxo. I – população total e o gate de exclusão de debris; II – controle negativo de morte em DMSO; III – controle positivo de morte em metanol; IV – procloraz 10^{-1} μ M (forte inibidor de testosterona); V – forskolina 10^{-1} μ M (forte indutor de testosterona).

Figura 3.7 – Gate de células H295R que incorporaram o iodeto de propídio (percentual de morte) expostas à ivermectina (I = 10^{-5} μ M; II = 10^{-4} ; III = 10^{-3} μ M; IV = 10^{-2} μ M; V = 10^{-1} e VI = 5 μ M).

A tabela 3.2 apresenta os resultados do percentual de mortalidade e viabilidade das células Y1 e as figuras 3.8 e 3.9 ilustram a região da população de células Y1 selecionadas para a análise de viabilidade por citometria de fluxo, assim como a porcentagem de morte celular frente aos diferentes estímulos experimentais. Nota-se que as duas maiores concentrações de ivermectina (50 e 100 μM) reduziram a viabilidade celular das células Y1 (inferior a 12%) e o grupo controle de morte (metanol) reduziu a viabilidade celular para 36,80%.

Tabela 3.2 – Viabilidade da linhagem celular Y1 exposta às diferentes concentrações de ivermectina, assim como os respectivos controles (DMSO) em cada placa de 24 poços.

Grupos	% viabilidade
Controle I (DMSO)	85,80
Controle II (DMSO)	92,80
Forscolina 10^{-1} μM	87,30
Forscolina 10 μM	92,03
Ivermectina 10^{-3} μM	83,90
Ivermectina 10^{-2} μM	88,70
Ivermectina 10^{-1} μM	86,70
Ivermectina 5 μM	83,50
Ivermectina 10 μM	87,10
Ivermectina 50 μM	10,10
Ivermectina 10^2 μM	11,10
Procloraz 10^{-2} μM	91,57
Procloraz 10^{-1} μM	87,10
Controle de morte (metanol)	36,80

Figura 3.8 – Análise da viabilidade das células Y1 por citometria de fluxo. I – população total e o *gate* de exclusão de debris; II – controle negativo de morte em DMSO; III – controle positivo de morte em metanol; IV – procloraz $10^{-1}\mu\text{M}$ (forte inibidor de testosterona); V – forskolina $10^{-1}\mu\text{M}$ (forte indutor de testosterona).

Figura 3.9 – Gate de células Y1 que incorporaram o iodeto de propídio (percentual de morte) expostas à ivermectina (I= $10^{-3}\mu\text{M}$; II = $10^{-2}\mu\text{M}$; III = $10^{-1}\mu\text{M}$; IV = $5\mu\text{M}$; V = $10\mu\text{M}$ e VI = $50\mu\text{M}$).

3.8.3 Quantificação de testosterona no cultivo de células H295R e Y1

A figura 3.10 ilustra a concentração de testosterona liberada pelas linhagens celulares H295R e Y1, expostas ou não ao vermelho de fenol. Nota-se que as células H295R são capazes de produzir maior quantidade de testosterona (cerca de 0,5 a 1,8 ng/mL) do que as células Y1 (cerca de 0,03 a 0,12 ng/mL). Em células H295R, a forskolina (FOR) atuou como forte indutora da produção de testosterona e a procloraz como forte inibidora da produção desse hormônio, enquanto a exposição ou não ao vermelho de fenol não interferiu na produção de testosterona (figura 3.10A). Em células Y1, nota-se que a presença de vermelho de fenol prejudicou a produção de testosterona na maioria dos grupos, inclusive no grupo tratado com o indutor de produção de testosterona, a forskolina (figura 3.10B).

Figura 3.10 - Efeitos da exposição à ivermectina na produção de testosterona (média e erro padrão) pelas linhagens celulares H295R (A) e Y1 (B) cultivadas na presença de vermelho de fenol ou não. Em (A), as letras indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0,05$, Anova de uma via, seguida do teste de Tukey) e sem diferenças entre a exposição ou não ao vermelho de fenol. Em (B), o asterisco indica diferença significativa entre a exposição ou não ao vermelho de fenol ($p < 0,05$, Anova de uma via, seguida do teste de Tukey) e sem diferenças entre os grupos.

A) Células H295R

B) Células Y

3.9 DISCUSSÃO

No presente trabalho, avaliou-se a influência da ivermectina e do vermelho de fenol na produção de testosterona em cultura de células H295R e Y, ambas linhagens de células tumorigênicas produtoras de esteróide.

O ensaio de viabilidade celular foi fundamental para determinar se as diferenças de concentração de hormônios no meio de cultivo é resultado da produção ativa pelas células ou apenas pela ruptura da membrana plasmática por causa de morte celular. Valores de viabilidade menores ou iguais a 80% levam à exclusão das amostras pela interferência da citotoxicidade na quantificação dos hormônios.

No presente estudo, a faixa de concentração de ivermectina utilizada para a avaliação da produção esteroidogênica *in vitro* foi de 10^{-4} a 10^{-1} μM , pois nestas concentrações não foi observado citotoxicidade (viabilidade superior a 80%).

O vermelho de fenol, indicador de pH comumente usado em meios de cultura de tecidos e que possui similaridade estrutural com certos estrogênios não esteroidais, foi aqui avaliado, uma vez que poderia interferir na produção de testosterona *in vitro* (BERTHOIS et al., 1986). No presente estudo, foi possível observar que a adição do vermelho de fenol prejudicou a produção de testosterona apenas nas células Y1, não interferindo naquela das células H295R. Portanto, o uso do vermelho de fenol deve ser evitado em estudos de esteroidogênese que utilizem as células Y1. Quanto às células H295R, além de não sofrerem influência do vermelho de fenol presente no meio de cultura, estas se mostraram mais eficientes na produção de testosterona (0,5 - 1,8 ng/mL), quando comparadas com as células Y1 (0,03 - 0,10 ng/mL).

Em ambas as culturas celulares foram empregados os controles positivo (forskolina) e negativo (procloraz) e apenas na cultura de células H295R foi possível caracterizar esses efeitos na produção de testosterona, como observado num estudo inter-laboratorial utilizando diferentes técnicas analíticas (HECKER et al., 2011). Esse achado, em parte, pode ser atribuído a baixa produção de testosterona pelas células Y1, o que dificultaria a constatação desses efeitos.

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que a ivermectina, em ambas as linhagens celulares, não foi capaz de alterar a produção de testosterona.

Inicialmente acreditou-se que as células Y1 de camundongos poderiam ser um modelo valioso para a avaliação esteroidogênica em Medicina Veterinária, pois existem diferenças relacionadas à espécie animal na esteroidogênese, como por exemplo, a ausência de expressão de CYP17 após o nascimento em glândulas adrenais de camundongo e rato (PERKINS, 1988; AUCHUS et al., 1998, PELLETIER et al., 2001), bem como diferenças nos níveis de atividade da CYP17liase (BROCK & WATERMAN, 1999; AUCHUS et al., 1998). Os resultados aqui obtidos para as células Y1 mostraram que ela não parece ser um modelo adequado para esta finalidade.

3.10 CONCLUSÃO

Observou-se que as células H295R foram mais adequadas do que as células Y1 para avaliação *in vitro* da produção de testosterona e que a ivermectina não altera a produção desse hormônio em células H295R. Constatou-se também que a presença do vermelho de fenol no cultivo celular pode prejudicar a produção de testosterona pelas células Y1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUCHUS, R. J., LEE, T. C., & MILLER, W. L. (1998). Cytochrome b 5 augments the 17, 20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. **Journal of Biological Chemistry**, 273(6), 3158-3165.

BERTHOIS, Y.; KATZENELLENBOGEN, J. A.; KATZENELLENBOGEN, B. S. (1986). Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: Implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. **Proc Natl Acad Sci US A**. 1986 Abr; 83 (8): 2496-500.

BROCK, B. J., & WATERMAN, M. R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species. **Biochemistry**, 38(5), 1598-1606.

GAZDAR A, OIE HK, SHACKLETON CH, CHEN TR, TRICHE TJ, MYERS CE, CHROUSOS GP, BRENNAN MF, STEIN CA, LA ROCCA RV. Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. **Cancer Research**, v. 50, p. 5488-5496, 1990.

HECKER M., HOLLERT, H., COOPER, R., VINGGAARD, A. M., AKAHORI, Y., MURPHY, M.,... & BUCKALEW, A. (2011). The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay: Phase 3. Final inter-laboratory validation study. **Environmental Science and Pollution Research**, 18(3), 503-515.

MILLS, A.; SKINNER, G. A. (2011). A novel 'fizziness' indicator. **The Analyst**. 136 (5): 894–896.

MOREIRA, N.; SANDINI, T.M.; REIS-SILVA, T.M.; NAVAS-SUÁREZ, P.; AUADA, A.V.V.; LEBRUN, I.; FLÓRIO, J.C.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Ivermectin reduces motor coordination, serum testosterone, and central neurotransmitter levels but does not affect sexual motivation in male rats. *Reproductive Toxicology*, v. 74, p. 195-203, 2017.

OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Test No. 456: H295R Steroidogenesis Assay. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects** (2011). <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-tg456> 2011508.pdf (accessed 23 March 2018).

PELLETIER G., LI, S., TREMBLAY, Y., BELANGER, A., & LABRIE, F. (2001). Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome

P450 (scc), 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450 (c17) in rat adrenal cortex and gonads. **Journal of endocrinology**, 171(2), 373-383.

PERKINS, L. M., & PAYNE, A. H. (1988). Quantification of P450_{scc}, P450_{17 α} , and iron sulfur protein reductase in Leydig cells and adrenals of inbred strains of mice. **Endocrinology**, 123(6), 2675-2682.

SAHA, U.; MUKHERJEA, K. K. (2015). Development of a multifunctional biomimicking L-cysteine based oxovanadium (IV) complex: synthesis, DFT calculations, bromo-peroxidation and nuclease activity". **RSC Advances**. 5 (114): 94462–94473.

SCHIMMER, B.P. Adrenocortical Y1 cells. **Methods in Enzymology**, v. 58, p. 570-574, 1979.

TAMURA, Z.; MAEDA M. (1997). Differences between phthaleins and sulfonphthaleins. **Yakugaku Zasshi (in Japanese)**. 117 (10–11): 764–770.

WELSHONS, W. V.; WOLF, M. F.; MURPHY, C. S.; JORDAN, V. C. Estrogenic activity of phenol red. **Mol. Cell. Endocrinol.** 1988, 57, 169–178.

YASUMURA, Y., TASHJIAN, A. H., & SATO, G. H. (1966). Establishment of four functional, clonal strains of animal cells in culture. **Science**, 154(3753), 1186-1189.

4 CAPÍTULO 3: Possível atividade antitumoral da ivermectina: modelo em cultivo primário de melanoma

O desenvolvimento do câncer (neoplasia maligna) envolve uma série de eventos multifatoriais, geralmente levando certo tempo (no ser humano, décadas) para ocorrer. Na maioria dos casos, o resultado final são genes alterados que regulam a diferenciação e o crescimento celular. Em termos de alteração genética para formar uma célula cancerígena, o genoma da célula anormal adquire mutações nos genes supressores de tumores, proto-oncogenes e outros genes envolvidos na regulação do crescimento celular. Marcadores moleculares são constantemente estudados para determinar como sua presença ou ausência influencia o desenvolvimento do câncer (TACAR et al, 2012).

