NATALIA MOREIRA

**Efeitos da exposição à ivermectina em ratos e coelhos:
aspectos reprodutivos**

São Paulo
2018

NATALIA MOREIRA

**Efeitos da exposição à ivermectina em ratos e coelhos: aspectos
reprodutivos**

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
2018

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da exposição à ivermectina em ratos e coelhos: aspectos reprodutivos", protocolada sob o CEUA nº 1892040315, sob a responsabilidade de **Helenice de Souza Spinosa e equipe; Natalia Moreira; Maria Martha Bernardi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 13/05/2015.

We certify that the proposal "Effects of ivermectin exposure in rats and rabbits: reproductive aspects", utilizing 150 Heterogenics rats (120 males and 30 females), protocol number CEUA 1892040315, under the responsibility of **Helenice de Souza Spinosa and team; Natalia Moreira; Maria Martha Bernardi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/13/2015.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/ 201** a **08/ 201** Área: **0**

Origem:	Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP		
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos
Linhagem:	Wistar	idade:	a
		Peso:	a
N:	120		
Origem:	Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP		
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Fêmeas
Linhagem:	Wistar	idade:	a
		Peso:	a
N:	30		

Resumo: A ivermectina é uma lactona macrocíclica utilizada para o tratamento de parasitoses na espécie humana e amplamente empregada em medicina veterinária como endectocida. Em mamíferos, diversas evidências indicam que as lactonas macrocíclicas interagem com canais de cloro mediados pelo ácido gama-aminobutírico (GABA). Sabe-se que o sistema GABAérgico está envolvido com a manifestação do comportamento sexual. Estudos anteriores 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. Recentemente, em nosso mestrado observamos que a administração de ivermectina em ratos reduziu os níveis de testosterona sem interferir na motivação sexual e na ereção peniana de machos, enquanto em fêmeas prejudicou o comportamento sexual. Assim, 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 projeto propõe-se avaliar em ratos a função testicular, a morfologia e a motilidade do sêmen e, em fêmeas, o ciclo estral fisiológico, bem como em ambos os gêneros, o perfil hormonal e a expressão de receptores de hormônios sexuais após 24, 72, 120 e 168 horas da sua administração.

Local do experimento:

São Paulo, 21 de junho de 2018

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

Autor: MOREIRA, Natalia

Título: Efeitos da exposição à ivermectina em ratos e coelhos: aspectos reprodutivos

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: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, Vera Lúcia e Vivaldo, com todo meu amor e gratidão, por tudo que fazem por mim. Desejo ser merecedora do esforço e amor dedicado por vocês.

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 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), bolsa de doutorado - Processo nº 2015/03131-4.

AGRADECIMENTOS

Sou grata aos vários nomes aqui citados. Esta tese é resultado de um trabalho em equipe, com a participação de muitas mãos, muitas mentes e muitos corações (haja emoção!). Agradeço a cada um que colaborou direta ou indiretamente com este trabalho!

Agradeço infinitamente aos meus pais, Vera Lúcia e Vivaldo, por estarem sempre ao meu lado em qualquer decisão da minha vida, sempre me apoiando e incentivando. Obrigada por contribuírem tanto à minha vida e serem extremamente fundamentais. Muito obrigada pai pelo seu incentivo, apoio, carinho, amor, conselhos e por estar ao meu lado sempre! Muito obrigada mãe por ser minha grande amiga, meu exemplo de altruísmo, meu porto seguro e por sempre ter uma palavra de apoio e um conselho! Aos meus pais, muito obrigado e saibam que vocês são os amores da minha vida. Amo muito vocês!

Ao meu namorado, Ciro, agradeço o seu apoio, incentivo, motivação e companheirismo, não somente na parte profissional, mas pelo conjunto dos anos que estamos juntos. Amo você!

Muito obrigada aos meus avôs e avós, Alysson (in memoriam) e Neyde (in memoriam), Ernesto (in memoriam) e Anna (in memoriam), amo vocês para sempre! Agradeço imensamente as minhas avós por cuidarem de mim durante minha infância, por me ensinaram a ter respeito, responsabilidade e comprometimento. Vocês são exemplo de grandes mulheres para mim!

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior) e a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo financiamento do projeto de pesquisa (Processo nº 2015/03131-4).

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

A minha orientadora Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa pelo seu profissionalismo, sua competência, sua generosidade, pelo seu empenho em prol do crescimento de cada pós-

graduando que por ela é orientado, pelo seu cuidado na execução de tudo que vamos realizar e por me ensinar que cada detalhe é fundamental!

A Profa. Dra. Maria Martha Bernardi pelo seu profissionalismo, seus ensinamentos, sua competência, dedicação e generosidade.

Agradeço aos colaboradores do CEPTOX (VPT/Campus Pirassununga), Dr. André Tadeu Gotardo e Paulo César F. Raspantini pela contribuição e ensinamento com a coleta de sêmen, e pelo apoio no desenvolvimento experimental da pesquisa com os coelhos. A Leonila Ester R. Raspantini pelos ensinamentos, apoio e contribuição na análise hematológica e bioquímica. E ao Estevão Belloni e Adilson Baladore pelos cuidados com os animais.

Agradeço aos colaboradores do Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES) “Prof. Dr. Aníbal de Sant’Anna Moretti (VRA/CBRA-Campus Pirassununga)”, Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade pela generosidade, contribuição e apoio no desenvolvimento experimental da pesquisa com os coelhos. E a sua aluna de doutorado, Mariana Andrade Torres, pelo enorme auxílio na execução da análise espermática de coelhos.

Agradeço aos colaboradores do Laboratório de Neurobiologia e Metabolismo Energético da Universidade Presbiteriana Mackenzie, Profa. Dra. Miriam Oliveira Ribeiro e de suas alunas de doutorado Fernanda Lorena e Bruna Pascarelli, pelo auxílio e ensinamentos na execução da expressão de enzimas da via esteroidogênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT).

Agradeço aos colaboradores do Laboratório de Pesquisas Multidisciplinares da Universidade Paulista, Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan, pelo auxílio e contribuição marcação de receptor andrógeno nos testículos por imunohistoquímica.

A Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção, ao Prof. Dr. Marcilio Nichi e a técnica Camilla Mota Mendes, todos do Departamento de Reprodução Animal (VRA), agradeço o gentil fornecimento dos meios de cultura e a ajuda na coleta de espermatozoides de ratos.

A Dra. Esther Lopes Ricci e ao Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira pelas contribuições no exame de qualificação do doutorado.

Agradeço as secretárias do departamento e da pós-graduação, Adriana e Milena, toda atenção e cuidado prestados!

Agradeço a cada um dos funcionários do biotério do VPT, Luciana, Mauro e Nelsinho pela atenção e cuidado prestado aos animais.

Agradeço aos técnicos do Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia por toda atenção e ajuda prestado. Ao Herculano, obrigado pelo cuidado e auxílio na execução da minha pesquisa! Ao Vagner, companheiro de pesquisa com ivermectina, obrigada pelas ideias e conhecimento compartilhado! A Nicolle, pelo auxílio, pelos vários ensinamentos e pela colaboração na dosagem de estradiol. Além do suporte na pesquisa, agradeço vocês pelas conversas de bancada!

Agradeço ao Pedro Enrique Navas-Suárez, pelo ensinamento e auxílio na realização das lâminas de histologia e na análise das marcações dos receptores andrógenos nos testículos por imunohistoquímica.

Aos amigos do VPT, Cássia, Daniel, Dennis, Esther, Everton, Fabi, Fukushima, Gabi Keller, Gabi Oliveira, Gabriel, Jéssica, Joost, Julia, Juliana Fonseca, Juliana Sanches, Luana, Marianna, Michael, Paulinha, Pedro, Sara, Sayuri, Thaísa, Thiago, Victor e Wanderley, agradeço as conversas (científicas ou não), os almoços no bandeirão, a ajuda nos estudos e nos experimentos, as trocas nas referatas, as motivações e principalmente pelos momentos alegres no *happy hour* e nos churrascos (Confra!).

Agradeço as grandes amigas que a vida acadêmica me presenteou. Gabi Keller, Paulinha e Thaísa obrigada pela amizade, cumplicidade e companheirismo. Amo vocês!

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

A todos os amigos que fiz ao longo da minha vida, agradeço o apoio, as alegrias, os sorrisos e os abraços compartilhados!

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

(Albert Einstein)

“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes”

(Isaac Newton)

RESUMO

MOREIRA, N. **Efeitos da exposição à ivermectina em ratos e coelhos: aspectos reprodutivos.** [Effects of ivermectin exposure in rats and rabbits: reproductive parameters]. 2018. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A ivermectina é uma lactona macrocíclica usada como agente antiparasitário de amplo espectro de ação contra nematelmintos e artrópodes. É empregada, principalmente, no controle de infecções parasitárias de animais domésticos, e recentemente vem sendo utilizada em seres humanos para o tratamento da oncocercose, escabiose e pediculose. Em mamíferos, diversas evidências indicam que as lactonas macrocíclicas interagem com canais de cloro mediados pelo ácido gama-aminobutírico (GABA). Sabe-se que o sistema GABAérgico está envolvido com a manifestação do comportamento sexual e estudo prévios mostraram que a ivermectina prejudicou o comportamento sexual de ratos machos e fêmeas. Assim, considerando que a ivermectina pode interferir na esfera sexual, este trabalho avaliou os efeitos temporais da exposição à ivermectina (0,2 e 1,0 mg/kg, por via subcutânea) em parâmetros reprodutivos e hormonais de ratos e de coelhos. Em ratos avaliou-se peso relativo dos órgãos de machos e fêmeas, o índice gonadossomático de machos, os achados histopatológicos; o receptor de andrógeno em testículos por imunohistoquímica; concentração sérica de testosterona, FSH e LH; expressão relativa de enzimas da via esteroidogênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT); ciclo estral, desempenho reprodutivo e concentração de estradiol nas fezes de ratas. Em coelhos machos avaliou-se a concentração, a motilidade e a morfologia de espermatozoides; a integridade das membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides; o peso relativo dos órgãos e o índice gonadossomático; a concentração sérica de testosterona; os achados histopatológicos; e a análise hematológica e bioquímica sérica. Os resultados mostraram que a administração de ivermectina em ratos: não alterou o peso relativo dos testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal; não modificou o índice gonadossomático; promoveu prejuízo nas células germinativas do epitélio seminífero dos testículos, achado sugestivo de prejuízo na espermatogênese e na espermiogênese de machos; não interferiu na expressão de receptor

andrógeno dos testículos, bem como a expressão relativa de enzimas da via esteroidogênica; não interferiu na concentração sérica de testosterona e FSH, porém diminuiu a concentração sérica de LH; não interferiu no ciclo estral, no desempenho reprodutivo e na concentração de estradiol nas fezes de ratas. Os resultados de ratos e ratas foram discutidos considerando a interferência da ivermectina na neurotransmissão GABAérgica, bem como na via de produção dos hormônios hipofisários-gonadais. Em coelhos, não foram observadas alterações nos parâmetros da fertilidade de machos, avaliada pela concentração, motilidade e morfologia de espermatozoides, e nem no potencial de fertilização, avaliado pela integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial dos espermatozoides; não houve interferência nos níveis séricos de testosterona, na bioquímica sérica e em parâmetros do hemograma. Esses resultados em conjunto são indicativos de que a ivermectina causa poucos efeitos prejudiciais em aspectos reprodutivos de ratos e coelhos.

Palavras-chave: Avermectina, Características espermáticas, Ciclo estral, Desempenho Reprodutivo, Hormônios sexuais.

ABSTRACT

MOREIRA, N. **Effects of ivermectin exposure in rats and rabbits: reproductive parameters.** [Efeitos da exposição à ivermectina em ratos e coelhos: aspectos reprodutivos]. 2018. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Ivermectin is a macrocyclic lactone used as a broad spectrum antiparasitic agent against nematelmints and arthropods. It is mainly used in the control of parasitic infections of domestic animals, and recently has been used in humans to treat onchocerciasis, scabies and pediculosis. In mammals, various evidences indicate that macrocyclic lactones interact with gamma-aminobutyric acid (GABA)-mediated chloride channels. It is known that the GABAergic system is involved in the manifestation of sexual behavior and previous studies have shown that ivermectin impaired sexual behavior in male and female rats. Thus, considering ivermectin may interfere with the sexual sphere, this study evaluated the temporal effects of exposure to ivermectin (0.2 and 1.0 mg/kg, administered subcutaneously) on reproductive and hormonal parameters of rats and rabbits. In rats it was evaluated organ weights of male and female, the gonadosomatic index of males, histopathological findings; the immunohistochemical of the androgen receptor in the testes; serum LH, FSH and testosterone concentrations; relative expression of steroidogenic pathway enzymes by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR); estrous cycle, reproductive performance and estradiol concentration in the feces of female rats. In male rabbits it was evaluated the spermatozoa concentration, motility and morphology; the integrity of the membranes plasmatic, acrosomal and mitochondrial of the spermatozoa; the organ weights, the gonadosomatic index; serum testosterone concentrations; histopathological findings; and hematological and serum biochemical analysis. The results showed that ivermectin administration in rats: not alter the relative weights of the testes, epididymis, prostate and seminal vesicle; not modified gonadosomatic index; caused damage in the germinal cells of the seminiferous epithelium of the testes, finding suggestive of impairment in spermatogenesis and male spermiogenesis; did not interfere with the androgen receptor expression of the testes, as well as the relative expression of enzymes of the steroidogenic pathway; did not interfere in

the serum testosterone and FSH concentrations, but it decreased the serum LH concentration; did not interfere in the estrous cycle, reproductive performance and estradiol concentration in the feces of female rats. The results of male and female rats were discussed considering the interference of ivermectin in GABAergic neurotransmission as well as in the production pathway of pituitary-gonadal hormones. In rabbits, no changes were observed in male fertility parameters evaluated by spermatozoa concentration, motility and morphology, nor the potential for fertilization evaluated by the integrity of the membranes plasmatic, acrosomal and mitochondrial of the spermatozoa; there was no interference in serum testosterone concentration, serum biochemistry and hematological parameters. These results together are indicative that ivermectin causes few adverse effects on reproductive aspects of rats and rabbits.

Keywords: Avermectin, Estrous Cycle, Reproductive performance, Sexual hormones, Sperm characteristics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 - Estrutura química da ivermectina.....27
- Figura 2.1 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) no peso relativo dos órgãos (fígado, testículo, próstata, epidídimo, adrenal e vesícula seminal) e índice gonadosomático de ratos. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 7-10 animais por grupo. * $p < 0,05$, comparado com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett).....54
- Figura 2.2 - Micrografia de luz da secção dos túbulos seminíferos de testículos de ratos do grupo controle e do grupo 1,0 mg/kg de ivermectina às 24 horas. Grupo controle: (A) aspecto normal, onde S = célula de Sertoli, G = espermatogônia, C = espermatócito, EP = espermátides redondas e EZ = espermatozoides; (B) tecido intersticial com células de Leydig no aspecto normal (seta). Grupo 1,0 mg/kg às 24 horas: (C) onde 1 e 3 = epitélio desorganizado, 2 = descamação do epitélio; (D) seta indica descamação das células germinativas no lúmen tubular; (E) seta indica epitélio desorganizado; (F) seta indica baixa frequência de células da linhagem germinativa com aumento do diâmetro do lúmen; (G) seta indica células germinativas no lúmen tubular com núcleos picnóticos. HE (x 400).....56
- Figura 2.3 - Micrografia de luz da secção dos túbulos seminíferos de testículos de ratos do grupo 1,0 mg/kg de ivermectina às 48 horas. Em (A), 1 = descamação de células germinativas no lúmen tubular e 2 = epitélio desorganizado; (B) seta indica vacuolização do epitélio tubular; (C) 1 e 2 = epitélio desorganizado; (D) seta indica células germinativas com núcleos picnóticos no lúmen tubular. HE (x 400).....57
- Figura 2.4 - Micrografia de luz da secção dos túbulos seminíferos de testículos de ratos do grupo 1,0 mg/kg de ivermectina às 72 horas. Em (A), 1 = aumento do diâmetro do lúmen e 2 = epitélio desorganizado; (B) seta indica aumento do diâmetro do lúmen e vacuolização do epitélio tubular; (C) seta indica células germinativas com núcleos picnóticos no lúmen tubular; (D) 1 = células germinativas com núcleos picnóticos e 2 = descamação de células germinativas no lúmen tubular; (E) 1 = epitélio desorganizado e 2 = células germinativas no lúmen tubular. HE (x 400)..58