O tratamento do câncer pode ser feito com o uso de um único agente químico (monoterapia) ou associação de agentes. A monoterapia pode resultar no desenvolvimento de resistência ao quimioterápico, o que faz com que melhores esquemas terapêuticos sejam estudados para atingir mais alvos com atividades anti-tumorais (GUAN et al, 2016), por meio sinergismo entre os fármacos. Neste contexto, o reposicionamento de fármacos, ou seja, a busca de nova indicação terapêutica para um medicamento aprovado pelos órgãos competentes, ganha relevância nos dias atuais, pois diminui o tempo e os custos na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos.

A relação custo-efetividade da quimioterapia do câncer é relevante para a escolha de protocolos terapêuticos, pois os recursos podem ser limitados tanto no sistema de saúde privado e muito mais escassos no Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil. Assim, o reposicionamento de fármacos efetivos, de fácil acesso no SUS e de baixo custo poderiam ser úteis para expandir o acesso às terapias caso atinjam respostas similares ou superiores aos novos quimioterápicos.

A doxorubicina, disponível no SUS, é um medicamento amplamente utilizado como agente antineoplásico para diversos tipos de cânceres (ZUNINO et al, 1972; GIGLI et al, 1989; GEWIRTZ et al, 1999; BUCHHOLZ et al, 2002; MINOTTI et al, 2004; DANESI et al, 2002; SHAW et al, 2004; KIM et al, 2007; ASHLEY & POULTON, 2009; CARVALHO et al, 2009; DO et al, 2009) e o sinergismo com outros medicamentos já foi demonstrado por diversos grupos de pesquisa (MUSTAFA et al, 2015; AL-ABBASI et al, 2016; JIANG ET AL, 2017; PANCHUK et al, 2017; WANG et al, 2017). Apesar da ampla eficácia anti-tumoral da

doxorrubicina, o emprego da monoterapia tem sido apontado como causa do frequente mecanismo de resistência das células neoplásicas (PANNEERSELVAM ET AL, 1987; SMYLIE et al, 2007; VOROBIOF et al, 2003).

A literatura carece de artigos que relacionem o sinergismo da doxorrubicina com a ivermectina, medicamento amplamente empregado com ecto- e endoparasiticida. Por outro lado, Jiang et al (2019) mostraram que a ivermectina em dose muito baixa não induziu citotoxicidade evidente e reverteu drasticamente a resistência das células tumorais aos quimioterápicos *in vitro* e *in vivo*. Esses autores sugeriram que a ivermectina reverteu a resistência principalmente pela redução da expressão da glicoproteína P (gp-P), via inibição do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), e não pela inibição direta da atividade da gp-P.

Estudos recentes mostraram que a ivermectina também pode desempenhar importante papel na terapia antitumoral (DOU et al., 2016; WANG et al., 2016; JUAREZ et al., 2018).

No presente estudo avaliou-se a atividade antitumoral da ivermectina em associação ou não com a doxorrubicina, uma vez que os resultados dos ensaios preliminares com a ivermectina *in vitro* em células de carcinoma adrenocorticais ensejaram essa possibilidade (ver Capítulo 2). Optou-se aqui avaliar essa ação em linhagens celulares de melanoma pelo fato de ser um tipo de cancer de pele de difícil tratamento, tanto em cães como em seres humanos.

4.1 REVISÃO DE LITERATURA

São aqui abordados breves considerações sobre: as características do melanoma; a atividade antitumoral da doxorrubicina e da ivermectina; e as vias de sinalização Wnt e mTor no melanoma. A via de sinalização Wnt é complexa e essa denominação é derivada do gene Wg de drosófila e do gene Int de vertebrados; essa via é iniciada pela ligação das proteínas Wnt aos receptores Wnt de superfície celular que interagem com o complexo de sinalização da axina e uma combinação de mensageiros secundários que influenciam as ações da β -catenina. A via mTor (*mamalian target of rapamicin*) está envolvida como crescimento e proliferação celular e com o controle traducional que abrange a proteína alvo

da rapamicina (ou sirolimus é uma lactona macrocíclica produzida por *Streptomyces hygroscopicus* que possui atividade imunossupressora) em mamíferos.

4.1.1 Melanoma

A incidência do melanoma é relativamente baixa, pois representa apenas 4% de todos os cânceres dermatológicos, mas o melanoma metastático é responsável por 80% das mortes causadas pelo câncer de pele, devido às suas propriedades agressivas e resistência aos medicamentos (GROB et al., 2015; ONO et al., 2015). O melanoma agressivo representa a terceira causa mais comum de metástase cerebral (10 – 40% dos pacientes com melanoma), após câncer de mama e pulmão (GOULART et al., 2011).

O comportamento invasivo das células do melanoma parece ser um remanescente de sua origem na crista neural, uma característica que distingue este câncer dos outros cânceres de pele (ARÓZARENA & WELLBROCK, 2017). Devido ao seu potencial invasivo, as células do melanoma têm sido amplamente utilizadas para estudar mecanismos gerais de invasão de células cancerígenas (SABEH et al., 2009; SAHAI & MARSHALL, 2003; SANZ-MORENO & MARSHALL, 2009). Além disso, a ideia de direcionar a invasão de células do melanoma como meio de intervenção terapêutica estimulou uma era de intensa pesquisa com o objetivo de descobrir os principais reguladores da invasividade do melanoma (ARÓZARENA & WELLBROCK, 2017).

Apesar dos avanços tecnológicos da indústria farmacêutica ou de biotecnologia, ainda há escassez de tratamento para determinados grupos populacionais, pois os melanomas são tumores cutâneos altamente metastáticos e a doença metastática é notoriamente difícil de manejar. A radiação cerebral, a radioterapia estereotáxica e a quimioterapia produzem apenas aumentos modestos na sobrevida global desses pacientes (KIRCHER et al., 2016).

A imunoterapia alcançou algum sucesso em certos subgrupos de pacientes com melanoma; no entanto, a regulação das moléculas imunológicas efetoras, que são importantes para a imunogenicidade do melanoma, permanece pouco compreendida (SCHADENDORF et al., 2015; ROESCH, 2015). Portanto, é fundamental continuar a pesquisa em novas abordagens terapêuticas.

4.1.2 Atividade antitumoral da doxorubicina

A doxorubicina (ou hidroxildaunorubicina) é um antibiótico da família das antraciclinas (isolado de culturas de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*), com atividade antitumoral, que age impedindo a multiplicação e as funções das células tumorais. Esse quimioterápico tem sido empregado com êxito para produzir regressão de várias neoplasias, tais como carcinoma da mama, pulmão, bexiga, tireóide e ovário; sarcomas ósseos e dos tecidos moles; linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin; neuroblastoma; tumor de Wilms; leucemia linfoblástica aguda e leucemia mieloblástica aguda (ZUNINO et al, 1972; GIGLI et al, 1989; GEWIRTZ et al, 1999; BUCHHOLZ et al, 2002; MINOTTI et al, 2004; DANESI et al, 2002; SHAW et al, 2004; KIM et al, 2007; ASHLEY & POULTON, 2009; CARVALHO et al, 2009; DO et al, 2009). Sua capacidade antitumoral tem sido amplamente reconhecida a várias décadas, limitadas apenas por sua toxicidade em células não cancerosas do organismo (TACAR et al, 2012).

A doxorubicina atua ligando-se a enzimas associadas ao DNA, podendo se intercalar nos pares de bases da dupla hélice do DNA (HILMER et al, 2004); a intercalação inibe a replicação nucleotídica e a ação da DNA e RNA-polimerase, cessando a replicação e a transcrição do RNA (TACAR et al, 2012). A doxorubicina se liga à membrana celular lipídica, conectando-se a múltiplas moléculas, como as enzimas topoisomerases I e II, causando vários efeitos citotóxicos e em conjunto com a atividade antiproliferativa, resulta em danos ao DNA (BUCHHOLZ et al, 2002). A via da apoptose (figura 4.1) é acionada quando são inibidos a tentativa de reparar as quebras na falha do DNA e o crescimento celular nas fases G1 e G2.

Esse processo ocorre quando a doxorubicina entra na célula por difusão-para se ligar, com alta afinidade, ao proteossoma do citoplasma. Um complexo de doxorubicina-proteossoma é formado quando a doxorubicina se liga à subunidade 20S do proteossoma, onde é, então, translocada pelos complexos de poros nucleares para o núcleo. A doxorubicina tem maior afinidade pelo DNA nuclear sobre o proteossoma ao qual está ligado, permitindo que ela se dissocie do proteossoma e se ligue ao DNA (CARVALHO et al, 2009). O proteossoma, que desempenha um papel crucial na homeostase celular, participa da degradação intracelular de proteínas através da via da ubiquitina/proteossoma (PETERS et al, 1994; AQUILANO et al, 2003; WANG et al, 2006; KYRATZI et al, 2007;

ARCHER et al, 2010; CAPUTI et al, 2016). A inibição das funções do proteassoma, especialmente a inibição seletiva das subunidades do tipo quimotripsina, promove a interrupção do ciclo celular, apoptose e morte celular com efeitos colaterais mínimos na renovação total da proteína celular, o que, por sua vez, torna o proteassoma um alvo quimioterapêutico ideal (HAMMERLE et al., 2013; HUSEBY et al, 2016; INFANTE et al, 2016).

Outras ações da doxorubicina incluem geração de radicais livres que causa mais danos ao DNA, inibição da produção de macromoléculas, desdobramento/separação do DNA e aumento na alquilação (GEWIRTZ, 1999; MINOTTI et al, 2004). Além disso, Ashlay e Poulton (2009) mostraram que a doxorubicina tem a capacidade de intercalar não apenas com o DNA nuclear, mas também com o DNA mitocondrial.

Figura 4.1 – Potenciais mecanismos envolvidos na apoptose e necrose induzida pela doxorubicina. DNA, ácido deoxirribonucleico; NF κ B, fator nuclear κ B; SUP, sistema ubiquitina proteassoma.

Fonte: Adaptado de TACAR et al. (2012).

A forma específica de morte celular resultante do tratamento com doxorubicina varia de acordo com sua concentração no local, a duração do tratamento e o tipo específico de câncer.

4.1.3 Atividade antitumoral da ivermectina

A ivermectina é um antiparasitário de amplo espectro de ação (atua sobre endo e ectoparasitos) do grupo das avermectinas, de uso humano e veterinário (GONZÁLEZ et al., 2009). É também um potente inibidor da replicação de flavivírus e tem como alvo específico a atividade da helicase NS3 (MASTRANGELO et al., 2012). Recentemente, a ivermectina foi apontada como um promissor agente antitumoral para cânceres de mama, cólon e ovário (WANG et al., 2016; DOU et al., 2016; HASHIMOTO et al., 2009; SETHI et al., 2014). No entanto, os mecanismos moleculares detalhados, subjacentes à supressão do crescimento tumoral, mediada pela ivermectina, ainda precisam ser elucidados.