- Figura 2.5 - Efeitos da administração de ivermectina (1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) na expressão relativa do receptor andrógeno nos testículos por imunohistoquímica. Os dados são expressos como mediana e respectivos percentis e limites. N = 5 animais por grupo. $p > 0,05$, comparado com o grupo controle (Teste *t* de Student, seguido pelo teste *post hoc* de Mann Whitney).....59
- Figura 2.6 - Micrografia de luz da secção dos túbulos seminíferos, com marcação positiva (marrom) dos receptores andrógenos, de testículos de ratos do grupo controle (A) e do grupo 1,0 mg/kg de ivermectina às 24 horas (B). DAB (x400).....60
- Figura 2.7 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) na concentração sérica de testosterona, FHS e LH de ratos. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 7-10 animais por grupo. ** $p < 0,01$, comparado com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett).....61
- Figura 2.8 - Avaliação da expressão relativa de enzimas da via esteroidogênica por PCR-RT após a administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle). Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 5 animais por grupo. $p > 0,05$, em comparação com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).....62
- Figura 2.9 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) em cada fase do ciclo estral de ratas 15 dias antes e 15 dias após a administração. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 7-10 animais por grupo. $p > 0,05$, em comparação com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).....63
- Figura 2.10 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) na concentração de estradiol nas fezes de ratas do 14° ao 18° dia do ciclo estral. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 5 animais por grupo. $p > 0,05$, em comparação com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).....64
- Figura 2.11 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) no peso relativo dos órgãos (fígado, adrenais, útero e ovários) de ratas. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 7-10 animais

por grupo. $p > 0,05$ em comparação com o grupo controle (ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).....65

Figura 2.12 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) no ganho de peso, consumo de água e de ração semanais de ratas. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 6 animais por grupo. DG 0 = dia gestacional 0. * $p < 0,05$, $p > 0,05$, em comparação com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).....67

Figura 3.1 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) na concentração espermática de coelhos 1, 2, 3, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após a administração. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 6 animais por grupo. $p > 0,05$, em comparação com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).....95

Figura 3.2 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) na motilidade espermática de coelhos 1, 2, 3, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após a administração. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 6 animais por grupo. $p > 0,05$, em comparação com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).....96

Figura 3.3 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução de controle (1,0 ml/kg - grupo controle) na avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides de coelhos 1, 2, 3, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após a administração. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 6 animais por grupo. $p > 0,05$, em comparação com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).....97

Figura 3.4 - Efeitos da administração ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) na concentração sérica de testosterona de coelhos 1, 2, 7, 15, 30 e 60 dias após a administração. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 6 animais por grupo. $p > 0,05$, em comparação com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).....101

LISTA DE TABELAS

- Tabela 2.1 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) nos diferentes parâmetros do desempenho reprodutivo de ratas. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = animais/grupo. $p > 0,05$, em comparação com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).....68
- Tabela 3.1 - Classificação dos animais segundo nota obtida em índice pré-estabelecido para a distribuição dos animais nos grupos de tratamento com ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle). N = número de animais por grupo.....94
- Tabela 3.2 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução de controle (1,0 ml/kg - grupo controle) na morfologia espermática em coelhos 1, 2, 3, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após a administração. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = número de animais por grupo. $p > 0,05$, em comparação com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).....98
- Tabela 3.3 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) no ganho de peso corporal, no peso relativo dos órgãos (fígado, próstata, testículos, epidídimo, adrenal e vesícula seminal) e no índice gonadossomático (IGS) de coelhos. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = número de animais por grupo. ** $p < 0,01$, comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett).....100
- Tabela 3.4 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) nos parâmetros hematológicos do sangue de coelhos 1, 2 e 7 dias após a administração. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = número de animais por grupo. $p > 0,05$, comparado com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett).....102
- Tabela 3.5 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) nos parâmetros bioquímicos do sangue de coelhos 1, 2 e 7 dias após a administração. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N =

número de animais por grupo. $p > 0,05$, comparado com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett).....103

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
2. CAPÍTULO 1 - Estudo dos efeitos da administração de ivermectina em ratos machos e fêmeas: parâmetros reprodutivos e hormonais	38
2.1 INTRODUÇÃO	38
2.2 OBJETIVO GERAL	41
2.2.1 Objetivos específicos	41
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	42
2.3.1 Animais	42
2.3.2 Drogas	42
2.3.3. Procedimentos	43
2.3.3.1 Avaliação do peso relativo dos órgãos e do índice gonadossomático de ratos	43
2.3.3.2 Análise histopatológica de fígado, adrenais, testículos e epidídimos de ratos	44
2.3.3.3 Análise da expressão de receptor andrógeno nos testículos por imunohistoquímica	44
2.3.3.4 Avaliação da concentração sérica de testosterona, FSH e LH	45
2.3.3.5 Avaliação da expressão relativa de enzimas da via esteroidogênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT)	45
2.3.3.6 Avaliação do ciclo estral e da concentração de estradiol nas fezes	47
2.3.3.7 Avaliação do peso relativo de órgãos de ratas e estudo histopatológico	48
2.3.3.8 Avaliação de alguns parâmetros do desempenho reprodutivo de ratas	49
2.3.4 Delineamento experimental	50
2.3.4.1 Efeitos da exposição à ivermectina em ratos: aspectos reprodutivos e hormonais de machos	50
2.3.4.2 Efeitos da exposição à ivermectina em ratas: aspectos reprodutivos e hormonais	51
2.3.5 Análise estatística	52
2.4 RESULTADOS	53
2.4.1 Avaliação do peso relativo dos órgãos e do índice gonadossomático de ratos	53
2.4.2 Análise histopatológica do fígado, adrenais, testículos e epidídimos de ratos	55
2.4.3 Análise da expressão de receptor andrógeno nos testículos por imunohistoquímica	59

2.4.4 Avaliação da concentração sérica de testosterona, FSH e LH.....	61
2.4.5 Avaliação da expressão relativa de enzimas da via esteroidogênica por PCR-RT ..	62
2.4.6 Avaliação do ciclo estral e da concentração de estradiol nas fezes	63
2.4.7 Avaliação do peso relativo de órgãos e estudo histológico de ratas.....	64
2.4.8 Avaliação de alguns parâmetros do desempenho reprodutivo de ratas	66
2.4 DISCUSSÃO	69
2.5 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	74
3. CAPÍTULO 2: Efeitos temporais da administração de ivermectina nos parâmetros reprodutivos e nos níveis séricos de testosterona em coelhos.....	80
3.1 INTRODUÇÃO	80
3.2 OBJETIVO GERAL	84
3.2.1 Objetivos específicos	84
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	85
3.3.1 Animais	85
3.3.2 Droga e tratamento	85
3.3.3 Procedimentos.....	86
3.3.3.1 Distribuição nos grupos de tratamento.....	86
3.3.3.2 Colheita de sêmen.....	87
3.3.3.3 Análise seminal	87
<i>Avaliação da concentração de espermatozoides</i>	<i>87</i>
<i>Análise computadorizada da motilidade de espermatozoides</i>	<i>87</i>
<i>Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial da membrana mitocondrial.....</i>	<i>88</i>
<i>Análise das características morfológicas dos espermatozoides.....</i>	<i>89</i>
3.3.3.4 Avaliação do ganho de peso, do peso relativo dos órgãos, do índice gonadossomático e estudo histopatológico.....	89
3.3.3.5 Avaliação da concentração sérica de testosterona	90
3.3.3.6 Análise hematológica e bioquímica do sangue	90
3.3.4 Delineamento experimental.....	91
3.3.5 Análise estatística.....	92
3.4 RESULTADOS.....	93
3.4.1 Distribuição nos grupos de tratamento.....	93
<i>Avaliação da concentração de espermatozoides</i>	<i>95</i>

<i>Análise computadorizada da motilidade de espermatozoides</i>	96
<i>Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial da membrana mitocondrial</i>	97
<i>Análise das características morfológicas dos espermatozoides</i>	98
3.4.3 Avaliação do ganho de peso, do peso relativo dos órgãos, do índice gonadosomático e estudo histopatológico	99
3.4.4 Avaliação da concentração sérica de testosterona	100
3.4.5 Análise hematológica e bioquímica do sangue	101
3.5 DISCUSSÃO	104
REFERÊNCIAS	108
4. CONCLUSÃO GERAL	115
ANEXOS	117
ANEXO 1 - Representação esquemática do eixo Hipotálamo-Hipófise-Testículo.	117
ANEXO 2 - Representação esquemática das etapas de produção de progesterona, estradiol e testosterona na via esteroidogênica.	118
ANEXO 3 - Resultados parciais publicados na <i>Research in Veterinary Science</i>	119

1. Introdução Geral

1. INTRODUÇÃO GERAL

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

O grande avanço no controle dos ecto- e endoparasitas foi a descoberta, na década de 1970, das lactonas macrocíclicas, como as avermectinas e milbemicinas (CAMPBELL, 1989; GERENUTTI; SPINOSA, 1997). Esses agentes vêm sendo extensivamente comercializados mundialmente e amplamente utilizados na medicina veterinária para o tratamento de verminoses gastrointestinais e para o controle de ectoparasitos, bem como na agricultura para o controle de infestações por pragas (VERCRUYSSSE; REW, 2002). Na medicina humana são usados para o tratamento de filariose e, principalmente, no tratamento e controle da oncocercose, pediculose e escabiose (JACKSON, 1989; OMURA, 2008).

Inicialmente, foram descobertas as milbemicinas, em 1973, por pesquisadores da Sankyo, os quais apontaram o seu efeito acaricida e inseticida (MEROLA; EUBIG, 2012). Etimologicamente, a palavra milbemicina se refere aos seus efeitos: *milb* (ácaro) + *myc* (fungo) + *in* (substância química com finalidade farmacológica) (SHOOP et al., 1993).

Posteriormente, em 1974, amostras de solo foram coletadas pelo Instituto Kitasho, em Kawana no Japão, e avaliadas pelo microbiologista Satoshi Omura. Essas amostras foram isoladas, cultivadas e enviadas ao seu colaborador, William Campbell, pesquisador da indústria farmacêutica Merck Sharp-Dohme (MSD). A colaboração entre esses pesquisadores resultou na descoberta das avermectinas. As avermectinas apresentam bioatividade potente contra insetos, ácaros e nematódeos (LAING; GILLAN; DEVANEY, 2017). Etimologicamente, a palavra avermectina expressa: *a* (ausência) + *verm* (verme) + *ect* (externo) + *in* (substância química com finalidade farmacológica) (BURG et al., 1979;

GERENUTTI; SPINOSA, 1997; OMURA, 2008).

As avermectinas e milbemicinas são obtidas a partir do processo de fermentação dos actinomicetos, do gênero *Streptomyces*. A fermentação natural do actinomiceto *Streptomyces hygroscopicus* leva a obtenção da milbemicina e moxidectina, enquanto a fermentação do *Streptomyces avermitilis* conduz a obtenção da ivermectina, abamectina e doramectina (BURG et al., 1979; LANKAS; MINSKER; ROBERTSON, 1989; GERENUTTI; SPINOSA, 1997).

O processo de fermentação do *Streptomyces avermitilis* resulta na produção de oito tipos de avermectinas: A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a, e B2b. Os compostos A possuem um radical metil (CH_3) ligado ao carbono 5, enquanto o grupo B possui um hidrogênio. Os compostos do tipo 1 possuem dupla ligação entre os carbonos 22 e 23, enquanto o tipo 2 apresenta ligação simples. O grupo “a” apresenta um radical butil (C_4H_9) ligado ao carbono 25 e o grupo “b” um radical isopropil (C_3H_7). Este processo de fermentação resulta na produção de quantidades maiores dos seguintes tipos A2a, B1a, B1b e B2a (GERENUTTI; SPINOSA, 1997; OMURA, 2008; LAING; GILLAN; DEVANEY, 2017).

A ivermectina (Figura 1) é um derivado semi-sintético constituído por uma mistura de 80% de 22, 23 diidroavermectina B1a e 20% de 22, 23 diidroavermectina B1b, e foi o primeiro agente desse grupo comercialmente disponível em medicina veterinária e humana (GEARY, 2005; OMURA, 2008; KHOJA et al., 2018). Posteriormente, vieram abamectina, doramectina, eprinomectina e selamectina, cada uma com propriedades distintas e relevantes para o controle de ecto- e endoparasitos (GEARY, 2005; SARTOR; SANTARÉM, 2017).

A ivermectina foi introduzida no mercado global de saúde animal, pela MSD, em 1981 e em dois anos tornou-se um fármaco de sucesso e líder de mercado, tornando-se rapidamente o agente antiparasitário de maior espectro de ação e de maior sucesso já produzido (OMURA, 2008), apresentando superioridade sobre os anti-helmínticos existentes, como o benzimidazol, levamisol e pirantel (LAING; GILLAN; DEVANEY, 2017; KHOJA et al., 2018). Em 1985, a ivermectina foi inserida como antiparasitário no tratamento de doenças humanas, a partir do esforço global iniciado pelas Nações Unidas para tratar doenças tropicais, que constituíam um grande problema de saúde pública em várias áreas endêmicas da África (CRUMP; OMURA, 2011; KHOJA et al., 2018) e América do Sul (GEARY, 2005). Assim, desde o início da sua

comercialização, até os dias de hoje, a ivermectina é considerado um medicamento revolucionário, devido ao seu perfil farmacológico (KHOJA et al., 2018).

Figura 1.1 - Estrutura química da ivermectina

Fonte: (MOREIRA, 2014).

A ivermectina mostrou-se ativa contra endo- e ectoparasita, e foi comercializada como o primeiro endectocida. É eficaz em doses baixas e pode ser facilmente usada por via oral, tópica e parenteral e, além disso, tem um modo de ação único, ou seja, não há problemas de resistência cruzada com outros compostos existentes (OMURA, 2008; LAING; GILLAN; DEVANEY, 2017).

A ivermectina é um endectocida aprovado para uso em ruminantes, suínos, equinos e cães. As doses preconizadas, por via subcutânea (SC), são de 0,2 mg/kg para ruminantes e 0,3 mg/kg para suínos; para equinos, a dose é de 0,2 mg/kg por via oral (VO); em cães é empregada em associação com outros antiparasitários (DELAYTE et al., 2006; SINDICATO

NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA A SAÚDE ANIMAL, 2017).

Atualmente, existem vários produtos veterinários registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a base de ivermectina, na forma de soluções injetáveis, soluções tópicas, preparações orais (pasta e pó *premix*), além de associações com outros princípios ativos; são 76 produtos registrados para bovinos, 10 para caprinos, 21 para ovinos e 26 para equinos (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA A SAÚDE ANIMAL, 2017). Há também especialidades farmacêuticas para uso na espécie humana, sendo o medicamento de referência a Revectina® (DEF, 2015).

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

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

As avermectinas são fármacos utilizados extensivamente em animais de produção (corte e leiteiro). O período de carência da ivermectina para o abate, em gado de corte, de modo geral, varia entre 18 a 35 dias; em vacas lactantes não é recomendado o seu uso (BRASIL, 2013). Portanto, é de grande importância o monitoramento de resíduos das avermectinas em produtos de origem animal destinados ao consumo humano (CAMPBELL, 1989; PRABHU; WEHNER; TWAY, 1991). Os tecidos alvos definidos pelo MAPA para monitoramento de resíduos são fígado, órgão de biotransformação, e tecido adiposo devido à lipofilicidade das avermectinas (OEHLER; MILLER, 1989; CHIU et al., 1990). O MAPA

determina como limite máximo de resíduo (LMR) das avermectinas para o fígado bovino como sendo de 100 µg/kg, exceto para a eprinomectina que é de 2.000 µg/kg; no leite bovino o LMR é de 10 µg/L para abamectina, ivermectina e moxidectina, sendo de 15 e 20 µg/L, respectivamente, para doramectina e eprinomectina (BRASIL, 2017). O LMR para o fígado de suínos é de 10 µg/kg para abamectina, eprinomectina e moxidectina, enquanto para a ivermectina é de 15 µg/kg, sendo de 100 µg/kg para doramectina. Em fígado de aves o LMR é de 10 µg/kg para todas as avermectinas (BRASIL, 2017).

Em relação à toxicidade, a ivermectina é classificada como uma substância moderadamente tóxica. A sua dose letal 50% (DL50) oral em coelhos é de 406 mg/kg, enquanto a DL50 oral em ratos é de 42,8-52,8 mg/kg. A DL50 intraperitoneal em ratos é de 55 mg/kg, enquanto a DL50 dérmica é de 660 mg/kg (TEMPLE; SMITH, 1994). A toxicidade da ivermectina está associada principalmente ao elevado número de formulações disponíveis no mercado e ao uso indiscriminado na tentativa de obter maior sucesso terapêutico. A toxicidade ocorre quando a ivermectina atinge órgãos suscetíveis em concentrações suficientemente altas e por tempo suficiente para iniciar a manifestação tóxica (DELGADO et al., 2009). É importante enfatizar que os animais jovens, em geral, são mais susceptíveis aos efeitos tóxicos da ivermectina que os adultos, devido a maior permeabilidade da barreira hematoencefálica (SANFORD; REHMTULLA; JOSEPHSON, 1988; GUPTA, 2007).

A ivermectina embora apresente ampla margem de segurança para a maioria dos mamíferos, algumas raças de cães são particularmente sensíveis aos efeitos tóxicos da ivermectina, como, por exemplo, *Collie*, Pastor Australiano, *Old English Sheepdog*, Pastor de *Shetland*, *Afgan Hound* e seus mestiços. Os *Collies* são sensíveis a ivermectina, em doses tão baixas quanto 0,006 mg/kg (SAKATE, 2002; DELGADO et al., 2009; LAING; GILLAN; DEVANEY, 2017). Nessas raças de cães susceptíveis, há uma mutação do gene de resistência a múltiplas drogas, denominado MDR1, que codifica a glicoproteína-P (Gp-P). Esta se encontra localizada em alguns tecidos, inclusive na barreira hematoencefálica, canais hepatobiliares e placenta, agindo como uma proteína de efluxo, levando do interior para fora das células certas drogas. A importância da relação entre a toxicidade das avermectinas com a Gp-P se deve ao fato dela controlar a entrada de avermectinas nos tecidos potencialmente sensíveis. No sistema nervoso central (SNC) a Gp-P é encontrada nos capilares endoteliais, fazendo parte da barreira hematoencefálica. As avermectinas são, então, transportadas pela

Gp-P do interior para fora da célula do endotélio, através do lúmen do vaso capilar, prevenindo, assim, a sua difusão no SNC. Na deficiência ou ausência de Gp-P, as avermectinas são capazes de difundir-se livremente para o SNC, e aí se acumulando (DELGADO et al., 2009). A intoxicação é resultado da alta concentração de ivermectina no SNC, e os sinais clínicos incluem ataxia, desorientação, indiferença ao ambiente, hiperestesia, hiperreflexia, tremores, depressão, debilidade muscular, paralisia, ausência dos reflexos pupilares, cegueira, bradicardia, pulso fraco e, em casos graves, convulsões, coma e morte (SAKATE, 2002).

O mecanismo de ação da ivermectina consiste em causar a imobilização dos nematódeos e ectoparasitos (insetos, carrapatos, ácaros e piolhos), induzindo paralisia tônica da sua musculatura. Esta paralisia é mediada pela potencialização e/ou ativação direta dos canais de cloro sensíveis à ivermectina, controlados pelo glutamato (CULLY et al., 1994; YATES; PORTILLO; WOLSTENHOLME, 2003; GEARY, 2005). Esses canais estão presentes somente nos nervos e células musculares dos invertebrados e, uma vez potencializados, acarretam no aumento da permeabilidade da membrana celular aos íons cloreto, promovendo a hiperpolarização dos nervos ou de células musculares, resultando em paralisia e morte do parasito (SIVILOTTI; NISTRI, 1991; PAREDES; AGMO, 1992). Os canais de cloro dependentes de glutamato não estão presentes nos vertebrados e, portanto, apresentam ampla margem de segurança nesses animais (LAING; GILLAN; DEVANEY, 2017).

A ivermectina pode também interagir com canais de cloro mediados por outros neurotransmissores, como o do ácido gama-aminobutírico (GABA). Nos mamíferos, a ivermectina atua bloqueando a transmissão pós-sináptica de impulsos nervosos mediados por GABA (GUPTA, 2007), que é o principal neurotransmissor inibitório do SNC; atualmente, são conhecidos por três classes de receptores: GABA_A, GABA_B e GABA_C (SIVILOTTI; NISTRI, 1991; BORMANN, 2000). Alguns efeitos adversos observados em cães, equinos e bovinos que receberam ivermectina podem ser devido a efeitos colinérgicos mediados pelo GABA (BASUDDE, 1989; GUPTA, 2007). Além disso, Laing e colaboradores (2017) mostraram que em concentrações micromolares, a ivermectina pode interagir com uma variedade mais ampla de canais controlados por ligantes encontrados em invertebrados e vertebrados, incluindo GABA, glicina, histamina e receptores nicotínicos de acetilcolina.

Em mamíferos, o papel dos receptores GABAérgicos no comportamento sexual foram analisados a partir de estudos farmacológicos (AGMO; PAREDES, 1985). Estes estudos apontaram que a administração intraperitoneal de THIP (4,5,6,7-tetrahydroisoxazol[5,4-c]piridina-3-ol - agonista dos receptores GABA_A) inibiu o comportamento sexual de ratos machos. Por outro lado, a administração de bicuculina (antagonista de receptores GABA_A) não interferiu no comportamento sexual, porém quando administrada concomitante ao THIP produziu efeito inibitório intenso no comportamento sexual. Quando administrado o agonista do receptor GABA_B (baclofen), este promoveu inibição quase completa do comportamento sexual (AGMO; PAREDES, 1985).

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

Demais estudos acerca dos efeitos comportamentais da administração de lactonas macrocíclicas, como ivermectina e moxidectina, também mostraram alta correlação das alterações comportamentais e o sistema GABAérgico. Assim, Rodrigues-Alves et al. (2008) observou que a moxidectina reduziu o comportamento sexual, a ereção peniana e os níveis hipotalâmicos de GABA em ratos machos adultos. Estudos posteriores mostraram que estas reduções envolvem a interferência em receptores GABA_A (RODRIGUES-ALVES et al., 2009). Avaliaram-se também os efeitos da exposição à ivermectina no comportamento sexual de ratos machos adultos; os autores observaram que a ivermectina foi capaz de aumentar a latência para a primeira monta e intromissão, sendo atribuído esse efeito ao prejuízo na fase apetitiva do comportamento sexual de ratos machos (BERNARDI et al., 2011).

Em relação ao comportamento sexual de fêmeas, Moreira et al. (2014) estudaram os efeitos da ivermectina sobre a intensidade de lordose das ratas durante o estro natural e induzido por hormônios. Os achados mostraram que a ivermectina prejudicou o comportamento sexual de ratas, independentemente da modulação do estradiol. Estudo mais

recente mostrou que a ivermectina prejudicou a coordenação motora de ratos, devido a redução dos níveis estriatais de GABA e dopamina, além de reduzir os níveis séricos de testosterona (MOREIRA et al., 2017).

Assim, fica evidente que existem profundas relações entre o sistema GABAérgico central e o comportamento sexual de mamíferos. Nesse sentido, considerando que a ivermectina pode interferir na esfera sexual desses animais, este trabalho avaliou os efeitos temporais da exposição à ivermectina (0,2 e 1,0 mg/kg, por via subcutânea) em parâmetros reprodutivos e hormonais de ratos e de coelhos.

Esse trabalho é apresentado em dois capítulos. O Capítulo 1 refere-se ao estudo dos efeitos da ivermectina em parâmetros reprodutivos e hormonais de ratos machos e fêmeas. O Capítulo 2 aborda os efeitos temporais da ivermectina em parâmetros espermáticos e hormonal de coelhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGMO, A.; PAREDES, R. GABAergic drugs and sexual behaviour in the male rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 112, p. 371-378, 1985.
- BASUDDE, C. D. K. Clinical signs and biochemical changes in calves caused by injection of ivermectin. **Veterinary Quarterly**, v. 11, p. 29-32, 1989.
- BERNANDI, M. M.; KIRSTEN, T. B.; SPINOSA, H. S.; MANZANO, H. Ivermectin impairs sexual behavior in sexually naïve, but not sexually experienced male rats. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 77-81, 2011.
- BITRAN, D.; HULL, E. M. Pharmacological analysis of male rat sexual behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 11, p. 365-389, 1987.
- BORMANN, J. The “ABC” of the GABA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 21, p. 16-19, 2000.
- BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 17**, Brasília, 29 de Maio de 2013.
- BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 09**, Brasília, 21 de Fevereiro de 2017.
- BURG, R. W.; MILLER, B. M.; BAKER, E. E.; BIRNBAUM, J.; CURRIE, S. A.; HARTMAN, R.; KONG, Y. L.; MONAGHAN, R. L.; OLSON, G.; PUTTER, I.; TUNAC, J. B.; WALLICK, H.; STAPLEY, E. O.; OIWA, R.; OMURA, S. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 15, p. 361-367, 1979.
- CAMPBELL, W. C. **Ivermectin and Abamectin**. New York: Springer Verlag, 1989.
- CHIU, S. H. L.; SESTOKAS, E.; TAUB, R.; GREEN, M. L.; BAYLIS, F. P.; JACOB, T. A.; LU, A. Y. H. Metabolic disposition of ivermectin in swine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 2079-2085, 1990.
- CRUMP, A.; OMURA, S. Ivermectin, ‘wonder drug’ from Japan: the human use perspective. **Proceedings of the Japan Academy, Series B, Physical and Biological Sciences**, v.87, p. 13-28, 2011.
- CULLY, D.F.; VASSILATIS, D. K.; LIU, K. K.; PARESS, P. S.; VAN DER PLOEG, L. H.; SCHAEFFER, J. M.; ARENA, J. P. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 371, p. 707-711, 1994.

- DELAYTE, E. H.; OTSUKA, M.; LARSSON, C. E.; CASTRO, R. C. C. Efficacy of systemics macrocyclic lactones (ivermectin and moxidectin) for the treatment of generalized canine demodicosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 31-38, 2006.
- DELGADO, F. E. F.; LIMA, W. S.; CUNHA, A. P.; BELLO, A. C. P. P.; DOMINGUES, L. N.; WANDERLEY, R. P. B; LEITE, P. V. B.; LEITE, R. C. Cattle helminthiasis: farmers perception in Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, 2009.
- DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS 2015. Rio de Janeiro. EPUC, 2015.
- GEARY, T. G. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 530-532, 2005.
- GERENUTTI, M.; SPINOSA, H. S. Avermectinas: revisão do uso e da ação sobre o SNC. **Biotemas**, v. 10, p. 07-27, 1997.
- GUPTA, R. C. Ivermectin and selamectin. In: GUPTA, R. C. **Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles**, San Diego: Academic Press Inc; p. 508-513, 2007.
- JACKSON, H. Ivermectin as a systemic insecticide. **Parasitology Today**, v. 5, p. 146-155, 1989.
- KHOJA, S.; HUYNH, N.; WARNECKE, A. M. P.; ASATRYAN, L.; JAKOWEC, M. W.; DAVIES, D. L. Preclinical evaluation of avermectins as novel therapeutic agents for alcohol use disorders. **Psycopharmacology**, p. 1-13, 2018.
- LAING, R.; GILLAN, V.; DEVANEY, E. Ivermectin - Old Drug, New Tricks? **Trends in Parasitology**, v. 33, p. 463-472, 2017.
- LANKAS, G. R.; MINSKER, D. H.; ROBERTSON, R. T. Effects of ivermectina on reproduction and neonatal toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 27, n.8, p. 523-529, 1989.
- MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.
- MEROLA, V. M.; EUBIG, P. A. Toxicology of avermectinas and milbemycins (macrocyclic lactones) and the role of P-Glycoprotein in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal**, v. 42, p. 313-333, 2012.
- MORAGAS, W. M.; SCHNEIDER, M. O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos da Geografia**, v. 3, p. 26-40, 2003.

- MOREIRA, N. Influência da exposição à ivermectina na esfera sexual de ratos e ratas. **Dissertação (Mestrado em Ciências)**. 91f. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- MOREIRA, N.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Ivermectin reduces sexual behavior in female rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 43, p. 33-38, 2014.
- MOREIRA, N.; SANDINI, T. M.; REIS-SILVA, T. M.; NAVAS-SUÁREZ, P.; AUADA, A. V. V.; LEBRUN, I.; FLORIO, 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.
- OEHLER, D. D.; MILLER, J. A. Liquid chromatographic determination of ivermectin in bovine serum. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, p. 59, 1989.
- OMURA, S. Ivermectin: 25 years and still going strong. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 91-98, 2008.
- PAREDES, R.; AGMO, A. GABA and behavior: the role of receptor subtypes. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 16, p. 145-170, 1992.
- PRABHU, S. V.; WEHNER, T. A.; TWAY, P. C. Determination of ivermectin levels in swine tissues at the parts per billion level by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 1468-1471, 1991.
- RODRIGUES-ALVES, P. S. B.; LEBRUN, I.; FLÓRIO, J. C.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Moxidectin interference on sexual behavior, penile erection and hypothalamic GABA levels of male rats. **Research in Veterinary Science**, v. 84, p. 100-106, 2008.
- RODRIGUES-ALVES, P. S. B.; LEBRUN, I.; FLÓRIO, J. C.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Moxidectin interference on motor activity of Rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 883-891, 2009.
- SAKATE, M. Manual de terapêutica das intoxicações. In: ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**, 2 ed. São Paulo: Roca, p. 524-529, 2002.
- SANFORD, S. E.; REHMTULLA, A. J.; JOSEPHSON, G. K. A. Ivermectin overdose and toxicosis in neonatal pigs. **Canadian Veterinary Journal**, v. 29, p. 735-736, 1988.
- SARTOR, I. F.; SANTARÉM, V. A. Agentes empregados no controle de ectoparasitos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 599-608, 2017.
- SIVILOTTI, L.; NISTRI, A. GABA Receptor mechanism in the central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 36, p. 35-92, 1991.

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

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA A SAÚDE ANIMAL. Disponível em: <<http://www.cpv.com.br/cpv/default.aspx>>. Acesso em: 24 de Abril de 2017.

TEMPLE, W. A.; SMITH, M. A. Ivermectin. New Castle, United Kingdom: **International Programme on Chemical Safety**, 1994. PIM 292. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/ivermect.htm>>. Acesso em: 24 de Abril de 2017.

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

YATES, D. M.; PORTILLO, V.; WOLSTENHOLME, A. J. The avermectin receptors of *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans*. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 1183-1193, 2003.

2. Capítulo 1

2. CAPÍTULO 1 - Estudo dos efeitos da administração de ivermectina em ratos machos e fêmeas: parâmetros reprodutivos e hormonais

2.1 INTRODUÇÃO

A ivermectina é um antiparasitário do grupo das avermectinas empregada tanto em medicina humana como em medicina veterinária. Em seres humanos é utilizada no tratamento da filariose linfática, oncocercose, rosácea, miíase, escabiose e pediculose (OMURA, 2008; KIRCIK et al., 2016). Em medicina veterinária é empregada como endectocida em ampla variedade de espécies animais (CAMPBELL, 1989; JACKSON, 1989; OMURA, 2008). A ivermectina tem, como característica, o amplo espectro de ação, com elevada tolerância pelo organismo do hospedeiro, apesar de não ser isenta de risco de efeitos indesejáveis (MIOLO, 1999; ELGART; MEIKING, 2003).

Nos parasitos a ivermectina atua nos canais controlados pelo glutamato (CULLY et al., 1994; YATES; PORTILLO; WOLSTENHOLME, 2003; GEARY, 2005). Esses canais estão presentes somente nos nervos e células musculares dos invertebrados e, uma vez ativados acarretam no aumento da permeabilidade da membrana celular aos íons cloreto, promovendo a hiperpolarização dos nervos ou de células musculares, resultando em paralisia e morte do parasito (SIVILOTTI; NISTRI, 1991; PAREDES; AGMO, 1992).

Nos mamíferos, a ivermectina atua bloqueando a transmissão pós-sináptica de impulsos nervosos mediados pelo ácido gama aminobutírico (GABA), que é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) (GUPTA, 2007); atualmente, são conhecidas três classes de receptores: GABA_A, GABA_B e GABA_C (SIVILOTTI; NISTRI, 1991; BORMANN, 2000).

Além do SNC, o GABA é encontrado também em gônadas e nos órgãos reprodutivos acessórios, exercendo efeito direto na esteroidogênese testicular e na viabilidade e motilidade dos espermatozoides (ERDO et al., 1983; 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). O receptor GABA_A localizado nas células de Leydig parece ter participação local na regulação da síntese de hormônios sexuais (HE et al., 2001; HE et al., 2003; LI et al., 2008).

As células de Leydig secretam testosterona, quando estimuladas pelo hormônio luteinizante (LH), sendo a testosterona responsável pelas características sexuais masculinas (físicas e comportamentais) (RASKIN et al., 2009) e pelo controle da espermatogênese (O'DONNELL et al., 2001). Este hormônio é essencial para o início, manutenção e qualidade da espermatogênese, além de atuar no mecanismo de retroalimentação (*feedback* negativo) na secreção de LH e do Hormônio Liberador de Gonadotropinas (GnRH) (JOHNSON et al., 1980; MCLACHLAN et al., 1996; RASKIN et al., 2009). O Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e a testosterona atuam sobre os receptores das células de Sertoli, regulando a espermatogênese, e influenciando na quantidade de espermatozoides produzidos (O'DONNELL et al., 2001; RASKIN et al., 2009). Acrescente-se, ainda, que o sistema reprodutor é regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (para detalhe veja Anexo 1). O hipotálamo é responsável pelo controle central, com a síntese e liberação de GnRH, o qual é liberado de modo pulsátil pelos terminais hipotalâmicos neurais (JOHNSON et al., 1980; ROSER, 2008). Em ratos, o GnRH é liberado para dentro dos capilares do sistema porta hipofisário até a adeno-hipófise (JOHNSON et al., 1980; O'DONNELL et al., 2001), onde estimula os gonadotrofos a secretarem o LH e o FSH (MCLACHLAN et al., 1996; O'DONNELL et al., 2001).