Nesse sentido, Melotti et al. (2014) mostraram que a ivermectina inibe a via de sinalização Wnt devido ao bloqueio do gene TCF, promovendo atividade antitumoral. Draganov et al. (2015) estudaram o mecanismo de morte de células cancerígenas pela ivermectina, observando que os tumores que regulam positivamente os receptores P2X7, estão envolvidos com a regulação de altas concentrações de ATP no microambiente tumoral. A elevada concentração de ATP promoveria a progressão do tumor, e se os canais fossem sensibilizados pela ivermectina, causaria a morte das células cancerígenas. Esses autores também relataram que a atividade antitumoral da ivermectina pode ser sinérgica com outros agentes quimioterápicos, como a doxorrubicina e paclitaxel, os quais induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Mais recentemente, JUAREZ et al. (2018), considerando o reposicionamento de fármacos, abordaram a atividade antitumoral da ivermectina, mostrando que poderia estar relacionada a diversos alvos celulares. Esses autores apontaram nove mecanismos antitumorais da ivermectina, os quais estão ilustrados pela figura 4.2, a saber:

1. A ivermectina inibe a bomba de glicoproteína P, que induz um fenótipo de resistência a múltiplas drogas na célula cancerosa.
2. A ivermectina atua como ionóforo e regula positivamente os canais de cloro (Cl^-) para gerar apoptose e morte celular osmótica.
3. Ao diminuir a função do complexo mitocondrial I, a ivermectina limita o movimento de elétrons na via de fosforilação oxidativa que estimula a taxa de consumo de oxigênio para gerar ATP para a célula. Concomitantemente, há redução nos níveis de fosforilação da proteína quinase B (Akt), impactando no processo de biogênese mitocondrial. Além

disso, alterações na maquinaria mitocondrial estão relacionadas com níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio (ROS) que danificam o DNA.

4. A ivermectina induz morte celular imunogênica por meio da estimulação de um microambiente enriquecido em ATP e HMGB1 (proteína abundante no núcleo celular, que foi inicialmente descrita como reguladora da transcrição gênica por ligar-se ao DNA promovendo alterações conformacionais na fita dupla, o que permite a ação de outros fatores nucleares), promovendo a inflamação. A ivermectina também aumenta a sensibilidade ao ATP e à sinalização do cálcio (Ca^{2+}) nos receptores de membrana P2X, particularmente P2X4 e P2X7, para induzir respostas imunes dependentes de ATP.

5. A ivermectina promove a poli-ubiquitinação da quinase PAK1, que a direciona para a degradação no proteassoma. A PAK1 defeituosa, por sua vez, inibe a via Akt/mTor. Ao mesmo tempo, a ivermectina estimula a expressão de Beclin1 e Atg5, ambas relacionadas com a indução da autofagia, e reduz a função do regulador negativo da apoptose Bcl-2. Juntos geram autofagia e apoptose.

6. A ivermectina reprime AXIN2, LGR5 e ASCL2, os quais são reguladores positivos de Wnt-TCF, além de estimular o repressor da sinalização do Wnt, o FILIP1L. Concomitantemente, a ivermectina promove a expressão de vários genes relacionados ao interferon (IFN), tais como IFIT1, IFIT2, IF144, ISG20, IRF9 e OASL.

7. A ivermectina modifica a assinatura epigenética e a atividade de autorrenovação na célula cancerígena devido à sua capacidade de mimetizar a interação Sin3 (*Sin 3-interacting*) com a PAH2 (*paired amphipathic helix 2*) dos desreguladores associados ao câncer, SIN3A e SIN3B. O SIN3A induz naturalmente os fatores de transcrição NANOG e SOX2, que são estimulantes da pluripotência de células-tronco.

8. A ivermectina limita a função das RNA helicases NS3 e DDX23, ambas relacionadas com a biogênese do ribossomo e modificações pós-transcricionais, bem como com a degradação do mRNA. O DDX23 atua como um promotor do miR-21, que é um estimulador bem reconhecido da progressão tumoral.

9. A ivermectina inibe, preferencialmente, a população de células-tronco cancerígenas (*cancer stem cells* - CSC) e regula os genes de pluripotência e autorrenovação NANOG, SOX2 e OCT4.

Figura 4.2 - Mecanismos antitumorais da ivermectina (IVM). Para detalhes, consulte o texto.

Fonte: Adaptado de JUAREZ et al. (2018).

4.1.4 Via Wnt

A via de sinalização Wnt regula grande variedade de processos fisiológicos em diferentes espécies, com papel decisivo no desenvolvimento embrionário e na homeostase do tecido adulto, incluindo migração celular, hematopoiese e reparo de feridas (KLAUS & BIRCHMEIER, 2008; KAHN, 2014). Além da importância da sinalização do WNT em

células-tronco e hematopoiese, seu papel no desenvolvimento de linfócitos T no timo é indispensável (ZHU et al., 2019).

As Wnts constituem uma família de glicoproteínas, ricas no aminoácido cisteína, com aproximadamente 350-400 aminoácidos. Em seres humanos, existem 19 membros conhecidos dessa família, os quais desempenham papéis essenciais na diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (GILES et al., 2003; MACDONALD et al., 2009).

As glicoproteínas Wnts ligam aos receptores de superfície celular e estimulam três vias de sinalização Wnts distintas: a via canônica, a via de polaridade planar da célula e a via Wnt/cálcio (LUSTING & BEHRENS, 2003).

A via canônica (também chamada de via clássica), em particular, ativa genes-alvo através da estabilização de β -catenina (proteína codificada pelo gene CTNNB1 em seres humanos) no citoplasma e sua translocação até o núcleo (DIHLMANN & DOEBERITZ, 2005). Na ausência de sinalização Wnt, o pool citosólico de β -catenina é continuamente degradado, como resultado da sua fosforilação pela proteína GSK3 β e subsequente degradação através da via ubiquitina-proteosoma (DAKENG et al., 2012).

Além da GSK3 β outras proteínas fazem parte do complexo citoplasmático de destruição da β -catenina, como a axina, a caseína quinase-1 (CK1) e a proteína APC (*adenomatous poliposis coli*) (DAKENG, et al., 2012).

Há estudos que relacionaram a sinalização Wnt a várias enfermidades, refletindo a importância das vias de desenvolvimento na patogênese dos processos de doenças em adultos (MOON et al., 2004; CHIEN & MOON, 2007).

A via Wnt também está relacionada a diversos tipos de tumores, sólidos ou líquidos, desempenhando importante papel na formação e manutenção de células-tronco cancerígenas (POLAKIS et al., 2012; LIM & NUSSE, 2013; WEBSTER & WEERARATNA, 2013; BENOIT et al., 2014; HOLLAND et al., 2013; PROVOST & RIMM, 1999). A hiperativação da sinalização Wnt promove migração, invasão e proliferação, levando a um comportamento mais agressivo e pior prognóstico (MORIN et al., 1997; ROBINSON et al., 2008; TAKIGAWA & BROWN, 2008; UENO & GREENE, 2003).

Cerca de 25% dos pacientes com melanoma apresenta a mutação BRAFV600E quiescente ou melanócitos mutantes NRASQ61K que sofreram um processo de senescência induzida por oncogene (STOLZ et al., 1989; DHOMEN et al., 2009; JONES & CICHOWSKI, 2008). A sinalização canônica Wnt atrasa o início da senescência induzida

pelo BRAFV600E ou NRASQ61K, expressando melanócitos primários e, assim, aumenta a chance de desenvolvimento do tumor (DELMAS et al., 2007; JUAN et al., 2014; PAWLIKOWSKI et al., 2013).

Embora a sinalização Wnt canônica pareça contribuir para desenvolvimento do melanoma, o seu papel na progressão da doença é controverso (LIM & NUSSE, 2013; WEBSTER & WEERARATNA, 2013). Vários estudos clínicos e translacionais mostraram uma taxa de sobrevida global aumentada em pacientes com melanoma, cujos níveis de β -catenina nuclear estavam aumentados (KAGESHITA et al., 2001; BACHMANN, 2005; CHIEN et al., 2009). Em um modelo de camundongo com a mutação do genótipo PTEN e BRAF, a β -catenina ativada levou ao desenvolvimento acelerado do melanoma e aumento de metástase (DAMSKY et al., 2011).

O impacto da sinalização Wnt em resposta aos inibidores de BRAF no melanoma também não está claro. A sinalização Wnt ativa mostrou sinergismo com o BRAFV600E para inibir a indução de apoptose em linhagens celulares de melanoma (BIECHELE et al., 2012). Estudos clínicos demonstraram que pacientes com menores níveis de β -catenina tiveram melhor prognóstico no tratamento com inibidor de BRAF (CHIEN et al., 2014).

Sharma & Sem (2013) sugeriram que a suscetibilidade tumorigênica a um gene expresso de modo ubíquo, como a β -catenina, pode estar intimamente relacionada à sua função no desenvolvimento de cada tecido. Nesta perspectiva, a peculiaridade da β -catenina, no contexto da linhagem dos melanócitos, deve-se ao fato de que a β -catenina está envolvida não somente no controle da transcrição do gene MITF para a diferenciação dos melanócitos, mas também na modulação de sua função através da interação direta proteína-proteína (SCHEPSKY et al., 2006). O gene MITF parece ser um importante regulador da progressão do melanoma, uma vez que a supressão de seu gene reduz a proliferação e aumenta a invasividade (CARREIRA et al., 2005, 2006). Além disso, a redução da expressão de MITF tem sido associada à reorganização do citoesqueleto e à troca de fenótipo, um processo semelhante ao fenótipo de transição epitélio-mesênquimal (EMT); devido à sua origem neuroectodérmica, as células de melanoma não podem ser submetidas a EMT clássico (EICHHOFF et al., 2010, 2011). O papel crítico da β -catenina na transição fenotípica é apoiado pela expressão não correlacionada de MITF e Wnt5a, um fator autócrino/parácrino, conhecido por contribuir para a regulação da β -catenina (EICHHOFF et al., 2010).

4.1.5 VIA mTOR

A ativação oncogênica, sinalizada pela mTOR (*mammalian target of rapamycin*), induz vários processos necessários para o crescimento, sobrevivência e proliferação de células cancerígenas (figura 4.3). A mTOR é uma proteína quinase serina/treonina que pertence a família da fosfoinositideo 3- quinase (PI3K) e interage com diversas proteínas formando dois complexos multiproteicos distintos: mTORC1 e mTORC2 (LAPLANTE & SABATINI, 2012). O mTORC1 é sensível à rapamicina, ativa S6K1 e 4EBP1, os quais estão envolvidos na tradução do mRNA. Ele é ativado por diversos estímulos, como fatores de crescimento, nutrientes, energia e sinais de estresse, e vias de sinalização essenciais, como PI3K, MAPK e AMPK (POPULO et al., 2011; DAHL & GULDBERG, 2007). O mTORC2 é considerado resistente à rapamicina e geralmente é resistente a nutrientes e sinais energéticos. Ele ativa PKC- α e AKT e regula o citoesqueleto de actina.

Figura 4.3 – Ativação oncogênica, sinalizada pela mTOR. Bim, BCL2-like 11; CDK2, quinase dependente de ciclina 2; Bcl-2, célula B CLL/linfoma 2; MMP9, metalopeptidase matriz 9; Fas-L, ligante Faz; p27Kip, inibidor de quinase dependente de ciclina 1B; cMyc, homólogo de oncogene viral mielocitomatose.

Fonte: Adaptado de LAPLANTE e SABATINI (2012).