Os efeitos da ivermectina sobre alguns parâmetros reprodutivos foram estudados tanto em machos como em fêmeas. Em relação aos parâmetros reprodutivos masculinos, recentemente, num estudo realizado em ratos tratados com ivermectina (0,56 mg/kg, por via subcutânea - SC), associada ou não com o anti-helmíntico rafoxadina (7,5 mg/kg, gavagem), observou-se redução de peso dos testículos, do epidídimo e dos órgãos sexuais acessórios, bem como diminuição da motilidade dos espermatozoides e aumento das anormalidades espermáticas (EL-SAWY; EL-MADDAWY; SEED, 2015). Quanto aos parâmetros reprodutivos femininos, nosso estudo apontou que a ivermectina (1,0 mg/kg, via intraperitoneal - IP) interferiu na manifestação de lordose de ratas, tanto daquelas no estro natural, como no estro induzido por hormônio, indicando prejuízo no comportamento sexual (MOREIRA; BERNARDI; SPINOSA, 2014).

Quanto aos estudos sobre os efeitos da ivermectina no desempenho reprodutivo de fêmeas, esses são escassos. Assim, Poul (1988) verificou que a administração de ivermectina (1,0, 2,0 e 4,0 mg/kg/dia) a ratas prenhes do 6º ao 20º dia de gestação e do 2º ao 20º dia de lactação promoveu 100% de mortalidade dos filhotes apenas na maior dose. Neste mesmo estudo, quando se administrou ivermectina somente durante a gestação, observou-se 22% de mortalidade dos filhotes das ratas que receberam a dose 4,0 mg/kg; nas demais doses observou-se prejuízo no desenvolvimento físico e reflexológico dos filhotes, mostrando que esses são mais suscetíveis à ação neurotóxica da ivermectina.

Assim, levando em consideração, o amplo emprego da ivermectina tanto na espécie humana, como na prática da medicina veterinária, faz-se necessário ampliar o conhecimento de seus efeitos sobre os mecanismos farmacológicos, fisiológicos e moleculares envolvidos na esfera reprodutiva.

2.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da administração de 0,2 e 1,0 mg/kg ivermectina, por via subcutânea, em parâmetros reprodutivos e hormonais de ratos machos e fêmeas.

2.2.1 Objetivos específicos

Em ratos:

- Estudar os efeitos da ivermectina no peso relativo dos órgãos em machos e fêmeas, bem como no índice gonadossomático;
- Realizar o estudo histopatológico das células do testículo e do epidídimo de ratos após 24, 48 e 72 horas da administração de ivermectina;
- Realizar o estudo imunohistoquímico para detecção de receptor de andrógeno em testículo de ratos após 24 horas da administração de ivermectina;
- Estudar os efeitos da ivermectina na concentração sérica de testosterona, FSH e LH de ratos após 24, 48 e 72 horas da administração;
- Avaliar a expressão relativa de enzimas da via esteroidogênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT) após 24, 48 e 72 horas da administração de ivermectina;
- Avaliar o ciclo estral fisiológico de ratas após a administração de ivermectina;
- Realizar o estudo histopatológico de células do ovário e útero de ratas após o acompanhamento do ciclo estral fisiológico;
- Avaliar os efeitos da ivermectina na concentração de estradiol nas fezes de ratas;
- Examinar alguns parâmetros do desempenho reprodutivo de ratas após a administração de ivermectina.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Animais

Foram utilizados 106 ratos adultos, da linhagem Wistar, machos (N=58) e fêmeas (N=48), provenientes 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 horas (luz acessa às 06:00 horas).

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

Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com as normas de manipulação animal adotadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ/USP. O presente estudo foi aprovado pela CEUA da FMVZ/USP, sob o protocolo n° 1892040315.

2.3.2 Drogas

- Ivomec® injetável (ivermectina - Merial Saúde Animal Ltda., Paulínia/SP);
- Tween 80 (Labsynth Produtos para laboratório Ltda., Diadema/SP): usado para facilitar a dissolução da ivermectina (1 gota para 5 ml da droga).

O Ivomec® injetável foi preparado acrescentando-se uma gota de Tween 80 para cada 5 ml de NaCl 0,9%, o qual foi adicionado gradativamente, obtendo-se as concentrações de 0,2 e 1,0 mg/ml de ivermectina. Empregou-se, como solução controle, a solução salina (NaCl

0,9%), a qual foi acrescida uma gota de Tween 80 para cada 5 ml. Ambas as soluções foram administradas por via SC. As doses de ivermectina administradas aos ratos foram de 0,2 e 1,0 mg/kg, sendo a primeira a dose terapêutica padrão usada em vários modelos de animais (DADARKAR; DEORE; GATNE, 2007; SARTOR; SANTARÉM, 2017), e a segunda foi escolhida considerando estudo prévio de nosso laboratório, no qual observou-se que essa dose promoveu prejuízo no comportamento sexual de ratos e ratas (BERNARDI et al., 2011; MOREIRA; BERNARDI; SPINOSA, 2014). Todos os procedimentos experimentais em machos foram realizados 24, 48 e 72 horas após a administração de ivermectina, levando-se em consideração que a meia-vida da ivermectina em ratos é de 1-2 dias (CHIU et al., 1990).

Todas as soluções foram administradas em volume de 1,0 ml/kg.

2.3.3. Procedimentos

Foram realizados os procedimentos descritos a seguir.

2.3.3.1 Avaliação do peso relativo dos órgãos e do índice gonadossomático de ratos

Para avaliar o peso relativo dos órgãos e o índice gonadossomático, os ratos foram pesados individualmente e submetidos à eutanásia (anestesia profunda com 1,0 mg/kg de acepromazina + 10 mg/kg de xilazina + 60 mg/kg de cetamina, por via IP). Em seguida, foram removidos e pesados fígado, adrenais, testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal (com e sem plasma seminal).

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

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

2.3.3.2 Análise histopatológica de fígado, adrenais, testículos e epidídimos de ratos

O testículo e o epidídimo direitos de cada animal foram imersos em uma solução fixadora de Bouin (ácido pícrico saturado 75%, formol 25%, ácido acético glacial 5%); após a pré-fixação por 4 horas, esses órgãos foram removidos do fixador e seccionados transversalmente com o auxílio de um bisturi e mantidos por mais 24 horas no mesmo fixador. Em seguida, a solução de Bouin foi substituída por álcool 70% até o processamento histológico, que consistiu na inclusão do material em *paraplast* (*Sigma Chemical Co.*, St. Louis, MO) e posterior obtenção de cortes com 5 µm de espessura e corado com hematoxilina-eosina (HE) para análise histopatológica.

O fígado e as adrenais foram fixados em formol a 10% por 48 horas e substituído por álcool 70% até o processamento histológico.

2.3.3.3 Análise da expressão de receptor andrógeno nos testículos por imunohistoquímica

Para a análise imunohistoquímica, as amostras de testículos direitos foram fixados em solução de Bouin (ácido pícrico saturado 75%, formol 25%, ácido acético glacial 5%) e incorporados em parafina. Os blocos parafinados foram seccionados a 3 µm, desparafinados e reidratados. As lâminas foram incubadas com anticorpos primários (anticorpo policlonal anti-receptor andrógeno - anti-AR -, diluição 1:100 – 1:200, *Thermo Fisher Scientific*, Meridian Road Rockford, IL, EUA, catálogo n° PA5-16750), seguido *EnVision + kit* (HRP. *Rabbit*. DAB +, K4011, *Dako*, Glostrup, Dinamarca). As análises foram realizadas sob microscopia de luz (lente de aumento de 400x), sendo avaliados 10 campos (áreas) aleatórios da lâmina de cada animal.

2.3.3.4 Avaliação da concentração sérica de testosterona, FSH e LH

Para avaliação da concentração sérica de testosterona, FSH e LH, o sangue foi coletado e armazenado em tubos cônicos do tipo *Falcon*® (50 mL) sem anticoagulante para obtenção do soro. As amostras coletadas foram centrifugadas a 4.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C (centrífuga Harrier 18/80 MSE da Sanyo®). Em seguida, o soro (sobrenadante) foi pipetado, com o auxílio de uma micropipeta automática, e armazenado em tubos de polipropileno do tipo *ependorf*® (2 ml). As amostras do soro foram conservadas em freezer - 80°C até o dia da análise.

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

Os níveis séricos de FSH e LH foram determinados pelo *kit Milliplex Map Rat Pituitary Magnetic Bead Panel* (Millipore, Billerica, MA). A diluição selecionada foi de 1:5. Os demais procedimentos foram realizados de acordo com os descritos pelo fabricante.

2.3.3.5 Avaliação da expressão relativa de enzimas da via esteroidogênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT)

Para avaliar a expressão relativa de enzimas da via esteroidogênica, as amostras de testículos esquerdos (sem a túnica albugínea) foram individualmente pesados e, aproximadamente, 100 mg de tecido foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para medida dos níveis dos genes relacionados (3β-hidroxiesteroide desidrogenase, 17β-hidroxiesteroide desidrogenase e CYP 19A1- para detalhe veja Anexo 2) através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT).

Inicialmente, foi realizada a extração do RNA total do tecido com o auxílio de 1,0 ml da solução de Trizol (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, EUA). Ao final da extração, as amostras de RNA total foram solubilizadas em 20 µl de água ultrapura. As concentrações das amostras de RNA total foram mensuradas por espectrofotometria utilizando o *NanoDrop 2000* (*Biophotometer-Eppendorf*®) no comprimento de onda de 260 nm.

A seguir, foi realizada a reação de transcrição reversa para a síntese do DNA complementar (cDNA), sendo utilizados cerca de 2-4µl do RNA total obtido, processado por meio da utilização do *kit* comercial *SuperScript™ First-Strand Synthesis System* para PCR-RT em termociclador *Robocycler* (*Stratagene*, La Jolla, CA, EUA).

Após a síntese do cDNA, foi realizada a PCR-RT com o auxílio do *kit* comercial *QuantiTect™ SYBR® Green PCR* (*Qiagen*, Valencia, CA, EUA) e a reação foi realizada no termociclador *StepOne* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). A ciclofilina foi utilizada como gene de controle interno para a normalização dos dados obtidos.

Foram validados os seguintes genes:

<i>Primers</i>	<i>Sequência (5'-3')</i>
3β-hidroxiesteroide desidrogenase <i>F</i>	AGG AAT CTC CTA AGC TGC AGA C
3β-hidroxiesteroide desidrogenase <i>R</i>	GAT GAC AAC AGA GAT GCC CT
17β-hidroxiesteroide desidrogenase <i>F</i>	GGG AAA GCC TAT TCA TTT GAG C
17β-hidroxiesteroide desidrogenase <i>R</i>	GTG GTC CTC TCA ATC TCT TCT G
CYP 19A1 <i>F</i>	AAT CAC ATT GAG TAT GCA CGT C
CYP 19A1 <i>R</i>	GAT GAC CTT GGG AGA CTC AG

F - Referente ao *primer forward* de ligação na direção 3'-5' da cadeia simples de DNA;

R - Referente ao *primer reverse* de ligação na direção 5'-3' da cadeia simples de DNA.

2.3.3.6 Avaliação do ciclo estral e da concentração de estradiol nas fezes

O ciclo estral foi acompanhado durante 30 dias consecutivos por observações microscópicas diárias do material proveniente do lavado vaginal das ratas. As coletas dos lavados vaginais foram realizadas no período da manhã, entre às 08h30 e 10h30.

Para coletar os lavados vaginais foi introduzido delicadamente, e quase superficialmente, na vagina da rata uma ponteira com a extremidade arredondada acoplada a uma pipeta contendo aproximadamente 50 µl solução salina (NaCl 0,9%), a qual foi depositada e, em seguida, aspirado esse material. A seguir, esse material foi colocado em uma lâmina de vidro e, imediatamente, observado sob microscopia de luz (lente de aumento de 400x), para detecção da fase do ciclo estral.

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

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

- Proestro: caracterizada pela predominância de células epiteliais nucleadas;
- Estro: caracteriza-se, principalmente, pela presença de células queratinizadas e anucleadas, muitas vezes justapostas;
- Metaestro: nesta fase encontram-se todos os tipos celulares, em proporções variadas;
- Diestro: distingue-se pela proeminente presença de leucócitos.

Foi considerado o 1º dia para avaliação do ciclo estral quando as ratas estavam na fase de estro. No 15º dia dessa avaliação, as ratas na fase de proestro ou estro foram distribuídas em grupos e tratadas, por via SC, com 0,2 ou 1,0 mg/kg de ivermectina ou solução salina (NaCl 0,9%), sendo o ciclo estral avaliado por mais 15 dias. Foi avaliado o número de cada fase do ciclo estral quinzenalmente, isto é, 15 dias antes e 15 dias após a administração de ivermectina.

Para avaliação dos níveis de estradiol nas fezes, estas foram coletadas de cada rata, por defecação espontânea ou induzida por massagem abdominal, nos seguintes dias: 14º dia da avaliação do ciclo estral (dia anterior ao tratamento com ivermectina ou solução controle), 15º dia da avaliação (dia da administração de ivermectina ou solução controle), 16º, 17º e 18º dias após administração. As fezes foram armazenadas em tubos de polipropileno do tipo eppendorf® (2 ml) para posterior dosagem hormonal.

Os níveis de estradiol nas fezes foram determinados pela técnica de enzima imunoensaio de duplo-anticorpo, empregando-se *kits* comerciais apropriados (*Cayman Chemical*, Ann Arbor, MI, EUA, catálogo nº 582251). O protocolo de extração das fezes foi realizado, de acordo, com o descrito pelo fabricante.

2.3.3.7 Avaliação do peso relativo de órgãos de ratas e estudo histopatológico

Ao término 30º dia de acompanhamento do ciclo estral, as ratas foram pesadas e submetidas à eutanásia profunda (1,0 mg/kg de acepromazina + 10 mg/kg de xilazina + 60 mg/kg de cetamina, por via IP) para a coleta dos órgãos de interesse (fígado, adrenais, útero e ovários), os quais foram pesados.

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

Para o estudo histopatológico, o útero e os ovários de cada animal foram imersos em uma solução fixadora de Bouin (ácido pícrico saturado 75%, formol 25%, ácido acético glacial 5%) por, aproximadamente, 48 horas e substituído por álcool 70% até o processamento histológico, que consistiu na inclusão do material em *paraplast* e posterior obtenção de cortes com 5 µm de espessura. A coloração com hematoxilina e eosina (HE) foi empregada. O fígado e as adrenais foram fixados em formol a 10% por 48 horas e substituído por álcool 70% até o processamento histológico.

2.3.3.8 Avaliação de alguns parâmetros do desempenho reprodutivo de ratas

Para a avaliação do desempenho reprodutivo de ratas virgens foi feito o acompanhamento do ciclo estral, por meio do lavado vaginal (conforme descrito no item 2.3.3.6), e sendo detectado o estro (fase receptiva), as fêmeas foram distribuídas em três grupos e tratadas, por via SC, com 0,2 ou 1,0 mg/kg de ivermectina ou solução salina (NaCl 0,9%). A seguir, as ratas foram introduzidas na caixa de um rato macho sexualmente experiente na proporção de três fêmeas para cada macho.

As fêmeas foram diagnosticadas positivas para a prenhez quando detectada a presença de espermatozoides no lavado vaginal; este foi considerado o dia zero de gestação (DG 0) e cada fêmea foi alojada individualmente em caixas, durante toda a gestação, que tem duração de 21-22 dias.

Nos dias DG 0, 7 (semana 1), 14 (semana 2) e 21 (semana 3) as ratas foram pesadas e avaliou-se também o ganho de peso semanal. Nos dias DG 7, 14 e 21 foram avaliados o consumo água e de ração. No 21º dia de gestação as ratas foram submetidas à anestesia profunda (1,0 mg/kg de acepromazina + 10 mg/kg de xilazina + 60 mg/kg de cetamina, por via IP), e imediatamente após esse procedimento, abriu-se a cavidade abdominal, expostos os corpos uterinos, sendo avaliado o número de implantações, o número de reabsorções, o número de filhotes vivos, o número de filhotes mortos, o número total de filhotes, o número de filhotes machos e o número de filhotes fêmeas.

2.3.4 Delineamento experimental

2.3.4.1 Efeitos da exposição à ivermectina em ratos: aspectos reprodutivos e hormonais de machos

Os ratos foram distribuídos em sete grupos (N = 7-10 animais, por grupo), sendo seis grupos experimentais e um controle. Os animais dos seis grupos experimentais receberam, por via SC, ivermectina, sendo que três grupos receberam a dose única de 0,2 mg/kg e outros três receberam 1,0 mg/kg. Os ratos do grupo controle receberam, pela mesma via, solução salina.

Os ratos dos grupos experimentais foram submetidos à anestesia profunda (1,0 mg/kg de acepromazina + 10 mg/kg de xilazina + 60 mg/kg de cetamina, por via IP) 24, 48 e 72 horas após a administração de ivermectina para coleta de sangue, por punção cardíaca, para avaliação sérica de testosterona, FSH e LH, conforme descrito no item 2.3.3.4. Os ratos do grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento.