A desregulação de múltiplos elementos da via mTOR (amplificação/mutação PI3K, perda de função de PTEN – *phosphatase and tensin homolog* –, superexpressão de AKT e superexpressão de S6K1, 4EBP1 e eIF4E) tem sido relatada em muitos tipos de câncer, particularmente em melanoma, nos quais alterações nos principais componentes da via mTOR foram descritas devido aos efeitos significativos na progressão do tumor (PÓPULO et al., 2012). Portanto, mTOR é um alvo terapêutico promissor para novas terapias.

A perda de PTEN, o regulador negativo da via PI3K, foi descrita em 30 a 50% dos melanomas e se correlaciona com a progressão do melanoma e com sobrevida em cinco anos mais curta no ser humano (DAI et al., 2005; WU et al., 2003). Estudos em linhagens de células de melanoma e melanomas primários ou metastáticos descreveram que a ruptura de PTEN, pela perda ou mutação alélica, contribuiu para a patogênese do melanoma maligno (REIFENBERGER et al., 2000; CELEB et al., 2000). A perda de ativação PTEN e RAS parece comparável em sua capacidade de aumentar a sinalização oncogênica através da via PI3K (TSAO et al., 2000), devido à coexistência de mutações somáticas PTEN em melanomas portadores de mutações BRAF, mas não com NRAS (TSAO et al., 2004). A amplificação do gene AKT, devido ao aumento do número de cópias no braço longo do cromossomo 1 e ativação da mutação, também foi descrita em melanomas cutâneos (DAI et al., 2005, DAVIES et al., 2008).

No melanoma, a expressão aumentada de pAKT está associada a progressão do tumor e sobrevida mais curta dos pacientes (STAHL et al., 2004; MEIER et al., 2005). Notavelmente, a atividade da AKT parece cooperar no desenvolvimento de melanoma mediado pelo BRAFV600E (CHEUNG et al., 2008).

Assim, a expressão diferencial de proteínas da via mTOR (PTEN e formas ativas da AKT e S6) pode possivelmente ser um marcador preditivo da resposta tumoral à inibição da mTOR, conforme descrito nas linhagens de células de glioblastoma, próstata e câncer de mama (NESHAT et al., 2001; YU et al., 2001). No entanto, esses preditores de resposta têm sido propostos com base apenas em dados pré-clínicos e em tipos específicos de cânceres, e não foram clinicamente validados, com exceção da perda da expressão de PTEN, que foi usada em ensaios clínicos como marcador de glioblastoma sensível ao tratamento com rapamicina (CLOUGHESY et al., 2008). Além disso, há variação considerável nos benefícios terapêuticos detectados em pacientes que abrigam tumores

que podem responder à inibição da mTOR, porque o contexto genético no qual o fenótipo alterado ocorre também pode ser importante para a resposta do paciente à terapia.

Portanto, há importante necessidade de se identificar marcadores preditivos de resposta que possam ser úteis para selecionar prospectivamente pacientes portadores de tumores que possam responder e se beneficiar das terapias de inibição da mTOR.

4.5 OBJETIVOS

Avaliar a possível atividade antitumoral da ivermectina em associação ou não com a doxorrubicina em células de cultivo primário de melanoma canino.

4.5.1 Objetivos específicos

São objetivos específicos:

- Caracterização e cultivo de células de melanoma canino primário (MeLn);
- Avaliação da ação antitumoral da ivermectina isolada (0,5 μ M, 1,5 μ M e 2,5 μ M) ou em associação com a doxorrubicina (0,5 μ M) em células de cultivo primário de melanoma canino;
- Quantificação dos níveis de expressão de β -catenina e mTOR por qRT-PCR em células de cultivo primário de melanoma canino.

4.6 MATERIAIS E MÉTODOS

4.6.1 Preparação da ivermectina

Foi utilizado o padrão secundário de ivermectina (Hebei Veyong Animal Pharmaceutical Co. Ltda.) para excluir possíveis variáveis oriundas dos excipientes utilizados na formulação comercial. A partir de uma solução estoque de ivermectina 100 mM em DMSO, realizou-se diluições em água ultrapura para obtenção da molaridade do

fármaco desejada em cada poço, que foi de 0,5 μ M, 1,5 μ M e 2,5 μ M. O volume utilizado da solução de ivermectina foi de 1 μ L por poço da placa de 24 poços. As concentrações de ivermectina foram escolhidas a partir de estudos preliminares (Capítulo 2).

4.6.2 Preparação da doxorubicina

Utilizou-se cloridrato de doxorubicina (Fauldoxor® - Libbs Farmaceutica Ltda), apresentação em solução injetável de 50 mg em frasco-ampola; foi feita uma solução com diluição em tampão fosfato (PBS) para concentração desejada (0,5 μ M). As doses de doxorubicina foram previamente testadas em estudos preliminares, *in vitro*, realizados em nosso laboratório e baseado em achados na literatura (LI et al., 2019), no qual observaram efeito citotóxico na metade da concentração usual plasmática (2 μ M).

4.6.3 Obtenção, cultivo e caracterização de células tumorais

Foi utilizada células de melanoma canino de cultivo primário (MeLn) extraído de um linfonodo de cão, cuja amostra foi doada pelo Hospital Veterinário Botafogo, da cidade do Rio de Janeiro - RJ.

A amostra foi obtida de fragmentos tumorais, provenientes da ressecção cirúrgica de um linfonodo metastático acometido por invasão de células tumorais de um cão diagnosticado com melanoma da cavidade oral, o qual foi coletado e mantido refrigerado em meio RPMI 1640 até o processamento em laboratório. Os fragmentos foram fracionados com o auxílio de um bisturi e dissociados mecanicamente com auxílio de um êmbolo de seringa de 5 mL e filtrados em malha de nylon de 70 μ m. Em seguida, se avaliou a viabilidade e a quantificação das células pelo método de exclusão por azul de Tripan.

As células foram mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco) e 10 μ g/ml de penicilina/estreptomicina (Sigma). As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂), até atingirem a subconfluência, na concentração de 1x10⁶/mL, em uma garrafa de cultivo celular T25.

Para caracterização e confirmação da obtenção de uma linhagem primária de melanoma canino em nosso laboratório, as mesmas foram mantidas sob cultivo celular com

repique (por tripsinização) a cada 3 - 4 dias e, na passagem 14, as mesmas foram submetidas a técnica de *cell-block* em agarose 2% para confirmação quanto a histogênese por meio do método de imunistoquímica: anticorpos primários de Melan-A (clone A103, 1:100; ImPath) e PNL-2 (clone PNL-2, 1:100, Sigma).

Durante o cultivo celular para manutenção da linhagem e para preparação dos experimentos, as células foram contadas em câmara de Neubauer, previamente coradas com Trypan blue. A viabilidade das células recuperadas no cultivo foi superior a 90% durante todo o período de avaliação.

Para controle de micoplasma no cultivo foi empregado o *kit* rápido para detecção de micoplasma (Biotool). Assim, quando um sistema de cultura de células está contaminado com micoplasma, estes produzem enzimas que degradam os componentes do meio de cultura, produzindo metabólitos, cuja presença no meio é indicada pelo aparecimento da cor verde (figura 4.3). A concentração de metabólitos produzidos é proporcional a intensidade da cor verde. Se não houver metabólito presente, o resultado da reação (cor) será idêntico ao controle negativo.

Figura 4.3 - *Kit* rápido para detecção de micoplasma. 1 - Adicionar 40 μ L do tampão A. 2 - Adicionar 10 μ L da amostra. 3 - Oscilar gentilmente e deixar em temperatura ambiente por 5 minutos. 4 - Adicionar 40 μ L do tampão B. 5 - Oscilar gentilmente e deixar em temperatura ambiente por 4 minutos. 6 - Adicionar 5 μ L da solução de parada. 7 - Visualizar a mudança da coloração.

Fonte: Adaptada da bula do *Mycoplasma Detection Kit-QuickTest* – Biotool.

4.6.3.1 Tratamento das células tumorais

A MeLn foi semeada na densidade de $2,0 \times 10^6$ células/poço, em duas placas de 24 poços e sua adesão ocorreu ao longo de 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Em seguida, o poço utilizado como controle continha apenas as células com o meio de cultura RPMI 1640; nos demais poços foram adicionados 1 µL de:

- a) dimetilsulfoxido (DMSO - células sem tratamento);
- b) ivermectina (0,5 µM; 1,25 µM; 2,5 µM);
- c) doxorubicina (0,5 µM);
- d) ivermectina 0,5 µM + doxorubicina 0,5 µM;
- e) ivermectina 1,25 µM + doxorubicina 0,5 µM;
- f) ivermectina 2,5 µM + doxorubicina 0,5 µM.

As células foram incubadas por 48 horas. Ao término desse período, foi avaliada a citotoxicidade e expressão gênica.

4.6.4 Análise da citotoxicidade e da expressão gênica

4.6.4.1 Citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade, ao término da incubação, o sobrenadante (meio de cultura) foi coletado em tubo de citometria, as células foram lavadas com 1 mL de tampão PBS 1X. Para facilitar a leitura de morte celular, foi adicionado 100 µL de tripsina 0,25% para que ocorresse a desfragmentação das células de esferas para células individuais. A ação da tripsina foi interrompida com 250 µL de PBS contendo 10% de soro fetal bovino. As quadruplicatas foram recolhidas e adicionadas em um único tubo de citometria de fluxo. Em seguida, foram centrifugadas por 5 minutos a 160 g; o sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspensionado em 250 µl de uma solução contendo PBS e iodeto de Propídio (PI). Após 15 minutos de incubação, procedeu-se a leitura das células em citômetro de fluxo (FACSCalibur) e para análise de dados foi utilizado o software FlowJo X.

4.6.4.2 Expressão gênica

Foi avaliada a expressão gênica de β -catenina, mTOR e genes de referência SDHA por qRT-PCR (*quantitative real time polymerase chain reaction*), segundo os protocolos e sondas descritos pelo fabricante (ThermoFisher), empregando-se as células provenientes do ensaio de citotoxicidade.

4.6.4.2.1 Técnica de extração de RNA

Para a análise de expressão gênica, os mRNAs foram obtidos como se segue. Os lisados previamente coletados foram submetidos a extração de RNA total pelo *kit* RNeasy Mini (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Para a eliminação de DNA genômico, foi adicionado ao processo DNase I do *kit* RNase-Free DNase Set (Qiagen), também conforme indicações do fabricante. A concentração de RNA total foi quantificada por meio da leitura no equipamento Qubit® (Thermo Fisher Scientific, EUA). A qualidade do RNA foi verificada pela razão de DO 260 nm/280 nm.

4.6.4.2.2 Técnica de síntese de DNA

Para síntese de cDNA com a enzima Superscript II (Life Technologies), foi utilizado 500 ng de RNA total de cada amostra. Foi adicionado 1 μ L de Oligo dT a 50 μ M (Life Technologies), 1 μ L de dNTP Mix a 10 mM (Life Technologies) e completado para 13 μ L com água tratada com dicarbonato de dietila (*diethylpyrocarbonate* - DEPC). A solução foi incubada em termociclador por 5 minutos a 65°C e 1 minuto a 4°C. Após a incubação, foram adicionadas 40 unidades de RNaseOUT™ (*Recombinant Ribonuclease Inhibitor* - Life Technologies), 200 unidades de Superscript® II (*Reverse Transcriptase* - Life Technologies), 1 μ L de ditioneitol (dithiothreitol - DTT) a 0,1 M (Life Technologies) e 4 μ L de 5X *first-strand buffer* (Life Technologies). A amostra foi amplificada seguindo o seguinte ciclo: 60 minutos a 50°C, 15 minutos a 70°C e 1 minuto a 4°C. As amostras foram armazenadas a -20°C até a realização dos experimentos.