Após a coleta de sangue, foram retirados fígado, adrenais, testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal (cheia e vazia), os quais foram pesados para avaliação do peso relativo, bem como do índice gonadossomático, conforme descrito no item 2.3.3.1; foi também realizado o estudo histopatológico, conforme descrito no item 2.3.3.2. Nos testículos foram avaliados a expressão de receptor andrógeno por imunohistoquímica e a expressão relativa de enzimas da via esteroidogênica por PCR-RT, conforme descrito, respectivamente, nos itens 2.3.3.3 e 2.3.3.5.

2.3.4.2 Efeitos da exposição à ivermectina em ratas: aspectos reprodutivos e hormonais

Foram empregadas 30 ratas que tiveram o ciclo estral fisiológico avaliado e acompanhado, por duas semanas consecutivas, a partir da fase de estro. A seguir, as ratas foram distribuídas em três grupos, sendo dois grupos experimentais e um controle. As ratas dos grupos experimentais receberam no dia do estro, por via SC, 0,2 ou 1,0 mg/kg de ivermectina, sendo o ciclo estral avaliado e acompanhado, por mais duas semanas consecutivas. As ratas do grupo controle receberam no estro, pela mesma via, solução salina, sendo realizado o mesmo procedimento. Durante a avaliação do ciclo estral foram coletadas fezes das ratas para a avaliação da concentração de estradiol, conforme descrito no item 2.3.3.6. Ao término da avaliação do ciclo estral, todas as ratas foram submetidas à anestesia profunda (1,0 mg/kg de acepromazina + 10 mg/kg de xilazina + 60 mg/kg de cetamina, por via IP) para coleta de fígado, ovários, útero e adrenais, os quais foram pesados e encaminhados para análise histopatológica, conforme descrito no item 2.3.3.7.

Outras 18 ratas foram empregadas para avaliação do desempenho reprodutivo. Esses animais foram distribuídos em três grupos, sendo dois grupos experimentais e um controle. As ratas dos grupos experimentais receberam no dia do estro, por via SC, 0,2 ou 1,0 mg/kg de ivermectina, sendo colocadas para cruzar com um macho sexualmente experiente. As ratas do grupo controle receberam no estro, pela mesma via, solução salina, sendo realizado o mesmo procedimento. Uma vez detectada a prenhez, as ratas foram colocadas individualmente em caixas, sendo avaliado o ganho de peso, o consumo de ração e água semanais. No DG 21 as ratas foram submetidas à anestesia profunda (1,0 mg/kg de acepromazina + 10 mg/kg de xilazina + 60 mg/kg de cetamina, por via IP) para avaliação de alguns parâmetros do desempenho reprodutivo, conforme descrito no item 2.3.3.8.

2.3.5 Análise estatística

Para as análises estatísticas foi empregado o *software* InStat (*Prism* 6.01, *GraphPad*, San Diego, CA, EUA). A homocedasticidade foi verificada por meio do teste F ou de Bartlett. A normalidade foi conferida pelo teste de Brown-Forsythe. A análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnett foram usados para analisar o peso relativo dos órgãos das ratas. Os níveis séricos de testosterona, FSH e LH, o peso relativo dos órgãos e o índice gonadossomático dos ratos, a avaliação da expressão relativa de enzimas da via esteroideogênica por PCR-RT, o ciclo estral, a concentração de estradiol nas fezes de ratas e o desempenho reprodutivo foram analisados pela ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett. A análise da expressão de receptor de andrógeno nos testículos por imunohistoquímica foi analisado pelo teste *t* de *Student*. 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), exceto o estudo de imunohistoquímica, cujos dados foram expressos como mediana e, respectivos, percentis e limites.

2.4 RESULTADOS

São apresentados, a seguir, os resultados obtidos.

2.4.1 Avaliação do peso relativo dos órgãos e do índice gonadossomático de ratos

A figura 2.1 mostra os efeitos da ivermectina no peso relativo dos diferentes órgãos e do índice gonadossomático de ratos. Os resultados revelaram diferenças significantes entre os grupos apenas no peso relativo do fígado e das adrenais. No fígado, a ANOVA de duas vias revelou diferenças significantes no tempo $[(F_{2,59}) = 4,111, p = 0,0213]$ e o teste *post hoc* de Dunnett revelou aumento no peso relativo desse órgão em ratos tratados com 1,0 mg/kg de ivermectina e observados às 24 horas, em comparação com o grupo controle. Em relação ao peso relativo das adrenais, a ANOVA de duas vias relevou diferenças significantes apenas na dose, tanto para a adrenal direita $[(F_{2,53}) = 9,625, p = 0,0003]$, como para a esquerda $[(F_{2,53}) = 9,216, p = 0,0004]$ e o teste *post hoc* de Dunnett revelou aumento no peso relativo das adrenais direita e esquerda em ratos tratados com 0,2 e 1,0 mg/kg de ivermectina observados tanto às 24 como às 48 horas, em comparação com o grupo controle.

Figura 2.1 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) no peso relativo dos órgãos (fígado, testículo, próstata, epidídimo, adrenal e vesícula seminal) e índice gonadosomático de ratos. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 7-10 animais por grupo. * $p < 0,05$, comparado com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett).

2.4.2 Análise histopatológica do fígado, adrenais, testículos e epidídimos de ratos

No estudo histológico dos diferentes tecidos foram observadas alterações evidentes entre os grupos apenas nos testículos. A figura 2.2 ilustra a secção dos túbulos seminíferos dos testículos de ratos do grupo controle e do grupo 1,0 mg/kg de ivermectina às 24 horas. No grupo controle, os túbulos seminíferos estão dispostos em associações celulares bem definidas, representando os 14 estágios do ciclo do epitélio seminífero (Figura 2.2 A). As células do epitélio seminífero, as células de Sertoli, e as células intersticiais (células de Leydig) exibem aspecto nuclear e localização compatível com o normal (Figura 2.2 B).

Na dose de 1,0 mg/kg de ivermectina às 24 horas foram observadas alterações histopatológicas na espermatogênese. As alterações consistem na desorganização do epitélio germinativo, a vacuolização, a degeneração das células germinativas e descamação das células para dentro do lúmen do túbulo (Figura 2.2 C-G).

Anormalidades histopatológicas semelhantes foram observadas na dose de 1,0 mg/kg de ivermectina, tanto às 48 horas (Figura 2.3 A-D) como às 72 horas (Figura 2.4 A-C), denotando a permanência desses padrões degenerativos no epitélio germinativo, como observado na dose de 1,0 mg/kg às 24 horas.

Figura 2.2 - Micrografia de luz da secção dos túbulos seminíferos de testículos de ratos do grupo controle e do grupo 1,0 mg/kg de ivermectina às 24 horas. Grupo controle: (A) aspecto normal, onde S = célula de Sertoli, G = espermatogônia, C = espermatócito, EP = espermatídes redondas e EZ = espermatozoides; (B) tecido intersticial com células de Leydig no aspecto normal (seta). Grupo 1,0 mg/kg às 24 horas: (C) onde 1 e 3 = epitélio desorganizado, 2 = descamação do epitélio; (D) seta indica descamação das células germinativas no lúmen tubular; (E) seta indica epitélio desorganizado; (F) seta indica baixa frequência de células da linhagem germinativa com aumento do diâmetro do lúmen; (G) seta indica células germinativas no lúmen tubular com núcleos picnóticos. HE (x 400).

Figura 2.3 - Micrografia de luz da secção dos túbulos seminíferos de testículos de ratos do grupo 1,0 mg/kg de ivermectina às 48 horas. Em (A), 1 = descamação de células germinativas no lúmen tubular e 2 = epitélio desorganizado; (B) seta indica vacuolização do epitélio tubular; (C) 1 e 2 = epitélio desorganizado; (D) seta indica células germinativas com núcleos picnóticos no lúmen tubular. HE (x 400).

Figura 2.4 - Micrografia de luz da secção dos túbulos seminíferos de testículos de ratos do grupo 1,0 mg/kg de ivermectina às 72 horas. Em (A), 1 = aumento do diâmetro do lúmen e 2 = epitélio desorganizado; (B) seta indica aumento do diâmetro do lúmen e vacuolização do epitélio tubular; (C) seta indica células germinativas com núcleos picnóticos no lúmen tubular; (D) 1 = células germinativas com núcleos picnóticos e 2 = descamação de células germinativas no lúmen tubular; (E) 1 = epitélio desorganizado e 2 = células germinativas no lúmen tubular. HE (x 400).

2.4.3 Análise da expressão de receptor andrógeno nos testículos por imunohistoquímica

A análise da expressão de receptor andrógeno nos testículos por imunohistoquímica não revelou alterações evidentes. As figuras 2.5 e 2.6 mostram que os testículos dos animais tanto do grupo controle como do grupo tratado com 1,0 mg/kg de ivermectina e observados 24 horas após a administração exibiram, de maneira semelhante, a marcação positiva para o receptor andrógeno nas células germinativas dos túbulos seminíferos.

Figura 2.5 - Efeitos da administração de ivermectina (1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) na expressão relativa do receptor andrógeno nos testículos por imunohistoquímica. Os dados são expressos como mediana e respectivos percentis e limites. N = 5 animais por grupo. $p > 0,05$, comparado com o grupo controle (Teste *t* de *Student*).

Figura 2.6 - Micrografia de luz da secção dos túbulos seminíferos, com marcação positiva (marrom) dos receptores andrógenos, de testículos de ratos do grupo controle (A) e do grupo 1,0 mg/kg de ivermectina às 24 horas (B). DAB (x400).

A

B

2.4.4 Avaliação da concentração sérica de testosterona, FSH e LH

A figura 2.7 mostra os efeitos da ivermectina na concentração sérica de testosterona, FSH e LH de ratos. Os resultados revelaram diferenças significantes entre os grupos apenas na concentração sérica de LH. A ANOVA de duas vias revelou diferença significativa apenas na dose [(F2,10) = 10,23, $p = 0,0001$] e o teste *post hoc* de Dunnett revelou diminuição na concentração sérica de LH em ratos que foram tratados com 1,0 mg/kg de ivermectina às 24 horas e com 0,2 mg/kg de ivermectina às 48 horas, em comparação com o grupo controle.

Figura 2.7 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) na concentração sérica de testosterona, FSH e LH de ratos. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 7-10 animais por grupo. ** $p < 0,01$, comparado com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett).

2.4.5 Avaliação da expressão relativa de enzimas da via esteroidogênica por PCR-RT

A figura 2.8 mostra os efeitos da avaliação da expressão relativa de enzimas da via esteroidogênica por PCR-RT. A ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significantes na expressão relativa das enzimas 3β -hidroxiesteroide desidrogenase, 17β -hidroxiesteroide desidrogenase e CYP 19A1 entre os grupos.

Figura 2.8 - Avaliação da expressão relativa de enzimas da via esteroidogênica por PCR-RT após a administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle). Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 5 animais por grupo. $p > 0,05$, em comparação com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).

2.4.6 Avaliação do ciclo estral e da concentração de estradiol nas fezes

A figura 2.9 mostra o número de cada fase do ciclo estral de ratas 15 dias antes e 15 dias após a administração de ivermectina. A ANOVA de duas vias não revelou diferenças significantes em nenhuma das fases do ciclo estral entre os grupos.

A figura 2.10 mostra a avaliação da concentração de estradiol nas fezes de ratas do 14º dia (24 horas antes da administração de ivermectina) ao 18º dia do ciclo estral (período pós-administração de ivermectina). A ANOVA de duas vias não revelou diferenças significantes na concentração de estradiol nas fezes, entre os grupos.

Figura 2.9 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) no número de cada fase do ciclo estral de ratas, 15 dias antes e 15 dias após a administração. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 7-10 animais por grupo. $p > 0,05$, em comparação com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).

Figura 2.10 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) na concentração de estradiol nas fezes de ratas do 14º dia (24 horas antes da administração de ivermectina) ao 18º dia (período pós-administração de ivermectina) do ciclo estral. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 5 animais por grupo. $p > 0,05$, em comparação com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).

2.4.7 Avaliação do peso relativo de órgãos e estudo histológico de ratas

A figura 2.11 mostra os efeitos da ivermectina no peso relativo dos diferentes órgãos de ratas. A ANOVA de uma via não revelou diferenças significantes no peso relativo dos órgãos de ratas entre os diferentes grupos.

No estudo histológico dos diferentes tecidos, não foram observadas alterações evidentes entre os diferentes grupos (dados não mostrados).

Figura 2.11 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) no peso relativo dos órgãos (fígado, adrenais, útero e ovários) de ratas. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 7-10 animais por grupo. $p > 0,05$ em comparação com o grupo controle (ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).

2.4.8 Avaliação de alguns parâmetros do desempenho reprodutivo de ratas

Todas as ratas acasaladas, tanto do grupo controle como aquelas dos grupos ivermectina, tornaram-se prenhes e a gestação foi acompanhada até o 21º dia.

A figura 2.12 mostra o ganho de peso, consumo de água e de ração semanais de ratas. Os resultados revelaram diferenças significantes entre os grupos apenas no consumo hídrico. No consumo hídrico, a ANOVA de duas via mostrou diferenças significantes entre os grupos [$F(2,36) = 3,684$, $p = 0,0350$] e os dias de gestação [$F(2,36) = 15,03$, $p < 0,0001$]; o teste *post hoc* de Dunnett revelou aumento do consumo hídrico nos animais tratados com as doses de 0,2 e 1,0 mg/kg de ivermectina na semana 2 e 3, em comparação ao grupo controle.

A tabela 2.2 mostra os parâmetros avaliados no desempenho reprodutivo de ratas. Os resultados não revelaram diferenças significantes entre os grupos. Vale acrescentar que não foram observadas nenhuma alteração anatômica externa em nenhum dos fetos dos diferentes grupos.

Figura 2.12 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) no ganho de peso, consumo de água e de ração semanais de ratas. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 6 animais por grupo. DG 0 = dia gestacional 0. * $p < 0,05$, $p > 0,05$, em comparação com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).

Tabela 2.1 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) nos diferentes parâmetros do desempenho reprodutivo de ratas. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = animais/grupo. $p > 0,05$, em comparação com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).

Parâmetros	Controle (N=6)	Ivermectina (mg/kg)	
		0,2 (N=6)	1,0 (N=6)
Número de implantações	11,50 $\pm$ 11,67	12,50 $\pm$ 12,33	11,00 $\pm$ 11,33
Número de reabsorções	0	0	0
Número de filhotes vivos	10,67 $\pm$ 0,49	11,33 $\pm$ 0,66	10,33 $\pm$ 0,42
Número de filhotes mortos	0	0	0
Número total de filhotes	10,67 $\pm$ 0,49	11,33 $\pm$ 0,66	10,33 $\pm$ 0,42
Número de filhotes machos	5,33 $\pm$ 0,76	6,16 $\pm$ 0,65	4,33 $\pm$ 0,61
Número de filhotes fêmeas	5,33 $\pm$ 0,61	5,16 $\pm$ 0,60	6,16 $\pm$ 0,47

2.4 DISCUSSÃO

Neste trabalho investigou-se a possível capacidade da ivermectina causar disfunções reprodutivas e hormonais em ratos machos e fêmeas.

Inicialmente, avaliou-se o peso relativo dos testículos de ratos, visto que este parâmetro juntamente com o volume testicular são utilizados como um indicador quantitativo da normalidade dos testículos; em circunstâncias anormais, são evidenciadas alterações no peso deste órgão (RUSSEL; MALONE; KARPAS, 1990). Outro fator indicativo da normalidade testicular é a correlação entre o peso do testículo e o número de células germinativas do epitélio seminífero (MEISTRICH, 1982; HIKIM et al., 1989; KOTULA-BALAC et al., 2011).

Os resultados obtidos no presente estudo não mostraram alteração no peso relativo dos testículos, contudo observou-se alterações nas células germinativas do epitélio seminífero dos testículos de ratos tratados com 1,0 mg/kg de ivermectina, desde 24 horas até 72 horas da administração. O aspecto histológico mostrou vacuolização, sugerindo a morte de células da linhagem germinativa, uma vez que há espaço entre as células de Sertoli e as células germinativas (FREITAS et al., 2002). Além disso, observou-se desorganização e descamação do epitélio seminífero, bem como a presença de núcleos picnóticos nas células da linhagem germinativa, o que caracteriza degeneração do epitélio seminífero. Assim, esses achados são sugestivos de que a exposição aguda a maior dose de ivermectina causou prejuízo na espermatogênese e na espermiogênese de ratos, em decorrência da desorganização das células do epitélio seminífero. Neste sentido, alguns autores têm atribuído esses efeitos à atuação da ivermectina em receptores GABAérgicos presentes nos testículos e em espermatozoides (HE et al., 2001; HE et al., 2003; LI et al., 2008), bem como em célula de Leydig de ratos (HE et al., 2001; GEIGERSEDER et al., 2003; HAUET et al., 2005).

As células de Leydig são responsáveis pela produção de andrógenos, como a testosterona (RAMASWAMY; 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 17α -hidroxipregnenolona pela enzima 17α -hidroxilase. Em etapa conseguinte, a 17α -hidroxipregnenolona é convertida em dehidroepiandrosterona (DHEA), que, pela ação da enzima 3β -hidroxiesteroide desidrogenase, é convertida a androstenediona. A seguir, a androstenediona é convertida, pela enzima 17β -hidroxiesteroide desidrogenase, 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; WEINBAUER, 2014).