4.6.4.2.3 Quantificação do nível de expressão de mTOR e β -catenina

A quantificação dos níveis de mTOR e β -catenina em MeLn foram realizadas por meio de qRT-PCR e monitoradas pela sonda Taqman com *primers* específicos (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Identificação das sondas Taqman para os genes de mTOR e β -catenina.

Símbolo do gene	Nome do gene	ID do ensaio	Amplicon
MTOR	Alvo mecanicista da rapamicina (serina / treonina quinase)	Cf02703811_m1	120
CTNNB1	Catenina (proteína associada à caderina), beta 1, 88kDa	Cf00991816_m1	72

Para a reação de PCR, utilizou-se como *template* uma quantidade fixa de cDNA das amostras. O reagente utilizado para a reação foi o TaqMan® Master Mix (Thermo Fisher Scientific, EUA) e o volume final de reação foi estabelecido como 20 μ L. Os cDNAs foram utilizados em duplicata. A quantificação foi realizada em sistema de qRT-PCR (Step One Plus® - Applied Biosystems, Foster City, EUA).

O método utilizado para análise da expressão gênica através do ensaio de qRT-PCR foi o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct) (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Para tal, foi calculado inicialmente o Δ CT de cada amostra, subtraindo-se os valores de CT (*threshold cycle* ou limiar do ciclo) do gene endógeno (SDHA) dos valores de CT do gene alvo pela seguinte fórmula:

$$\Delta\text{CT} = \text{Ct (gene alvo)} - \text{Ct (gene endógeno SDHA)}$$

Após determinação do Δ CT da amostra, foi escolhido como amostra normalizadora para todas as análises o cDNA das células tratadas apenas com o DMSO (controle negativo). Para o cálculo do $\Delta\Delta$ CT utilizou-se a fórmula (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001):

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT (amostra)} - \Delta\text{CT (amostra normalizadora DMSO)}$$

Uma vez determinado o $\Delta\Delta CT$, a expressão relativa da amostra alvo em relação a amostra DMSO foi obtida para ambos os genes por meio do uso da seguinte fórmula:

$$\text{Expressão Relativa} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

4.6.5 Análise dos dados

Foi feita uma descrição qualitativa dos resultados obtidos e foi utilizado o *software* GraphPad Prism versão 6 para *Windows* para elaboração das figuras.

4.7 RESULTADOS

São apresentados, a seguir, os resultados obtidos.

4.7.1 Caracterização das células tumorais

A observação da morfologia celular foi feita sob microscopia óptica, revelando, inicialmente, um grupo celular heterogêneo (células aderentes e não aderentes) com a presença de células esféricas, ovais e predomínio de células com aspecto estrelado, citoplasma amplo e espraído, com crescimento e replicação moderados. Ao longo do cultivo celular, por volta da passagem 5, as células começaram a formar uma monocamada aderente, como pode ser observado na Figura 4.4.

Figura 4.4. Fotomicrografia do cultivo primário das células tumorais. Notam-se células que variam do formato fusiforme ao predomínio de células estreladas com citoplasma amplo (40x).

Sob a análise microscópica da lâmina histológica corada por hematoxilina – eosina (HE), notam-se células com anisocitose, anisocariose, com núcleos paracentrais em eventuais células e alteração da relação núcleo/citoplasma (Figura 4.5).

Figura 4.5 Fotomicrografia de corte histológico de células de melanoma da cavidade oral canina (MeLn) incluídas em agarose 2% (*cell block*), exibindo celularidade moderada, população celular esférica a elípticas, dispostas em bloco, apresentando anisocitose, anisocariose com núcleos paracentrais em eventuais células (seta) e alteração da relação núcleo/citoplasma (cabeça de seta). HE (40x).

A análise imunoistoquímica foi realizada para confirmar a histogênese das células tumorais. Para tanto, o material emblocado foi enviado ao Laboratório Vetmol - Diagnóstico em Patologia Molecular Veterinária e Pesquisa (Botucatu-SP) para realização da técnica de imunoistoquímica utilizando os anticorpos primários Melan A e PNL2.

As figuras 4.6 e 4.7 ilustram a imunomarcagem positiva para ambos os marcadores, confirmando a histogênese melanocítica da linhagem tumoral.

Figura 4.6 Fotomicrografia representativa da reação imunoistoquímica para Melan A (seta) de células tumorais provenientes de cultivo primário. Marcação positiva corada em castanho escuro. (40x).

Figura 4.7 Fotomicrografia representativa da reação imunoistoquímica para PNL-2 (seta) de células tumorais provenientes de cultivo primário. Marcação positiva corada em castanho escuro. (40x).

4.7.2 Controle de micoplasma no cultivo

A figura 4.8 mostra o resultado do teste para a detecção de micoplasma em meio de cultura de células de célula MeLn, SKMel, assim como o controle positivo e negativo. Nota-se que ambas as células tumorais apresentaram o mesmo resultado do controle negativo, indicando ausência de micoplasma no meio de cultura.

Figura 4.8 Análise qualitativa para a presença de micoplasma no meio de cultura de células tumorais: controle negativo (c-); melanoma canino primário (MeLn); linhagem de melanoma humano (SKMel – controle de melanoma); e controle positivo (c+).

4.7.3 Citotoxicidade

A figura 4.9 apresenta os resultados do percentual de mortalidade das células de melanoma canino primário (MeLn), avaliada por citometria de fluxo, em triplicata, frente a exposição ao DMSO, ivermectina, doxorrubicina e associação de ambas. Nota-se que houve aumento gradativo da mortalidade celular à medida que se aumenta a concentração de ivermectina (0,5 μ M; 1,0 μ M; 2,5 μ M; 5,0 μ M). O mesmo foi observado com a doxorrubicina, alcançando 67,8% de mortalidade na concentração de 5,0 μ M. Quanto à associação da ivermectina (2,5 μ M) com a doxorrubicina (0,5 μ M), observa-se que a mortalidade das células tumorais foi de 35,0%, sendo que, isoladamente, nessas concentrações a mortalidade foi de 18,3% e de 26,5%, respectivamente.

Figura 4.9 Mortalidade de células melanoma canino primário (MeLn), avaliada por citometria de fluxo, após 48 h da exposição ao DMSO e a diferentes concentrações de ivermectina (IVM), doxorubicina (DOX) e associação de ambas.

4.7.4 Expressão gênica

A figura 4.10 ilustra o resultado da expressão gênica de mTOR e β -catenina em células de melanoma canino primário (MeLn) após a exposição ao DMSO, ivermectina, doxorubicina e associação de ambas.

Nota-se que a menor concentração de ivermectina (0,5 μ M) reduziu a expressão de mTOR, enquanto a maior dose (2,5 μ M) teve efeito oposto, em relação ao DMSO. A doxorubicina (0,5 μ M) aumentou a expressão de mTOR em relação ao DMSO, porém a sua associação com ivermectina não promoveu nenhuma alteração.

Quanto a expressão de β -catenina, a figura 4.10 mostra que ambas as concentrações de ivermectina não alteraram a sua expressão, em relação ao DMSO. A doxorubicina foi capaz de aumentar a expressão de β -catenina em relação ao DMSO, porém, quando associada a ivermectina, observa-se redução da expressão gênica em relação aos demais grupos.

Figura 4.10 Expressão gênica de mTOR e β -catenina em células de melanoma canino primário (MeLn) após 48 h da exposição ao DMSO e a diferentes concentrações de ivermectina (IVM), doxorrubicina (DOX) e associação de ambas.

4.8 DISCUSSÃO

No presente trabalho empregaram-se células extraídas de um linfonodo de cão com diagnóstico de melanoma da cavidade oral. Para a confirmação do melanoma canino, foram utilizados marcadores comumente empregados na clínica veterinária: o anti-MelanA e anti-PNL2 (RAMOS-VARA & MILLER, 2011). Os resultados mostraram-se positivos para ambos os marcadores, confirmando a histogênese melanocítica da linhagem tumoral.

Para a caracterização desse tumor, foi realizado o cultivo primário, sendo constatado taxa de viabilidade superior a 90% durante todo o período de avaliação. No início do cultivo as células apresentavam-se heterogêneas: células aderentes e não aderentes esféricas. As células aderentes tinham um aspecto estrelado, com o citoplasma amplo e espreado, de crescimento e replicação moderada. Esse perfil se deve ao fato de que o melanoma expressa proteínas de matriz extracelular que contribuem para o desenvolvimento de alterações celulares, levando a um padrão histológico e imunoistoquímico diferenciado quando comparado a células normais (RAMOS-VARA & MILLER, 2011).

Foi também realizado, no presente trabalho, o controle de micoplasma no cultivo, sendo constada a ausência desse microrganismo.

Para avaliação da atividade antitumoral da ivermectina, doxorrubicina e associação de ambas em células de melanoma canino, empregou-se a técnica de citometria de fluxo para identificar a taxa de morte celular. Os resultados mostraram elevação da taxa de mortalidade celular à medida que se aumenta a concentração de ivermectina. O mesmo foi observado com a doxorrubicina. Quanto à associação da ivermectina (2,5 μM) com a doxorrubicina (0,5 μM), observou-se que a mortalidade das células tumorais foi de 35,0%, sendo que, isoladamente, nessas concentrações a mortalidade foi de 18,3% e de 26,5%, respectivamente.

Esses achados foram semelhantes aos encontrados por Furusawa e colaboradores (2000). Esses autores observaram que a ivermectina potencializou o efeito apoptótico da doxorrubicina em células resistentes P388/DOX, porém não demonstrou o mesmo efeito em células sensíveis. Este efeito foi correlacionado com a clivagem acentuada de DNA em fragmentos nucleossômicos em células que expressam a proteína de membrana *multi drug resistance* (MDR). Além disso, a ivermectina aumentou o influxo de doxorrubicina e o potencial da membrana plasmática nas células MDR com superexpressão de glicoproteína-P (gp-P). Esses resultados indicam que o efeito da ivermectina é restrito às células MDR e pode refletir uma interação específica entre ivermectina e a gp-P por outros componentes da membrana de células MDR alteradas.

A atuação da ivermectina na MDR foi também apontada por Juarez et al. (2018), bem como em outros alvos intracelulares, como mostrado na figura 4.2. Nesse sentido, a fim de avaliar a ação antitumoral da ivermectina isolada ou em associação com a doxorrubicina em células de cultivo primário de melanoma canino, optou-se estudar a via Akt/mTOR e Wnt, indiretamente, através da expressão de β -catenina e mTOR por qRT-PCR.

Foi observado que a menor concentração de ivermectina (0,5 μM) reduziu a expressão de mTOR, enquanto a maior concentração (2,5 μM) teve efeito oposto em relação ao DMSO. O fenômeno bifásico da ivermectina pode estar relacionado com a hormese (MATTSON, 2008), ou seja, a concentração menor reduziu a expressão de mTOR, enquanto a concentração maior teve efeito oposto. Mattson (2008) relatou a existência de vias de sinalização celular e mecanismos moleculares que mediam respostas horméticas através de enzimas cinases e desacetilases, e fatores de transcrição como Nrf-2 e NF- κ B. Como resultado, as células aumentam sua produção de proteínas citoprotetoras

e restauradoras, incluindo fatores de crescimento, e enzimas antioxidantes. Uma melhor compreensão dos mecanismos horméticos, em nível celular e molecular, pode contribuir para novas abordagens terapêuticas.