Assim, a fim de compreender os efeitos da ivermectina sobre os aspectos bioquímicos da síntese e secreção dos hormônios hipofisário-gonadais, no presente estudo foram avaliadas as concentrações séricas de testosterona, FSH e LH, bem como a expressão relativa das enzimas CYP 19A1 (responsável pela conversão de testosterona em estradiol - MOLINA, 2007; LEU et al., 2011), 3β -hidroxiesteroide desidrogenase e 17β -hidroxiesteroide desidrogenase.

Os resultados da concentração sérica de testosterona, FSH e LH mostraram alterações apenas nos níveis séricos de LH, sendo observada redução nos níveis às 24 (1,0 mg/kg) e 48 (0,2 mg/kg) horas após a administração de ivermectina. Essa redução nos níveis de LH não foi suficiente para causar aumento nos níveis de testosterona, por meio de um *feedback* negativo (JOHNSON et al., 1980; MCLACHLAN et al., 1996; RASKIN et al., 2009). Vale ressaltar que trabalho anterior de 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.

No presente estudo, além da ivermectina não promover alterações nos níveis de testosterona e FSH, não foram observadas também alterações na expressão relativa das enzimas da via esteroidogênica testicular, o que corrobora a ausência de alteração na expressão de receptor andrógeno nos testículos. Esses achados, tomados em conjunto, indicam ausência de efeitos da ivermectina nas vias da síntese e secreção dos hormônios hipofisários-

gonadais de ratos machos.

Em fêmeas de mamíferos, as funções do sistema reprodutor são controladas pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HERBISON; PAPE, 2001; MENDELSON; MICHELLE; WARREN, 2010). Nas diferentes fases do ciclo estral, as maiores concentrações de estradiol são encontradas durante a fase de proestro; na fase seguinte, o estro, começa a ocorrer queda dos níveis séricos de estradiol; e por fim, no metaestro e no diestro a concentração de estradiol chega a níveis muito baixos (HERBISON; PAPE, 2001; VILELA; SANTOS JÚNIOR; SILVA, 2007). Em ratas, cada fase do ciclo estral possui duração média de 24 horas, ou seja, normalmente o ciclo tem duração de quatro dias (VILELA; SANTOS JÚNIOR; SILVA, 2007).

Sabe-se que as alterações na fertilidade feminina podem ser explicadas pelo fato de que algumas drogas podem atuar diretamente no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e, assim, afetar a biossíntese do estradiol (HERBISON; PAPE, 2001). Assim, no presente estudo foi investigado se a administração de ivermectina poderia prejudicar a síntese de estradiol de ratas e, conseqüentemente, o ciclo estral e o desempenho reprodutivo.

Inicialmente, foi avaliada a duração de cada fase do ciclo estral das ratas por 30 dias consecutivos, sendo 15 dias antes e 15 dias após a administração de ivermectina, a qual foi feita na fase do estro. Avaliou-se também a concentração de estradiol nas fezes das ratas um dia antes e por três dias após a administração de ivermectina. Os resultados obtidos não revelaram diferenças significantes no número de cada fase do ciclo estral entre os grupos, bem como na concentração de estradiol nas fezes das ratas antes e até 72 horas após a administração de ivermectina. Esses dados indicam que a ivermectina não interfere no ciclo estral e na concentração de estradiol nas fezes de ratas, corroborando os achados de Moreira et al. (2014) que avaliaram a postura de lordose no comportamento sexual de ratas, tanto daquelas no estro natural como no estro induzido por hormônio, sugerindo que o prejuízo neste comportamento ocorre por uma ação da ivermectina em receptores GABAérgicos e não em vias hormonais.

Em relação ao desempenho reprodutivo, foi avaliado o peso corporal das ratas durante a gestação, bem como o consumo de água e de ração desses animais. Esses parâmetros, quando alterados, são indicativos de toxicidade materna (POUL, 1988; LANKAS; MINSKER; ROBERTSON, 1989; MÖLLER et al., 2003). Como, no presente estudo não

foram encontradas alterações relevantes nestes parâmetros, pode-se afirmar que essas doses de ivermectina não causaram toxicidade materna. Além disso, se houve prejuízo na lordose, como apontado por Moreira et al. (2014), esse efeito não foi capaz de impedir a prenhez e nem a manutenção da gestação.

Os demais parâmetros avaliados do desempenho reprodutivo de ratas estão relacionados à toxicidade embriofetal, sendo observado o número de implantações, o número de reabsorções, o número de filhotes vivos, o número de filhotes mortos, o número total de filhotes, o número de filhotes machos e o número de filhotes fêmeas. Os resultados não mostraram diferenças significantes entre os grupos, indicando que a ivermectina não causou toxicidade na prole. Vale ressaltar que a ivermectina foi administrada na fase do estro, quando as ratas foram acasaladas, não sendo observado comprometimento na concepção, nem nos períodos de pré-implantação, implantação e organogênese. Acrescente-se, ainda, que desde a concepção até a implantação é o período que envolve a embriofetividade e malformações, e o período de organogênese é altamente sensível às malformações (BERNARDI; SPINOSA, 2017).

Esses dados em conjunto, mostram que a ivermectina nas doses de 0,2 e 1,0 mg/kg, quando administrada por via SC, não promoveu alterações em parâmetros reprodutivos e hormonais de ratos machos e fêmeas, exceto a maior dose de ivermectina que causou desorganizado das células do epitélio seminífero, achado esse sugestivo de prejuízo na espermatogênese e na espermiogênese de machos.

2.5 CONCLUSÃO

A administração de ivermectina nas doses de 0,2 e 1,0 mg/kg, por via SC, em ratos machos e fêmeas:

- Não alterou o peso relativo dos órgãos sexuais masculinos e não modificou o índice gonadossomático de ratos machos;
- Promoveu prejuízo nas células germinativas do epitélio seminífero dos testículos de ratos;
- Não interferiu na expressão de receptor andrógeno nos testículos, bem como na expressão relativa de enzimas da via esteroidogênica de ratos machos;
- Não interferiu na concentração sérica de testosterona e FSH, porém diminuiu a concentração sérica de LH de ratos machos;
- Não interferiu no ciclo estral e na concentração de estradiol nas fezes de ratas;
- Não prejudicou o desempenho reprodutivo de ratas;
- Não alterou o peso relativo dos órgãos sexuais femininos de ratas e não foram observadas alterações histopatológicas nesses órgãos.

REFERÊNCIAS

- BERNANDI, M. M.; KIRSTEN, T. B.; SPINOSA, H. S.; MANZANO, H. Ivermectin impairs sexual behavior in sexually naïve, but not sexually experienced male rats. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 77-81, 2011.
- BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Exposição aos medicamentos durante o período do desenvolvimento. In: Spinosa, H.S.; Górniak, S.L.; Bernardi, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 6.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 900-908, 2017.
- BORMANN, J. The “ABC” of the GABA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 21, p. 16-19, 2000.
- CAMPBELL, W. C. **Ivermectin and Abamectin**. New York: Springer Verlag, 1989.
- CHIU, S. H. L.; GREEN, M. L.; BAYLIS, F. P.; ELINE, D.; ROSEGAY, A.; MERIWETHER, H.; JACOB, T. A. Absorption, tissue distribution and excretion of tritium-labeled ivermectin in cattle, sheep and rat. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**, v. 38, p. 2072-2078, 1990.
- CULLY, D.F.; VASSILATIS, D. K.; LIU, K. K.; PARESS, P. S.; VAN DER PLOEG, L. H.; SCHAEFFER, J. M.; ARENA, J. P. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 371, p. 707-711, 1994.
- DADARKAR, S. S.; DEORE, M. D.; GATNE, M. M. Comparative evaluation of acute toxicity of ivermectin by two methods after single subcutaneous administration in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 47, p. 257-260, 2007.
- ELGART, G. W.; MEIKING, B. A. Ivermectin. **Dermatologic Clinics**, v. 21, p. 277-282, 2003.
- EL-SAWY, A. E. F.; EL-MADDAWY, Z. K.; SEED, S. A. Adverse Effects of Ivermectin in comparison with Rafoxanide on Male Rats. **Alexandria Journal of Veterinary Science**, v. 47, p. 119-128, 2015.
- 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.
- FREITAS, F.; CORDEIRO-MORI, F.; SASSO-CERRI, E.; LUCAS, S.; MIRAGLIA, S. M. Alterations of spermatogenesis in etoposide-treated rats: a stereological study. **Interciência**, v. 27, p. 227-235, 2002.

- 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.
- GEARY, T. G. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. **Trends in Parasitology**, v. 21 n. 11, p. 530-532, 2005.
- GEIGERSEDER, C.; DOEPNER, R.; THALHAMMER, A.; FRUNGIERI, M. B.; GAMEL-DIDELON, K.; CALANDRA, R. S.; KÖHN, F. M.; MAYERHOFER, A. Evidence for a GABAergic system in rodent and human testis: local GABA production and GABA receptors. **Neuroendocrinology**, v. 77, p. 314-323, 2003.
- GUPTA, R. C. Ivermectin and selamectin. In: GUPTA, R. C. **Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles**, San Diego: Academic Press Inc; p. 508-513, 2007.
- HAUET, T.; YAO, Z.-X.; BOSE, H. S.; WALL, C. T.; HAN, Z.; LI, W.; HALES, D. B.; MILLER, W. L.; CULTY, M.; PAPADOPOULOS, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into leydig cell mitochondria. **Molecular Endocrinology**, v. 19, p. 540-554, 2005.
- HE, X. B.; HU, J. H.; WU, Q.; YAN, Y. C.; KOIDE, S. S. Identification of GABA(B) receptor in rat testis and sperm. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 283, p. 243-247, 2001.
- HE, X.; ZHANG, Y.; YAN, Y.; LI, Y.; KOIDE, S. S. Identification of GABABR2 in rat testis and sperm. **Journal of Reproduction and Development**, v. 49, p. 397-402, 2003.
- HERBISON, C. V.; PAPE, J. R. New evidence for estrogen receptor in gonadotropin-releasing hormone neurons. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 22, p. 292-308, 2001.
- HIKIM, A. P. S.; AMADOR, A. G.; KLEMCKE, H. G.; BARTKE, A.; RUSSELL, L. D. Correlative morphology and endocrinology of Sertoli cells in hamster testes in active and inactive states of spermatogenesis. **Endocrinology**, v. 125, p. 1829-1843, 1989.
- JACKSON, H. Ivermectin as a systemic insecticide. **Parasitology Today**, v. 5, p. 146-155, 1989.
- JOHNSON, L.; PETTY, C. S.; NEAVES, W. B. A comparative study of daily sperm production and testicular composition in humans and rats. **Biology of Reproduction**, v. 22, p. 1233-1244, 1980.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008.
- KIRCIK, I.; DEL ROSSO, J.; LAYTON, A.; SCHAUER, J. Over 25 years of clinical experience with ivermectin: an overview of safety for an increasing number of

- indications. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 15, p. 325-332, 2016.
- KOTULA-BALAK, M.; POCHEC, E.; HEJMEJ, A.; DUDA, M.; BILINNSKA, B. Octlyphenol affects morphology and steroidogenesis in mouse tumor Leydig cells. **Toxicology in vitro**, v. 25, p. 1018-1026, 2011.
- LANKAS, G. R.; MINSKER, D. H.; ROBERTSON, R. T. Effects of ivermectin on reproduction and neonatal toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 27, p. 523-529, 1989.
- LEU, S. F.; POON, S. L.; PAO, H. Y.; HUANG, B. M. The in vivo and in vitro stimulatory effects of cordycepin on mouse Leydig cell steroidogenesis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.75, p. 723-731, 2011.
- LI, S.; ZHANG, Y.; LIU, H.; YAN, Y.; LI, Y. Identification and expression of GABAC receptor in rat testis and spermatozoa. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 40, p. 761-767, 2008.
- MAGNAGHI, V.; BALLABIO, M.; CONSOLI, A.; LAMBERT, J. J.; ROGLIO, I.; MELCANGI, R. C. GABA receptor-mediated effects in the peripheral nervous system: A cross-interaction with neuroactive steroids. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 28, p.89-102, 2006.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, p. 609-614, 2002.
- MCLACHLAN, R.I.; WREFORD, N.G.; O'DONNELL, L.; DE KRETZER, D.M.; ROBERTSON, D.M. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. **Journal of Endocrinology**, v. 148, p.1-9, 1996.
- MEISTRICH, M. Quantitative survival, sperm after correlation production between and testicular fertility stem in the cell mouse agents treatment with different cytotoxic. **Journal of Andrology**, v. 3, p. 58-68, 1982.
- MENDELSON, F. A.; MICHELLE, P.; WARREN, M. P. Anorexia, bulimia, and the female athlete triad: evaluation and management. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 39, p. 155-167, 2010.
- MIOLO, J. R. Endectocidas na clínica veterinária. In: MAGALHÃES, H. M. **Farmacologia veterinária: temas escolhidos II**. Guaíba: Agropecuária, p.55-81, 1999.
- MOLINA, P. E. **Fisiologia Endócrina**, 2ed. São Paulo: Mc Graw Hill, 2007.
- MOREIRA, N.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Ivermectin reduces sexual behavior in female rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 43, p. 33-38, 2014.

- MOREIRA, N.; SANDINI, T. M.; REIS-SILVA, T. M.; NAVAS-SUÁREZ, P.; AUADA, A. V. V.; LEBRUN, I.; FLORIO, J. C.; BERNANDI, 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.
- MÖLLER, V. M.; DALLEGRAVE, E.; COELHO, R.; PEREIRA, J.; LANGELOH, A. Efeitos da ivermectina (Ivomec® 1% injetável) administrada a ratas Wistar durante o período de organogênese. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p. 328-333
- O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine reviews**, v. 22, p. 289-318, 2001.
- OMURA, S. Ivermectin: 25 years and still going strong. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 91-98, 2008.
- ONG, J.; KERR, D. I. GABA-receptors in peripheral tissues. **Life sciences**, v. 46, p. 1489-1501, 1990.
- PAREDES, R.; AGMO, A. GABA and behavior: the role of receptor subtypes. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 16, p. 145-170, 1992.
- POUL, J. M. Effects of Perinatal Ivermectin Exposure on Behavioral Development of Rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 10, p. 267-272, 1988.
- RAMASWAMY, S.; WEINBAUER, G. F. Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. **Spermatogenesis**. v. 4, p. e996025, 2015.
- RASKIN, K.; GENDT, K.; DUITTOZ, A.; LIERE, P.; VERHOEVEN, G.; TRONCHE, F.; MHAOUTY-KODJA, S. Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system: effects on male behavioral and neuroendocrine responses. **Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 4461-4470, 2009.
- ROSER, J. F. Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p.179-196, 2008.
- RUSSELL, L. D.; MALONE, J. P.; KARPAS, S. L. Morphological pattern elicited by agents affecting spermatogenesis by disruption of its hormonal stimulation. **Tissue Cell**, v. 13, p. 369-380, 1981.
- SARTOR, I. F.; SANTARÉM, V. A. Agentes empregados no controle de ectoparasitos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 599-608, 2017.

- SCHWARTZ, R. D.; SUDAK, P. D.; PAUL, S. M. GABA- and Bartiate-mediated Chloride Uptake in Rat Brain Synaptoneurosome: Evidence for a Rapid Desensitization of the GABA Receptor-coupled Chloride Ion Channel. **Molecular Pharmacology**, v. 30, p. 419-426, 1986.
- SIVILOTTI, L.; NISTRI, A. GABA Receptor mechanism in the central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 36, p. 35-92, 1991.
- TANAKA, C. Gamma-Aminobutyric acid in peripheral tissues. **Life sciences**, v. 37, p. 2221-2235, 1985.
- VILELA, M. G.; SANTOS JÚNIOR, J. L; SILVA, J. G. C. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. **Femina**, v. 35, p. 667-670, 2007.
- YATES, D. M.; PORTILLO, V.; WOLSTENHOLME, A. J. The avermectin receptors of *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans*. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 1183-1193, 2003.

3. Capítulo 2

3. CAPÍTULO 2: Efeitos temporais da administração de ivermectina nos parâmetros reprodutivos e nos níveis séricos de testosterona em coelhos

3.1 INTRODUÇÃO

A ivermectina é uma lactona macrocíclica semissintética, empregada como agente antiparasitário de amplo espectro de ação contra nematelmintos e artrópodes (POUL, 1988; LANKAS; MINSKER; ROBERTSON, 1989; UHLIR; VOLF, 1992). É empregada, principalmente, no controle de infecções parasitárias de animais domésticos e, mais recentemente, vem sendo utilizada em seres humanos para o tratamento da oncocercose, sarna e pediculose (POUL, 1988; OMURA, 2008).

É uma droga bem tolerada e sem efeitos colaterais em mamíferos, em doses terapêuticas. A ivermectina, em parasitos, atua nos canais controlados pelo glutamato (CULLY et al., 1994; YATES; PORTILLO; WOLSTENHOLME, 2003; GEARY, 2005). Esses canais de glutamato estão presentes nos nervos e nas células musculares dos invertebrados e, quando ativados, promovem o aumento da permeabilidade da membrana celular aos íons cloreto, causando a hiperpolarização dos nervos ou de células musculares, o que resulta na paralisia e morte do parasito (PONG; WANG, 1982; TRAILOVIC; IVANOVIC; VARAGIĆ, 2011; EL-SAWY; EL-MADDAWY; SEED, 2015).

Em mamíferos, a ivermectina atua bloqueando a transmissão pós-sináptica de impulsos nervosos mediados pelo ácido gama aminobutírico (GABA), que é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) (GUPTA, 2007); atualmente, são conhecidas três classes de receptores: GABA_A, GABA_B e GABA_C (SIVILOTTI; NISTRI, 1991; BORMANN, 2000).

Alguns estudos vêm avaliando o papel dos receptores GABAérgicos no comportamento sexual de mamíferos. Estudos em ratos sobre os efeitos comportamentais da administração de lactonas macrocíclicas, como ivermectina, doramectina e moxidectina, mostraram alta correlação entre alterações comportamentais e o sistema GABAérgico (RODRIGUES-ALVES et al., 2008; RODRIGUES-ALVES et al., 2009; BERNARDI et al.,

2011; FERRI et al., 2013; MOREIRA et al., 2017). Estudos anteriores realizados em nossos laboratórios mostraram que a ivermectina (SPINOSA; STILCK; BERNARDI, 2002) e a doramectina (SPINOSA; GERENUTTI; BERNARDI, 2000) atuam como agonistas GABAérgicos e interferem em comportamentos relacionados a esse neurotransmissor. Em ratas, a ivermectina prejudicou o comportamento sexual durante o estro natural e induzido por hormônio (MOREIRA; BERNARDI; SPINOSA, 2014). Além disso, outro estudo mostrou que a ivermectina prejudicou a fase apetitiva do comportamento sexual em ratos machos sexualmente inexperientes, na dose de 1,0 mg/kg; essa dose aumentou a latência para a primeira monta e a primeira intromissão 15 minutos após a administração (BERNARDI et al., 2011).

O comportamento sexual em machos é regulado pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. O hipotálamo sintetiza e libera o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), dentro dos capilares do sistema porta-hipofisário, atingindo a adeno-hipófise (JOHNSON et al., 1980; O'DONNEL et al., 2001), onde estimula os gonadotrofos a secretarem o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH) (MCLACHLAN et al., 1996; O'DONNEL et al., 2001). O LH estimula a liberação de testosterona a partir das células de Leydig localizadas no testículo (SHULMAN; SPRITZER, 2014). A testosterona é o principal hormônio sexual masculino, responsável pelo comportamento sexual masculino, além de desempenhar papel fundamental no desenvolvimento de órgãos reprodutores masculinos, como testículos e próstata, bem como na produção de espermatozoides (MATOS; MOREIRA; GUEDES, 2003).

Os espermatozoides são produzidos dentro dos túbulos seminíferos dos testículos pelas divisões das células germinativas, em um processo chamado espermatogênese (MRUK; CHENG, 2004). O espermatozoide de mamífero é uma célula alongada, revestida pela membrana plasmática, que possui dois componentes principais, a cabeça e flagelo, os quais são unidos pelo colo (ÕURA; TOSHIMORI, 1990; MORTIMER, 1997; GRAHAM, 2001).

A característica estrutural do espermatozoide está envolvida com a sua atividade funcional única, a de assegurar a liberação do material genético (contido no núcleo do espermatozoide) para o oócito (célula germinativa feminina haploide), produzindo, assim, o zigoto (ÕURA; TOSHIMORI, 1990). Dessa forma, a função principal da cabeça do

espermatozoide é a liberação do material genético (DNA), enquanto a função do flagelo é a de promover motilidade espermática (GRAHAM, 2001).

A cabeça do espermatozoide possui, além do núcleo, o acrossomo. O núcleo é envolvido pelo envelope nuclear e a cromatina do núcleo espermático é altamente condensada. O acrossomo é uma vesícula, originária do complexo de Golgi da espermátide (célula germinativa masculina haploide que se diferencia em espermatozoide), que contém enzimas hidrolíticas necessárias para a penetração na matriz extracelular do oócito para completar a fecundação (ÕURA; TOSHIMORI, 1990; MORTIMER, 1997).

O flagelo é composto pela peça intermediária, peça principal e peça terminal (MORTIMER, 1997). A peça intermediária é composta por mitocôndrias, que estão relacionadas com a produção de energia, responsável pelo batimento flagelar. A peça intermediária se liga à peça principal através do colo. A peça principal, por sua vez, vai se estender até a parte terminal do flagelo. Internamente, o flagelo possui o axonema, estrutura que também é responsável pela motilidade espermática (MORTIMER, 1997; GRAHAM, 2001).

Os espermatozoides são constituídos por membranas, que são compostas por lipídios e proteínas. As membranas das células espermáticas dos mamíferos são classificadas em: plasmática, nuclear, acrossomal e mitocondrial, as quais se diferenciam em composição e função (CELEGHINI et al., 2010). As membranas espermáticas são responsáveis pelo mecanismo de manutenção do equilíbrio osmótico celular, atuando como barreira entre os meios intra- e extracelulares. Danos nestas estruturas podem acarretar a perda da homeostase, com posterior morte celular. Assim, a integridade da membrana é fundamental para garantir a sobrevivência do espermatozoide no trato genital de fêmeas e para a manutenção da capacidade fertilizante (O'DONNEL; MCCLURE; LEWIS, 2002).

O potencial da fertilidade masculina é definido pela produção diária de espermatozoides, porém há drogas capazes de afetar o sistema reprodutivo, por meio de diferentes vias e mecanismos. Assim, podem prejudicar a espermatogênese e, conseqüentemente, causar baixa qualidade do sêmen e na concentração de espermatozoides, bem como alterações morfológicas nos espermatozoides, podendo causar infertilidade ou diminuição da fertilidade (BONDE, 2010; WONG; CHEGN, 2011).

Em um estudo realizado por Moreira et al. (2017) foi observado que a dose de 1,0

mg/kg de ivermectina, administrada por via intraperitoneal, reduziu os níveis séricos de testosterona em ratos machos, sendo esse efeito atribuído a atuação da droga em receptores GABAérgicos. De fato, sabe-se que há receptores GABAérgicos periféricos presentes nos testículos (HE et al., 2001; HE et al., 2003; LI et al., 2008), os quais, quando ativados, reduziram liberação de testosterona e, conseqüentemente, prejudicando a produção espermática.

Considerando que a testosterona é responsável pelo comportamento sexual masculino, além de desempenhar papel relevante na produção de espermatozoides (MATOS; MOREIRA; GUEDES, 2003), no presente estudo propõe-se investigar se a ivermectina é capaz de interferir em parâmetros reprodutivos e nos níveis séricos de testosterona de coelhos, por um período de até 60 dias após a sua administração. Deve ser salientado que a escolha dessa espécie animal se justifica pelas seguintes vantagens: redução do número de animais (aplicação do princípio dos 3 Rs - PRESGRAVE, 2002; CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004), facilidade nos métodos de coleta e análise do sêmen e acompanhamento dos parâmetros seminais e hormonal no mesmo animal por até 60 dias após a administração (MORTON, 1988).

3.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da ivermectina na esfera reprodutiva de coelhos machos adultos através da análise computadorizada do sêmen, bem como avaliar a integridade e características morfológicas dos espermatozoides, os níveis de testosterona sérica e em parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue após 1, 2, 3, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 dias da administração de 0,2 e 1,0 mg/kg de ivermectina, por via subcutânea (SC).

3.2.1 Objetivos específicos

Em coelhos:

- Avaliar a concentração de espermatozoides 1, 2, 3, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após a administração de ivermectina;
- Realizar a análise computadorizada da motilidade de espermatozoides 1, 2, 3, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após a administração de ivermectina;
- Analisar os efeitos da ivermectina na avaliação simultânea das membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides pela associação de sondas fluorescentes após 1, 2, 3, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de sua administração;
- Analisar as características morfológicas dos espermatozoides 1, 2, 3, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após a administração de ivermectina;
- Avaliar o peso relativo dos órgãos sexuais e o índice gonadossomático após 60 dias da administração de ivermectina;
- Avaliar a concentração sérica testosterona 1, 2, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após a administração de ivermectina;
- Realizar o estudo histopatológico dos epitélios testicular e epididimário após 60 dias da administração de ivermectina;
- Realizar a análise hematológica e bioquímica do sangue 1, 2 e 7 após a administração da ivermectina.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Animais

Foram utilizados 18 coelhos, adultos machos, da raça Nova Zelândia. Os animais foram mantidos no Centro de Pesquisa em Toxicologia Veterinária (CEPTOX), Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). Os animais foram alojados individualmente em gaiolas, sob temperatura ambiente controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade (45-65%) e iluminação artificial (ciclo claro/escuro de 12 horas/12 horas). Os animais receberam 60 g por dia para cada quilograma (kg) de peso da ração Sítio Coelho® (Guabi, Sales Oliveira, Brasil) e livre acesso à água filtrada.

Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com as normas de manipulação animal adotadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ/USP (CEUA Nº 1892040315).

A avaliação seminal foi realizada no Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES) “Prof. Dr. Aníbal de Sant’Anna Moretti, do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, Pirassununga, São Paulo.

3.3.2 Droga e tratamento

- Ivomec® injetável (ivermectina – Merial Saúde Animal Ltda., Paulínia/SP).

O Ivomec® injetável foi administrado por via SC nas doses de 0,2 e 1,0 mg/kg, sendo a primeira a dose terapêutica padrão usada em vários modelos de animais (DADARKAR; DEORE; GATNE, 2007; SARTOR; SANTARÉM, 2017), e a segunda foi escolhida considerando estudo prévio de nosso laboratório, no qual observou-se que essa dose promoveu prejuízo no comportamento sexual de ratos e ratas (BERNARDI et al., 2011; MOREIRA et

al., 2014). Todos os procedimentos de avaliação dos espermatozoides foram realizados nos dias 1, 2, 3, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 após a administração da ivermectina, considerando que nos estudos de biodisponibilidade e farmacocinética, em análise de plasma, a ivermectina tem meia-vida de 5-7 dias (GUPTA, 2007; NAOMAN, 2012). Também se considerou a duração da espermatogênese de coelhos, que, de acordo com MORTON et al. (1988), é de aproximadamente 60 dias. As amostras de sangue, provenientes da veia marginal da orelha, foram coletadas 1, 2, 7, 15, 30 e 60 dias após a administração da ivermectina para avaliação dos níveis de testosterona. As análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas nos dias 1, 2 e 7 após a administração da ivermectina. As amostras de órgãos foram coletadas no 60º dia após a administração da ivermectina para análise histopatológica.

3.3.3 Procedimentos

Foram realizados os procedimentos descritos a seguir.

3.3.3.1 Distribuição nos grupos de tratamento

Previamente ao início do experimento, os animais foram avaliados de acordo com a qualidade do sêmen em duas oportunidades. Nestas duas oportunidades amostras de sêmen foram coletadas e com base nas avaliações foram estimadas presença de defeitos espermáticos maiores, defeitos menores e motilidade. Para tanto, foi calculada a média para cada uma destas características por animal. Os animais foram então classificados seguindo um índice, o qual foi obtido através da fórmula: Índice da qualidade do sêmen = (3x TDMA) + (2x TDME) + (1x IM), onde TDMA = total de defeitos maiores, TDME = total de defeitos menores e IM = inverso da motilidade.

Com base na média dos índices das duas colheitas anteriores ao início do experimento, cada animal foi distribuído nos grupos experimentais, de modo que as médias dos dois índices

fossem as mais semelhantes possíveis, para que, assim, fossem obtidos grupos homogêneos em relação à qualidade e produção espermática (GOTARDO et al., 2014).

3.3.3.2 Colheita de sêmen

As colheitas de sêmen dos coelhos foram realizadas com o auxílio de vagina artificial aquecida, conforme proposto por ANDRADE et al. (2002). A higienização do prepúcio foi realizada com água e sabão neutro antes da colheita para evitar possíveis contaminações do sêmen (CELEGHINI et al., 2008).

3.3.3.3 Análise seminal

Avaliação da concentração de espermatozoides

Para determinar a concentração de células espermáticas, uma alíquota de sêmen bruto foi diluída na proporção 1:500 em formol salino tamponado. A leitura foi realizada em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica, com aumento de 400x.

Análise computadorizada da motilidade de espermatozoides

A motilidade dos espermatozoides foi realizada através da análise computadorizada do sêmen (CASA-Microptic®, Microptic S.L., Barcelona, Espanha). As amostras foram diluídas em meio de Tyrode com albumina, lactato e piruvato (TALP) para 20×10^6 espermatozoides/ml. Uma alíquota (5 µl) foi colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecida

(37°C) e avaliada por microscópio de contraste de fase (Nikon, Model Eclipse 80i) com aumento de 100x. A configuração CASA foi pré-ajustada para análise de espermatozoides de coelhos (tamanho mínimo de partículas 19 micrômetros², tamanho máximo de partículas 79 micrômetros²; número de quadros: 25; quadros por segundo: 24; limite de velocidade para espermatozoides lentos, 10 microns s⁻¹; limite de velocidade para espermatozoides médios, 25 microns s⁻¹; limite de velocidade para espermatozoides rápidos, 50 microns s⁻¹; retilinidade mínima para espermatozoides progressivos, 70%; e linearidade máxima para espermatozoides circulares, 50%. Cinco campos foram examinados para avaliar os seguintes parâmetros: motilidade total (TM,%), motilidade progressiva (PROM,%), velocidade média de percurso (VAP, µm/s), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), velocidade em linha reta (VSL, µm/s), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm), frequência de batimento cruzado (BCF, Hz), linearidade (STR,%) e linearidade (LIN,%) (ARRUDA, 2000; MORTIMER, 2000).

Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial da membrana mitocondrial

Após a diluição do sêmen em meio TALP, uma alíquota foi corada com Hoechst 33342 (1,25 µg/ml), iodeto de propídio (PI - 1,5 µg/ml), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA - 7,5 µg/ml) e iodeto de 5,5',6, 6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1 - 612 µM), depois incubado a 37°C por 15 minutos. Após a incubação, uma alíquota (8 µl) da amostra foi utilizada para o preparo em câmara úmida, entre lâmina e lamínula pré-aquecida (37°C) e a leitura realizada sob microscopia de epifluorescência (Microscópio de Epifluorescência Nikon, Modelo Eclipse 80i) em um filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485), B-2E/C (excitação 465-495 e emissão 515-555) e G-2E/C (excitação 540-525 e emissão 605-655), com aumento de 1000x. As células foram classificadas em: membrana plasmática íntegra, membrana acrossomal íntegro e potencial de membrana mitocondrial ativo.

Análise das características morfológicas dos espermatozoides

As avaliações das características morfológicas dos espermatozoides foram realizadas pela técnica da câmara úmida. Para isso, o sêmen foi diluído e fixado em formol salino tamponado, previamente aquecido, a 37°C. Uma alíquota de sêmen diluído (8 µl) foi colocada entre lâmina e lamínula, e foi realizada a contagem de 200 espermatozoides em aumento de 1000x sob microscopia de contraste de interferência diferencial (Nikon®, modelo 80i). A característica dos espermatozoides foi classificada em normais, defeitos menores e maiores.

3.3.3.4 Avaliação do ganho de peso, do peso relativo dos órgãos, do índice gonadossomático e estudo histopatológico

Nos dias 1, 30 e 60 do experimento, os coelhos foram pesados para avaliar o ganho de peso corporal.

Para avaliar o peso relativo dos órgãos e o índice gonadossomático, os coelhos foram pesados individualmente e submetidos à eutanásia (anestesia profunda com 0,75 mg/kg de acepromazina + 5 mg/kg de xilazina + 50 mg/kg de cetamina, por via intraperitoneal). Em seguida, foram removidos e pesados fígado, adrenais, testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal.

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

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

O testículo e o epidídimo de cada animal foram imersos em uma solução fixadora de Bouin (ácido pícrico saturado 75%, formol 25%, ácido acético glacial 5%); após a pré-fixação por 4 horas, esses órgãos foram removidos do fixador e seccionados transversalmente com o auxílio de um bisturi e mantidos por mais 24 horas no mesmo fixador. Em seguida, a solução de Bouin foi substituída por álcool 70% até o processamento histológico, que consistiu na

inclusão do material em *paraplast* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e posterior obtenção de cortes com 5 μ m de espessura e corado com hematoxilina-eosina (HE) para análise histopatológica.

O fígado e as adrenais foram fixados em formol a 10% por 48 horas e substituído por álcool 70% até o processamento histológico.