Juarez et al (2018) relataram que a ivermectina reduz a fosforilação de AKT/mTOR, diminuindo a biogênese mitocondrial e, conseqüentemente, reduz a produção de ATP. Ela também promove a poli-ubiquitinação da quinase PAK1, que a direciona para a degradação no proteassoma. A PAK1 defeituosa, por sua vez, inibe a via Akt/mTor. Ao mesmo tempo, a ivermectina estimula a expressão de Beclin1 e Atg5, ambas relacionadas com a indução da autofagia, e reduz a função do regulador negativo de apoptose Bcl-2. Juntos geram autofagia e apoptose.

A doxorrubicina (0,5 μ M), por sua vez, aumentou a expressão de mTOR em relação ao DMSO, porém a sua associação com ivermectina não promoveu nenhuma alteração.

Quanto à expressão de β -catenina em células do melanoma canino, os resultados mostraram que ambas as concentrações de ivermectina não alteraram a sua expressão, em relação ao DMSO. A doxorrubicina foi capaz de aumentar a expressão de β -catenina, em relação ao DMSO, porém, observou-se redução na expressão de β -catenina em células expostas à associação ivermectina (2,5 μ M) e doxorrubicina (0,5 μ M).

O aumento da expressão de β -catenina em células tumorais pode estar relacionado com pior prognóstico, maior diferenciação fenotípica e progressão da doença (MUNEMITSU et al., 1995; VALKENBURG et al., 2011; PÓPULO et al., 2012; KOVACS et al., 2016). Após a ativação da via Wnt ou mutações genéticas dos componentes Wnt, a β -catenina se acumula no citoplasma e, em seguida, transloca para o núcleo, ligando-se ao *lymphoid enhancer-binding factor 1* (LEF1)/*T-cell fator 4* (TCF4) e a alguns outros co-reguladores para promover a transcrição de genes-alvo, como Jun, c-Myc e CyclinD-1 (SHANG et al., 2017).

Assim, pode-se sugerir que a ivermectina reprimiu AXIN2, LGR5 e ASCL2, os quais são reguladores positivos de Wnt-TCF, além de estimular o repressor da sinalização do Wnt, o FILIP1L, conforme sugerido por JUAREZ et al. (2018) – figura 4.2 (via 6). Na ausência de ligantes Wnt, a β -catenina é mantida em um nível baixo por meio do sistema ubiquitina proteassoma (SUP), no qual a β -Catenina é recrutada para um complexo de destruição que contém *adenomatous polyposis coli* (APC) e AXIN, que facilita a fosforilação de β -catenina por caseína kinase 1 (CK1) e, em seguida, glicogênio sintase quinase 3 β

(GSK3 β) (SHANG et al., 2017). Isso leva à ubiquitinação e degradação proteassômica da β -catenina.

Os efeitos da ivermectina na via Wtm, reduzindo a expressão de β -catenina, indicam a possibilidade do seu emprego em terapias antitumorais, nas quais se observa o aumento da expressão dessa proteína. Neste contexto, poderia ser proposto o reposicionamento da ivermectina, agora com uma nova indicação terapêutica para um medicamento já aprovado pelos órgãos competentes, ganhando relevância, pois diminui tempo e custos na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos.

Contudo, deve ser ressaltado que, embora estudos *in vitro* propusessem que o aumento da translocação nuclear e a atividade da β -catenina promovem a proliferação e invasão do melanoma (WIDLUND et al., 2002; SINBERG et al., 2011), a progressão do tumor é impulsionada por outras alterações moleculares, conferindo uma vantagem proliferativa e promovendo fenótipos invasivos e metastáticos. A β -catenina acumula-se dentro do núcleo ou no citoplasma da maioria dos casos de cânceres, como melanoma, carcinoma colorretal, câncer de mama, carcinoma hepático e leucemia (KOBAYASHI et al., 2000; KHRAMTSOV et al., 2010; DAMSKY et al., 2011; TAO et al., 2014; GEKAS et al., 2016). No entanto, apesar do melanoma ter sido um dos primeiros tumores associados à desregulação da β -catenina (RUBINFELD et al., 1997), seu papel nessa doença ainda não está completamente elucidado. As principais discrepâncias surgiram da comparação entre os estudos realizados com o modelo de cultura de células de melanoma e investigações baseadas em análises imunoistoquímicas em biópsia de pele (KOVACS et al., 2016).

A via WNT/ β -catenina pode ser um alvo molecular promissor para o desenvolvimento de novos medicamentos, inclusive para aumentar a eficácia da imunoterapia (VORONKOV & KRAUSS, 2013). Os mecanismos imunes da ativação da β -catenina, incluindo a inibição da expressão do gene de quimiocinas e citocinas pelas células tumorais, oferecem a oportunidade de desenvolver agentes com atividades mais restritas que aumentam, predominantemente, a imunidade, mantendo outras funções celulares essenciais (SPRANGER et al., 2015; LI et al., 2019).

A atividade da β -catenina está sob controle de vários processos altamente regulados, incluindo interações ligante-receptor, estabilidade da β -catenina, translocação nuclear e atividade transcricional da β -catenina (SHANG et al., 2017). A sinalização de β -catenina é amplamente utilizada por muitos tipos de células e, portanto, efeitos fora do

tumor no alvo limitam o potencial de terapêuticas que visam essa proteína. Futuros estudos destinados a determinar os mecanismos que controlam esses processos são necessários para identificar alvos que poderiam ser direcionados por intervenções farmacológicas.

4.9 CONCLUSÃO

Observou-se que a ivermectina possui um efeito citotóxico para a célula tumoral de melanoma canino e também interfere na expressão de mTOR e β -catenina. Novos estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nos efeitos citotóxicos e antitumorais da ivermectina, a fim de caracterizar o seu reposicionamento com uma nova indicação terapêutica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ABBASI FA, ALGHAMDI EA, BAGHDADI MA, ALAMOUDI AJ, EL-HALAWANY AM, EL-BASSOSSY HM, ASEERI AH, AL-ABD AM. Gingerol Synergizes the Cytotoxic Effects of Doxorubicin against Liver Cancer Cells and Protects from Its Vascular Toxicity. **Molecules**. 2016 Jul 8;21(7):886.

ARCHER CR, KOOMOA DL, MITSUNAGA EM, CLERC J, SHIMIZU M, KAISER M, SCHELLENBERG B, DUDLER R, BACHMANN AS. Syrbactin class proteasome inhibitor-induced apoptosis and autophagy occurs in association with p53 accumulation and Akt/PKB activation in neuroblastoma. **Biochemical pharmacology**. 2010; 80:170–178.

AROZARENA I, WELLBROCK C. Targeting invasive properties of melanoma cells. **The FEBS Journal**. 284 (2017) 2148–2162.

AQUILANO K, ROTILIO G, CIRIOLO MR. Proteasome activation and nNOS down-regulation in neuroblastoma cells expressing a Cu, Zn superoxide dismutase mutant involved in familial ALS. **Journal of neurochemistry**. 2003; 85:1324–1335.

ASHLEY N, POULTON J. Mitochondrial DNA is a direct target of anticancer anthracycline drugs. **Biochem Biophys Res Commun**. 2009; 378: 431–447.

BACHMANN IM. Importance of P-Cadherin, -Catenin, and Wnt5a/Frizzled for progression of melanocytic tumors and prognosis in cutaneous melanoma. **Clin Cancer Res**. 2005; 11: 8606–8614.

BENOIT YD, GUEZGUEZ B, BIYD AL, BHATIA M. Molecular pathways: epigenetic modulation of Wnt-glycogen synthase kinase-3 to target human cancer stem cells. **Clin Cancer Res**. 2014;20:5372–5378.

BIECHELE TL, KULIKAUSKAS RM, TORONI R A, LUCERO OM, SWIFT RD, JAMES RG et al. Wnt/ β -catenin signaling and AXIN1 regulate apoptosis triggered by inhibition of the mutant kinase BRAFV600E in human melanoma. **Sci Signal**. 2012; 5: ra3.

BUCHHOLZ TA et al. Global gene expression changes during neoadjuvant chemotherapy for human breast cancer. **Cancer J** 2002; 8: 461–468.

CAPUTI FF, CARBONI L, MAZZA D, CANDELETTI S, ROMUALDI P. Cocaine and ethanol target 26S proteasome activity and gene expression in neuroblastoma cells. **Drug Alcohol Depend.** 2016; 161:265–275.

CARREIRA S, GOODALL J, AKSAN I, LA ROCCA SA, GALIBERT MD, DENAT L, LARUE L, GODING CR. Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. **Nature.** 2005;433:764–769.

CARREIRA S, GOODALL J, DENAT L, RODRIGUEZ M, NUCIFORO P, HOEK KS, TESTORI A, LARUE L, GODING CR. Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. **Genes Dev.** 2006;20:3426–3439.

CARVALHO C. et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. **Curr Med Chem** 2009; 16: 3267–3285.

CELEBI J.T., SHENDRIK I., SILVERS D.N., PEACOCKE M. Identification of PTEN mutations in metastatic melanoma specimens. **J. Med. Genet.** 2000;37:653–657.

CHEUNG M., SHARMA A., MADHUNAPANTULA S.V., ROBERTSON G.P. Akt3 and mutant ^{V600E}B-Raf cooperate to promote early melanoma development. **Cancer Res.** 2008;68:3429–3439.

CHIEN AJ, MOON RT. WNTS and WNT receptors as therapeutic tools and targets in human disease processes. **Front Biosci.** 2007;12:448–457.

CHIEN AJ, MOORE EC, LONSDORF AS, KULIKAUSKAS RM, ROTHBERG BG, BERGER AJ et al. Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. **Proc Natl Acad Sci USA** 2009; 106: 1193–1198.

CHIEN AJ, HAYDU LE, BIECHELE TL, KULIKAUSKAS RM, RIZOS H, KEFFORD RF et al. Targeted BRAF inhibition impacts survival in melanoma patients with high levels of Wnt/β-catenin signaling. **PLoS One.** 2014; 9: e94748.

CLOUGHESY T.F., YOSHIMOTO K., NGHIEMPHU P., BROWN K., DANG J., ZHU S., HSUEH T., CHEN Y., WANG W., YOUNGKIN D., et al. Antitumor activity of rapamycin in a Phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma. **PLoS Med.** 2008;5.

DAI D.L., MARTINKA M., LI G. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: A clinicopathologic study of 292 cases. **J. Clin. Oncol.** 2005;23:1473–1482.

DAHL C., GULDBERG P. The genome and epigenome of malignant melanoma. **Apmis.** 2007;115:1161–1176.

DAKENG S, DUANGMANO S, JIRATCHARIYAKUL W, PRATYA Y, BO O, GLER P. Inhibition of WNT Signaling by Cucurbitacin B in Breast Cancer Cells: Reduction of WNT Associated Proteins and Reduced Translocation of Galectin-3-Mediated β -Catenin to the Nucleus. **Journal of Cellular Biochemistry.** 2012; 113: 49–60.

DAMSKY WE, CURLEY DP, SANTHANAKRISHNAN M, ROSENBAUM LE, PLATT JT, GOULD ROTHBERG BE et al. β -catenin signaling controls metastasis in Braf-activated Pten-deficient melanomas. **Cancer Cell.** 2011; 20: 741–754.

DANESI R et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. **Clin Pharmacokinet.** 2002; 41: 431–444.

DAVIES M.A., STEMKE-HALE K., TELLEZ C., CALDERONE T.L., DENG W., PRIETO V.G., LAZAR A.J., GERSHENWALD J.E., MILLS G.B. A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. **Br. J. Cancer.** 2008;99:1265–1268.

DELMAS V, BEERMANN F, MARTINOZZI S, CARREIRA S, ACKERMANN J, KUMASAKA M et al. Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. **Genes Dev** 2007; 21: 2923–2935.

DHOMEN N, REIS-FILHO JS, DA ROCHA DIAS S, HAYWARD R, SAVAGE K, DELMAS V et al. Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. **Cancer Cell** 2009; 15: 294–303.

DIHLMANN S, DOEBERITZ M.K. Wnt/ β -catenin pathway as a molecular target for future anti-cancer therapeutics. **International Journal of Cancer.** 2005; 113: 515-524.

DO Y et al. Compound K induces apoptosis via CAMKIV/AMPK pathways in HT-29 colon cancer cells. **J Agric FoodChem.** 2009; 57: 10573–10578.

DOU Q, CHEN HN, WANG K, YUAN K, LEI Y, LI K, LAN J, CHEN Y, HUANG Z, XIE N, ZHANG L, XIANG R, NICE EC, WEI Y, HUANG C. Ivermectin Induces Cytostatic Autophagy by Blocking the PAK1/Akt Axis in Breast Cancer. **Cancer Res.** 2016 Aug 1;76(15):4457-69.

DRAGANOV D., et al. Modulation of P2X4/P2X7/pannexin-1 sensitivity to extracellular ATP via ivermectin induces a non-apoptotic and inflammatory form of cancer cell death. **Scientific reports** 5 (2015).

EICHHOFF OM, ZIPSER MC, XU M, WEERARATNA AT, MIHIC D, DUMMER R, HOEK KS. The immunohistochemistry of invasive and proliferative phenotype switching in melanoma: a case report. **Melanoma Res.** 2010;4:349–355.

EICHHOFF OM, WEERARATNA A, ZIPSER MC, DENAT L, WIDMER DS, XU M, KRIEGL L, KIRCHNER T, LAURE L, DUMMER R, HOEK KS. Differential LEF1 and TCF4 expression is involved in melanoma cell phenotype switching. **Pigment Cell Melanoma Res.** 2011;24:631–642.

FURUSAWA, S., SHIBATA, H., NISHIMURA, H., NEMOTO, S., TAKAYANAGI, M., TAKAYANAGI, Y. and SASAKI, K.-I. (2000), Potentiation of Doxorubicin-Induced Apoptosis of Resistant Mouse Leukaemia Cells by Ivermectin. **Pharmacy and Pharmacology Communications**, 6: 129-134.

GEKAS C, D'ALTRI T, ALIGUE R, GONZALEZ J, ESPINOSA L, BIGAS A. β -Catenin is required for T-cell leukemia initiation and MYC transcription downstream of Notch1. **Leukemia.** 2016; 30: 2002-2010.

GEWIRTZ DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochem Pharmacol** 1999; 57: 727–741.

GIGLI M et al. Correlation between growth inhibition and intranuclear doxorubicin and 4'-deoxy-4'-iododoxorubicin quantitated in living K562 cells by microspectrofluorimetry. **Cancer Res** 1989; 49: 560–564.

GILES R.H., VAN E.S.J.H., CLEVERS H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. **Biochim Biophys Acta.** 2003 Jun 5;1653(1):1-24.

GONZÁLEZ CANGA A, SAHAGÚN PRIETO AM, JOSÉ DIEZ LIÉBANA M, MARTÍNEZ NF, VEGA MS, VIEITEZ JJG. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. **Vet J**. 2009; 179(1):25-37.

GOULART C.R., MATTEI T.A., RAMINA R. Cerebral Melanoma Metastases: A Critical Review on Diagnostic Methods and Therapeutic Options. 2011. **ISRN Surg**. 2011;2011:276908.

GROB JJ, LONG GV, SCHADENDORF D, FLAHERTY K. Disease kinetics for decision-making in advanced melanoma: a call for scenario-driven strategy trials. **Lancet Oncol**. 2015;16 (13):e522-e526.

GUAN S, ZHAO Y, LU J, YU Y, SUN W, MAO X, CHEN Z, XU X, PAN J, SUN S, YANG J. Second-generation proteasome inhibitor carfilzomib sensitizes neuroblastoma cells to doxorubicin-induced apoptosis. **Oncotarget**. 2016 Nov 15;7(46):75914-75925.

HAMMERLE B, YANEZ Y, PALANCA S, CANETE A, BURKS DJ, CASTEL V, FONT DE MORA J. Targeting neuroblastoma stem cells with retinoic acid and proteasome inhibitor. **PloS one**. 2013; 8:e76761.

HASHIMOTO H, MESSERLI SM, SUDO T, MARUTA H. Ivermectin inactivates the kinase PAK1 and blocks the PAK1-dependent growth of human ovarian cancer and NF2 tumor cell lines. **Drug Discov Ther**. 2009;3 (6):243-246.

HILMER SN et al. The hepatic pharma-cokinetics of doxorubicin and liposo-mal doxorubicin. **Drug Metab Dispos**. 2004; 32: 794–799.

HOLLAND JD, KLAUS A, GARRATT AN, BIRCHMEIER W. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. **Curr Opin Cell Biol**. 2013;25:254–64.

HUSEBY NE, RAVURI C, MOENS U. The proteasome inhibitor lactacystin enhances GSH synthesis capacity by increased expression of antioxidant components in an Nrf2-independent, but p38 MAPK-dependent manner in rat colorectal carcinoma cells. **Free radical research**. 2016; 50:1–13.

INFANTE JR, MENDELSON DS, BURRIS HA, 3RD, BENDELL JC, TOLCHER AW, GORDON MS, GILLENWATER HH, ARASTU-KAPUR S, WONG HL, PAPADOPOULOS

KP. A first-in-human dose-escalation study of the oral proteasome inhibitor oprozomib in patients with advanced solid tumors. **Investigational new drugs**. 2016; 34:216–224.

JIANG J, MOHAN N, ENDO Y, SHEN Y, WU WJ. Type IIB DNA topoisomerase is downregulated by trastuzumab and doxorubicin to synergize cardiotoxicity. **Oncotarget**. 2017 Dec 21;9(5):6095-6108.

JIANG L, WANG P, SUN YJ, WU YJ. Ivermectin reverses the drug resistance in cancer cells through EGFR/ERK/Akt/NF- κ B pathway. **J Exp Clin Cancer Res**. 2019 Jun 18;38(1):265.

JONES SL, CICHOWSKI K. Many roads lead to oncogene-induced senescence. **Oncogene** 2008; 27: 2801–2809.

JUAN J, MURAGUCHI T, IEZZA G, SEARS RC, MCMAHON M. Diminished WNT -4 β -catenin-4c MYC signaling is a barrier for malignant progression of BRAFV600E-induced lung tumors. **Genes Dev**. 2014; 28: 561–575.

JUAREZ M, SCHCOLNIK-CABRERA A, DUEÑAS-GONZALEZ A. The multitargeted drug ivermectin: from an antiparasitic agent to a repositioned cancer drug. **American journal of cancer research**. 2018. Feb 1;8 (2):317-331.

KAGESHITA T, HAMBY CV, ISHIHARA T, MATSUMOTO K, SAIDA T, ONO T. Loss of β -catenin expression associated with disease progression in malignant melanoma. **Br J Dermatol**. 2001; 145: 210–216.

KAHN M. Can we safely target the Wnt pathway? **Nat Rev Drug Discov**. 2014. 13:513–532.

KHRAMTSOV AI, KHRAMTSOVA GF, TRETIAKOVA M, HUO D, OLOPADE OI, GOSS KH. Wnt/ β -catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome. **Am J Pathol**. 2010; 176: 2911-2920.

KIM YM et al. Involvement of AMPK signaling cascade in capsaicin-induced apoptosis of HT-29 colon cancer cells. **Ann N Y Acad Sci**. 2007; 1095: 496–503.

KIRCHER D, SILVIS M, CHO J, HOLMEN S. Melanoma brain metastasis: mechanisms, models, and medicine. **Int J Mol Sci**. 2016; 17:9.

KLAUS A, BIRCHMEIER W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. **Nat Rev Cancer**. 2008 May;8(5):387-98.

KOBAYASHI M, HONMA T, MATSUDA Y, SUZUKI Y, NARISAWA R, AJIOKA Y, ASAKURA H. Nuclear translocation of betacatenin in colorectal cancer. **Br J Cancer**. 2000; 82: 1689-1693.

KOVACS D., MIGLIANO E., MUSCARDIN L., SILIPO V., CATRICALÀ C., PICARDO M., BELLEI B. The role of Wnt/ β -catenin signaling pathway in melanoma epithelial-to-mesenchymal-like switching: evidences from patients-derived cell lines. **Oncotarget**. 2016 Jul 12;7(28):43295-43314.

KYRATZI E., PAVLAKI M., KONTOSTAVLAKI D., RIDEOUT H.J., STEFANIS L. Differential effects of Parkin and its mutants on protein aggregation, the ubiquitin-proteasome system, and neuronal cell death in human neuroblastoma cells. **J Neurochem**. 2007 Aug;102(4):1292-303. Epub 2007 May 1.

LAPLANTE M., SABATINI D.M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**. 2012 April 13; 149(2): 274–293.

LI X, XIANG Y, LI F, YIN C, LI B AND KE X. (2019) WNT/ β -Catenin Signaling Pathway Regulating T Cell-Inflammation in the Tumor Microenvironment. **Front. Immunol**. 10:2293.

LIM X, NUSSE R. Wnt signaling in skin development, homeostasis, and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**; e-pub ahead of print 1 February 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. **Method. Methods** 25, 402–408, 2001.

LUSTIG B; BEHRENS J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. **J Cancer Res Clin Oncol**. 2003. Apr;129 (4):199-221.

MACDONALD BT, TAMAI K, HE X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. **Dev Cell**. 2009 Jul;17 (1):9-26.

MATTSON M.P., Hormesis defined. **Science Direct**. Volume 7, Issue, Janeiro de 2008.

MASTRANGELO E, PEZZULLO M, DE BURGHGRAEVE T, et al. Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug. **J Antimicrob Chemother.** 2012; 67(8):1884-1894.

MELOTTI, ALICE, et al. "The river blindness drug Ivermectin and related macrocyclic lactones inhibit WNT-TCF pathway responses in human cancer." **EMBO molecular medicine** (2014): e201404084.

MEIER F., SCHITTEK B., BUSCH S., GARBE C., SMALLEY K., SATYAMOORTHY K., LI G., HERLYN M. The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. **Front. Biosci.** 2005;10:2986–3001.

MINOTTI G et al. Anthracyclines:molecular advances and pharmaco-logic developments in antitumor activ-ity and cardiotoxicity. **Pharmacol Rev.** 2004; 56: 185–229.

MOON RT, KOHN AD, DE FERRARI GV, KAYKAS A. Wnt and b-catenin signalling: diseases and therapies. **Nat Rev Genet.** 2004;5: 691–701.

MORIN PJ, SPARKS AB, KORINEK V, BARKER N, CLEVERS H, VOGELSTEIN B, KINZLER KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. **Science.** 1997;275:1787–1790.

MUNEMITSU S, ALBERT I, SOUZA B, RUBINFELD B, POLAKIS P. Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** Mar 1995, 92 (7) 3046-3050.

MUSTAFA EH, MAHMOUD HT, AL-HUDHUD MY, ABDALLA MY, AHMAD IM, YASIN SR, ELKARMI AZ, TAHTAMOUNI. LH2-deoxy-D-Glucose Synergizes with Doxorubicin or L-Buthionine Sulfoximine to Reduce Adhesion and Migration of Breast Cancer Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 2015; 16(8): 3213-3222.

NESHAT M.S., MELLINGHOFF I.K., TRAN C., STILES B., THOMAS G., PETERSEN R., FROST P., GIBBONS J.J., WU H., SAWYERS C.L. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 2001;98:10314–10319.

ONO S, OYAMA T, LAM S, CHONG K, FOSHAG LJ, HOON DSB. A direct plasma assay of circulating microRNA-210 of hypoxia can identify early systemic metastasis recurrence in melanoma patients. **Oncotarget.** 2015;6 (9):7053-7064.

PANNEERSELVAM M., BREDEHORST R., C.W. Vogel. Resistance of human melanoma cells against the cytotoxic and complement-enhancing activities of doxorubicin. **Cancer Res.**, 47 (17) (1987), pp. 4601-4607.

PANCHUK RR, SKOROKHYD NR, KOZAK YS, LEHKA LV, MOISEENOK AG, STOIKA RS. Tissue-protective activity of selenomethionine and D-panthetine in B16 melanoma-bearing mice under doxorubicin treatment is not connected with their ROS scavenging potential. **Croat Med J.** 2017 Apr 14;58(2):171-184.

PAWLIKOWSKI JS, MCBRYAN T, VAN TUYN J, DROTAR ME, HEWITT RN, MAIER AB et al. Wnt signaling potentiates nevogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA** 2013; 110: 16009–16014.

PETERS JM, FRANKE WW, KLEINSCHMIDT JA. Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. **The Journal of biological chemistry.** 1994; 269:7709–7718.

POLAKIS P. Wnt signaling in cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** 2012 May 1;4(5). pii: a008052.

POPULO H., SOARES P., FAUSTINO A., ROCHA A.S., SILVA P., AZEVEDO F., mTOR pathway activation in cutaneous melanoma is associated with poorer prognosis characteristics. **Pigment Cell Melanoma Res.** 2011;24:254–257.

POPULO H, LOPES JM, SOARES P. The mTOR signalling pathway in human cancer. **Int J Mol Sci.** 2012;13(2):1886–1918.

PROVOST E, RIMM DL. Controversies at the cytoplasmic face of the cadherin-based adhesion complex. **Curr Opin Cell Biol.** 1999;11:567–572.

RAMOS-VARA, J. A.; MILLER, M. A. Immunohistochemical identification of canine melanocytic neoplasms with antibodies to melanocytic antigen PNL2 and tyrosinase: Comparison with melan A. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 2, p. 443–450, 2011.

REIFENBERGER J., WOLTER M., BOSTROM J., BUSCHGES R., SCHULTE K.W., MEGAHED M., RUZICKA T., REIFENBERGER G. Allelic losses on chromosome arm 10q and mutation of the PTEN (MMAC1) tumour suppressor gene in primary and metastatic malignant melanomas. **Virchows Arch.** 2000;436:487–493.

ROBINSON DR, ZYLSTRA CR, WILLIAMS BO. Wnt signaling and prostate cancer. **Curr Drug Targets**. 2008; 9:571–580.

ROESCH A. Tumor heterogeneity and plasticity as elusive drivers for resistance to MAPK pathway inhibition in melanoma. **Oncogene**. 2015;34 (23):2951-2957.

RUBINFELD B, ROBBINS P, EL-GAMIL M, ALBERT I, PORFIRI E, POLAKIS P. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. **Science**. 1997;5307:1790–1792.

SABEH F, SHIMIZU-HIROTA R & WEISS SJ (2009). Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. **J Cell Biol** 185 ,11–19.

SAHAI E & MARSHALL CJ (2003). Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. **Nat Cell Biol** 5, 711–719.

SANZ-MORENO V & MARSHALL CJ (2009). Rho-GTPase signaling drives melanoma cell plasticity. **Cell Cycle**. 8,1484–1487.

SCHADENDORF D, HODI FS, ROBERT C, et al. Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. **J Clin Oncol**. 2015; 33(17):1889-1894.

SCHEPSKY A, BRUSER K, GUNNARSSON GJ, GOODALL J, HALLSSON JH, GODING CR, STEINGRIMSSON E, HECHT A. The microphthalmia-associated transcription factor Mitf interacts with beta-catenin to determine target gene expression. **Mol Cell Biol**. 2006;26:8914–8927.

SETHI S, KHERAJ R, SETHI N, WADHWA V. Images of the month: a case of strongyloidiasis presenting as a colonic mass. **Am J Gastroenterol**. 2014;109 (1):20-20.

SHANG S, HUA F, HU Z.W. The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. **Oncotarget**. 2017 May 16;8(20):33972-33989.

SHARMA A, SEN JM. Molecular basis for the tissue specificity of b-catenin oncogenesis. **Oncogene**. 2013;32:1901–1909.

SHAW RJ et al. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2004; 101: 3329–3335.

SINNBERG T, MENZEL M, EWERTH D, SAUER B, SCHWARZ M, SCHALLER M, GARBE C, SCHITTEK B. Beta-catenin signalling increases during melanoma progression and promotes tumor cell survival and chemoresistance. **PLoS One**. 2011;6:e23429.

SMYLIE M.G., et al. A phase II, open label, monotherapy study of liposomal doxorubicin in patients with metastatic malignant melanoma Invest. **New Drugs**, 25 (2) (2007), pp. 155-159.

SPRANGER S, BAO R., GAJEWSKI TF. Melanoma-intrinsic β -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. **Nature**. (2015) 523: 231–5.

STAHL J.M., SHARMA A., CHEUNG M., ZIMMERMAN M., CHENG J.Q., BOSENBERG M.W., KESTER M., SANDIRASEGARANE L., ROBERTSON G.P. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. **Cancer Res**. 2004;64:7002–7010.

STOLZ W, SCHMOECKEL C, LANDTHALER M, BRAUN-FALCO O. Association of early malignant melanoma with nevocytic nevi. **Cancer**. 1989; 63: 550–555.

TACAR O., SRIAMORNSAK P., DASS C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2012; 65, pp. 157–170.

TAKIGAWA Y, BROWN AM. Wnt signaling in liver cancer. **Curr Drug Targets**. 2008; 9:1013–1024.

TAO J, CALVISI DF, RANGANATHAN S, CIGLIANO A, ZHOU L, SINGH S, JIANG L, FAN B, TERRACCIANO L, ARMEANU-EBINGER S, RIBBACK S, DOMBROWSKI F, EVERT M, ET AL. Activation of beta-catenin and Yap1 in human hepatoblastoma and induction of hepatocarcinogenesis in mice. **Gastroenterology**. 2014; 147: 690-701.

TSAO H., GOEL V., WU H., YANG G., HALUSKA F.G. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. **J. Invest. Dermatol.** 2004;122:337–341.

TSAO H., ZHANG X., FOWLKES K., HALUSKA F.G. Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines. **Cancer Res.** 2000;60:1800–1804.

UENO N, GREENE ND. Planar cell polarity genes and neural tube closure. **Birth Defect Res Part C Embryo Today.** 2003; 63:318–324.

VALKENBURG KC, GRAVEEL CR, ZYLSTRA-DIEGEL CR, ZHONG Z, WILLIAMS BO. Wnt/beta-catenin Signaling in Normal and Cancer Stem Cells. **Cancers** (Basel). 2011; 3: 2050-2079.

VOROBIOF D.A., et al. Phase II study of pegylated liposomal doxorubicin in patients with metastatic malignant melanoma failing standard chemotherapy treatment. **Melanoma Res.**, 13 (2) (2003), pp. 201-203.

VORONKOV A, KRAUSS S. Wnt/beta-Catenin Signaling and Small Molecule Inhibitors. **Curr Pharma Des.** (2013) 19: 634–64.

WANG Z, ARIS VM, OGBURN KD, SOTEROPOULOS P, FIGUEIREDO-PEREIRA ME. Prostaglandin J2 alters pro-survival and pro-death gene expression patterns and 26 S proteasome assembly in human neuroblastoma cells. **J Biol Chem.** 2006; 281:21377–21386.

WANG K, GAO W, DOU Q, CHEN H, LI Q, NICE EC, HUANG C. Ivermectin induces PAK1-mediated cytostatic autophagy in breast cancer. **Autophagy.** 2016. Dec; 12(12):2498-2499.

WANG L, SHI C, WRIGHT FA, GUO D, WANG X, WANG D, WOJCIKIEWICZ RJH, LUO J. Multifunctional Telodendrimer Nanocarriers Restore Synergy of Bortezomib and Doxorubicin in Ovarian Cancer Treatment. **Cancer Res.** 2017 Jun 15;77(12):3293-3305.

WEBSTER MR, WEERARATNA AT. A Wnt-er migration: the confusing role of β -catenin in melanoma metastasis. **Sci Signal.** 2013; 6: pe11.

WIDLUND HR, HORSTMANN MA, PRICE ER, CUI J, LESSNICK SL, WU M, HE X, FISHER DE. b-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. **J Cell Biol.** 2002;158:1079–1087.

WU H., GOEL V., HALUSKA F.G. PTEN signaling pathways in melanoma. **Oncogene.** 2003;22:3113–3122.

YU K., TORAL-BARZA L., DISCAFANI C., ZHANG W.G., SKOTNICKI J., FROST P., GIBBONS J.J. mTOR, a novel target in breast cancer: The effect of CCI-779, an mTOR inhibitor, in preclinical models of breast cancer. **Endocr. Relat. Cancer.** 2001;8:249–258.

ZHU P, ZHU X, WU J, HE L, LU T, WANG Y, et al. IL-13 secreted by ILC2s promotes the self-renewal of intestinal stem cells through circular RNA circPan3. **Nat Immunol.** (2019) 20: 183–94.

ZUNINO F et al. Interaction of dauno-mycin and its derivatives with DNA. **Biochim Biophys Acta** 1972; 277: 489–498.16.

5 CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo mostrou que:

- a administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) em ratos e em coelhos não foi capaz de alterar os níveis séricos de testosterona;
- as células H295R são mais adequadas do que as células Y1 para avaliação *in vitro* da produção de testosterona e que a ivermectina não altera a produção desse hormônio em células H295R.
- a ivermectina possui um efeito citotóxico para a célula tumoral de melanoma canino e interfere na expressão de mTOR e de β -catenina. Novos estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nos efeitos citotóxicos e antitumorais da ivermectina, a fim de caracterizar o seu reposicionamento com uma nova indicação terapêutica.