3.3.3.5 Avaliação da concentração sérica de testosterona

Para avaliação da concentração sérica de testosterona, o sangue foi coletado e colocado em tubos cônicos do tipo *Falcon*® (50 mL) sem anticoagulante para obtenção do soro. As amostras coletadas foram centrifugadas a 4.000 rpm, por 10 minutos, refrigeradas a 4°C (centrífuga Harrier 18/80 MSE da Sanyo®). Em seguida, o soro (sobrenadante) foi pipetado, com o auxílio de uma micropipeta automática, e armazenado em tubos de polipropileno do tipo *ependorf*® (2 ml). As amostras do soro foram conservadas em freezer -80°C até o dia da análise.

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

3.3.3.6 Análise hematológica e bioquímica do sangue

Para análise hematológica, as amostras de sangue coletadas foram, imediatamente, armazenadas em tubos para coleta de sangue do tipo *BD Vacutainer*® (4 mL) com anticoagulante (EDTA). Os biomarcadores determinados foram: glóbulos vermelhos (RBC),

hemoglobina (Hb), hematócrito (Hct), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócito.

Foi coletada uma alíquota de sangue para análise bioquímica. As amostras de sangue foram armazenadas em tubos cônicos do tipo *Falcon*® (15 mL) sem anticoagulante para obtenção do soro. As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 4.000 rpm, por 10 minutos, refrigeradas a 4°C. Foram avaliados os seguintes parâmetros bioquímicos: aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamil transpeptidase (GGT), globulina, albumina, colesterol total, triglicerídeos, lipoproteína de alta densidade (HDL), ureia e creatinina.

3.3.4 Delineamento experimental

Foram empregados 18 coelhos que foram previamente avaliados quanto a qualidade do sêmen (item 3.3.3.2), sendo e distribuídos em três grupos de seis animais (N = 6 por grupo): dois experimentais e um controle. Os coelhos dos grupos experimentais receberam a dose única de 0,2 ou 1,0 mg/kg de ivermectina, por via SC. Os coelhos do grupo controle receberam, pela mesma via, solução salina (NaCl 0,9%).

Foram avaliadas a concentração, a motilidade e a morfologia espermática, bem como a integridade das membranas plasmática e acrossomal, e potencial de membrana mitocondrial, conforme descrito no item 3.3.3.3.

As amostras de sangue foram coletadas 1, 2, 7, 15, 30 e 60 dias após a administração da ivermectina para avaliação dos níveis de testosterona (item 3.3.3.5) e as análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas nos dias 1, 2 e 7 após a administração da ivermectina (item 3.3.3.6).

No 60º dia após a administração de ivermectina, todos os coelhos foram submetidos à anestesia profunda (0,75 mg/kg de acepromazina + 5 mg/kg de xilazina + 50 mg/kg de cetamina, respectivamente por via intramuscular) para a coleta de fígado, adrenais, testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal, os quais foram pesados e encaminhados para análise

histopatológica, conforme descrito no item 3.3.3.8.

3.3.5 Análise estatística

Para as análises estatísticas foi empregado o software InStat (Prism 6.01, GraphPad, San Diego, CA, EUA). A homocedasticidade foi verificada por meio do teste F ou de Bartlett. A normalidade foi conferida pelo teste de Brown-Forsythe. A análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnett foi usada para analisar o peso relativo dos órgãos e o índice gonadosomático. A concentração de espermatozoides, motilidade dos espermatozoides, avaliação da integridade das membranas plasmática e acrosomal, o potencial de membrana mitocondrial, as características morfológicas dos espermatozoides, a análise bioquímica e 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.

3.4 RESULTADOS

São apresentados, a seguir, os resultados obtidos.

3.4.1 Distribuição nos grupos de tratamento

A tabela 3.1 mostra a classificação dos animais segundo a nota obtida em índice pré-estabelecido para a distribuição dos animais nos diferentes grupos.

Tabela 3.1 - Classificação dos animais segundo nota obtida em índice pré-estabelecido para a distribuição dos animais nos grupos de tratamento com ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle). N = número de animais por grupo.

Coelho	Nota	Grupo
1	89,25	Controle
2	95,7	Controle
3	208,1	Controle
4	116,55	Controle
5	147,2	Controle
6	202,2	Controle
Média: 149,84		N = 6
7	86,55	0,2 mg/kg
8	95,7	0,2 mg/kg
9	96,85	0,2 mg/kg
10	118,8	0,2 mg/kg
11	146,5	0,2 mg/kg
12	103,1	0,2 mg/kg
Média: 129,5		N = 6
13	70,3	1,0 mg/kg
14	90,8	1,0 mg/kg
15	113,2	1,0 mg/kg
16	144,5	1,0 mg/kg
17	146,2	1,0 mg/kg
18	184,2	1,0 mg/kg
Média: 171,8		N = 6

3.4.2 Análise seminal

Avaliação da concentração de espermatozoides

A figura 3.1 mostra os efeitos da ivermectina na concentração espermática de coelhos 1, 2, 3, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após a administração. A ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significantes na concentração espermática entre os diferentes grupos.

Figura 3.1 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) na concentração espermática de coelhos 1, 2, 3, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após a administração. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 6 animais por grupo. $p > 0,05$, em comparação com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).

Análise computadorizada da motilidade de espermatozoides

A figura 3.2 mostra os efeitos da ivermectina na motilidade espermática de coelhos 1, 2, 3, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após a administração. A ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significantes na motilidade espermática entre os diferentes grupos.

Figura 3.2 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) na motilidade espermática de coelhos 1, 2, 3, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após a administração. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 6 animais por grupo. $p > 0,05$, em comparação com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).

Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial da membrana mitocondrial

A figura 3.3 mostra a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides de coelhos dos grupos experimentais e controle. A ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significantes desses parâmetros entre os grupos.

Figura 3.3 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução de controle (1,0 ml/kg - grupo controle) na avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides de coelhos 1, 2, 3, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após a administração. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 6 animais por grupo. $p > 0,05$, em comparação com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).

Análise das características morfológicas dos espermatozoides

A tabela 3.2 mostra os efeitos da ivermectina na morfologia espermática em coelhos dos grupos experimentais e controle. A ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significantes na morfologia espermática entre os diferentes grupos.

Tabela 3.2 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução de controle (1,0 ml/kg - grupo controle) na morfologia espermática em coelhos 1, 2, 3, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após a administração. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = número de animais por grupo. $p > 0,05$, em comparação com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).

Grupo	Dia	Características dos espermatozoides (%)		
		Espermatozoide normal	Defeitos menores	Defeitos maiores
Controle (N = 6)	1°	65,92 $\pm$ 0,66	6,91 $\pm$ 1,98	27,17 $\pm$ 7,36
	2°	60,00 $\pm$ 1,25	7,30 $\pm$ 2,18	32,70 $\pm$ 6,57
	3°	59,75 $\pm$ 2,15	6,33 $\pm$ 2,15	33,92 $\pm$ 5,70
	5°	58,30 $\pm$ 0,82	7,50 $\pm$ 3,17	34,20 $\pm$ 7,65
	7°	61,25 $\pm$ 1,28	5,87 $\pm$ 1,62	32,88 $\pm$ 7,10
	15°	59,92 $\pm$ 0,01	5,10 $\pm$ 1,22	34,98 $\pm$ 8,78
	30°	62,00 $\pm$ 3,52	7,25 $\pm$ 1,18	30,75 $\pm$ 5,30
	45°	56,57 $\pm$ 1,91	6,00 $\pm$ 2,27	37,43 $\pm$ 5,82
	60°	59,67 $\pm$ 1,81	2,83 $\pm$ 0,59	37,50 $\pm$ 7,60
0,2 mg/kg (N = 6)	1°	75,00 $\pm$ 6,52	5,00 $\pm$ 0,64	20,00 $\pm$ 2,84
	2°	69,50 $\pm$ 2,17	6,08 $\pm$ 2,39	24,42 $\pm$ 5,44
	3°	61,00 $\pm$ 2,55	5,00 $\pm$ 1,44	34,00 $\pm$ 6,01
	5°	70,80 $\pm$ 4,26	4,70 $\pm$ 1,15	24,50 $\pm$ 4,59
	7°	72,92 $\pm$ 5,22	3,58 $\pm$ 1,53	23,50 $\pm$ 3,25
	15°	57,67 $\pm$ 7,66	6,50 $\pm$ 1,29	35,83 $\pm$ 1,05
	30°	72,01 $\pm$ 5,02	6,91 $\pm$ 1,92	21,08 $\pm$ 3,06
	45°	71,20 $\pm$ 6,75	5,60 $\pm$ 1,20	23,20 $\pm$ 2,05
	60°	56,06 $\pm$ 2,38	2,75 $\pm$ 0,80	41,20 $\pm$ 6,82
1,0 mg/kg (N = 6)	1°	69,09 $\pm$ 2,19	6,16 $\pm$ 0,93	24,75 $\pm$ 6,88
	2°	65,40 $\pm$ 0,37	6,70 $\pm$ 3,26	27,90 $\pm$ 6,37
	3°	65,25 $\pm$ 3,26	5,37 $\pm$ 1,60	29,38 $\pm$ 5,14
	5°	70,34 $\pm$ 7,21	6,16 $\pm$ 1,19	23,50 $\pm$ 1,60
	7°	66,5 $\pm$ 4,04	6,75 $\pm$ 1,96	26,75 $\pm$ 4,00
	15°	60,5 $\pm$ 3,00	10,00 $\pm$ 2,65	29,50 $\pm$ 4,35
	30°	57,87 $\pm$ 1,73	11,80 $\pm$ 2,98	30,33 $\pm$ 5,29
	45°	60,34 $\pm$ 2,41	9,83 $\pm$ 2,63	29,83 $\pm$ 4,96
	60°	56,23 $\pm$ 2,66	6,60 $\pm$ 2,06	37,17 $\pm$ 5,28

3.4.3 Avaliação do ganho de peso, do peso relativo dos órgãos, do índice gonadossomático e estudo histopatológico

A tabela 3.3 mostra os efeitos da ivermectina no ganho de peso corporal, no peso relativo dos diferentes órgãos e do índice gonadossomático em coelhos. Os resultados revelaram diferenças significantes apenas no peso relativo do fígado. No fígado, a ANOVA de duas vias revelou diferenças significantes na dose [$(F_{2,15}) = 7,616$, $p = 0,0052$] e o teste *post hoc* de Dunnett revelou diminuição no peso relativo desse órgão em coelhos que foram tratados com 1,0 mg/kg de ivermectina no 60º dia após a administração, em comparação com o grupo controle.

No estudo histopatológico dos diferentes tecidos, não foram observadas alterações evidentes entre os diferentes grupos (dados não mostrados).

Tabela 3.3 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) no ganho de peso corporal, no peso relativo dos órgãos (fígado, próstata, testículos, epidídimo, adrenal e vesícula seminal) e no índice gonadossomático (IGS) de coelhos. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = número de animais por grupo. ** p < 0,01, comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett).

Parâmetros		Controle	Ivermectina (mg/kg)	
		(N=6)	0,2 (N=6)	1,0 (N=6)
Ganho de peso corporal (g)	Dias: 0-30°	59 $\pm$ 40	14 $\pm$ 30	8 $\pm$ 50
	Dias: 31-60°	141 $\pm$ 20	170 $\pm$ 30	109 $\pm$ 20
Peso relativo dos órgãos (g)	Fígado	2,77 $\pm$ 0,18	2,68 $\pm$ 0,15	2,06 $\pm$ 0,07**
	Próstata	0,03 $\pm$ 0,002	0,03 $\pm$ 0,001	0,03 $\pm$ 0,003
	Testículo direito	0,08 $\pm$ 0,004	0,08 $\pm$ 0,005	0,09 $\pm$ 0,008
	Testículo esquerdo	0,08 $\pm$ 0,005	0,08 $\pm$ 0,003	0,09 $\pm$ 0,008
	Epidídimo direito	0,05 $\pm$ 0,002	0,04 $\pm$ 0,002	0,04 $\pm$ 0,003
	Epidídimo esquerdo	0,05 $\pm$ 0,001	0,04 $\pm$ 0,001	0,04 $\pm$ 0,006
	Adrenal direito	0,008 $\pm$ 0,001	0,008 $\pm$ 0,001	0,006 $\pm$ 0,001
	Adrenal esquerdo	0,008 $\pm$ 0,001	0,008 $\pm$ 0,001	0,006 $\pm$ 0,001
	Vesícula seminal	0,05 $\pm$ 0,004	0,05 $\pm$ 0,006	0,06 $\pm$ 0,008
IGS		0,004 $\pm$ 0,001	0,003 $\pm$ 0,001	0,005 $\pm$ 0,001

3.4.4 Avaliação da concentração sérica de testosterona

A figura 3.4 mostra os efeitos da ivermectina na concentração sérica de testosterona em coelhos 1, 2, 7, 15, 30 e 60 dias após a administração. A ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significantes na concentração sérica de testosterona entre os diferentes grupos.

Figura 3.4 - Efeitos da administração ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) na concentração sérica de testosterona de coelhos 1, 2, 7, 15, 30 e 60 dias após a administração. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = 6 animais por grupo. $p > 0,05$, em comparação com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Dunnett).

3.4.5 Análise hematológica e bioquímica do sangue

As tabelas 3.4 e 3.5 mostram os efeitos da ivermectina nos parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue de coelhos 1, 2 e 7 dias após a administração. A ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significantes nesses parâmetros entre os diferentes grupos.

Tabela 3.4 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) nos parâmetros hematológicos do sangue de coelhos 1, 2 e 7 dias após a administração. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = número de animais por grupo. $p > 0,05$, comparado com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett).

Parâmetros	Dia	Controle (N=6)	Ivermectina (mg/kg)	
			0,2 (N=6)	1,0 (N=6)
RBC (milhão/mm ³)	1°	4,96 $\pm$ 0,18	5,11 $\pm$ 0,20	5,13 $\pm$ 0,24
	2°	5,32 $\pm$ 0,21	4,93 $\pm$ 0,27	5,05 $\pm$ 0,29
	7°	4,98 $\pm$ 0,50	4,97 $\pm$ 0,18	5,16 $\pm$ 0,21
Hb (g/dl)	1°	15,74 $\pm$ 0,50	14,61 $\pm$ 0,40	15,16 $\pm$ 0,60
	2°	13,66 $\pm$ 0,29	12,92 $\pm$ 0,91	13,02 $\pm$ 0,37
	7°	16,34 $\pm$ 0,30	15,47 $\pm$ 0,21	15,93 $\pm$ 0,58
Hct (%)	1°	40,67 $\pm$ 66	38,17 $\pm$ 0,98	39,83 $\pm$ 1,16
	2°	39,43 $\pm$ 1,37	37,67 $\pm$ 1,54	38,83 $\pm$ 1,62
	7°	38,00 $\pm$ 0,87	36,83 $\pm$ 0,30	38,83 $\pm$ 1,07
VCM (fl)	1°	82,41 $\pm$ 3,31	75,17 $\pm$ 3,02	78,03 $\pm$ 2,20
	2°	74,35 $\pm$ 2,42	76,94 $\pm$ 3,52	77,54 $\pm$ 3,46
	7°	76,91 $\pm$ 3,14	74,61 $\pm$ 2,82	75,55 $\pm$ 2,34
HCM (pg)	1°	31,97 $\pm$ 1,83	28,76 $\pm$ 1,12	29,63 $\pm$ 0,78
	2°	25,81 $\pm$ 0,72	26,23 $\pm$ 1,43	26,19 $\pm$ 1,64
	7°	33,13 $\pm$ 1,49	31,35 $\pm$ 1,36	30,95 $\pm$ 1,00
CHCM (g/dl)	1°	38,62 $\pm$ 0,98	38,98 $\pm$ 0,40	38,02 $\pm$ 0,64
	2°	34,80 $\pm$ 0,85	34,11 $\pm$ 1,21	33,74 $\pm$ 1,32
	7°	43,06 $\pm$ 0,65	42,01 $\pm$ 0,78	40,97 $\pm$ 0,50
Eosinófilo (mm ³)	1°	0	0	0
	2°	0	0	0
	7°	0	0	0
Basófilo (mm ³)	1°	0,44 $\pm$ 0,44	0,90 $\pm$ 0,58	1,02 $\pm$ 0,34
	2°	0,92 $\pm$ 0,35	0,92 $\pm$ 0,48	0,7 $\pm$ 0,34
	7°	0,37 $\pm$ 0,37	0,17 $\pm$ 0,17	0,99 $\pm$ 0,48
Linfócito (mm ³)	1°	70,68 $\pm$ 9,63	79,82 $\pm$ 9,83	69,23 $\pm$ 3,99
	2°	78,45 $\pm$ 7,92	88,73 $\pm$ 6,42	62,18 $\pm$ 3,28
	7°	104,36 $\pm$ 14,30	108,57 $\pm$ 17,74	75,87 $\pm$ 3,38
Monócito (mm ³)	1°	1,08 $\pm$ 0,41	1,10 $\pm$ 0,37	0,46 $\pm$ 0,46
	2°	0,91 $\pm$ 0,45	1,79 $\pm$ 0,56	0,15 $\pm$ 0,15
	7°	1,08 $\pm$ 0,42	0,85 $\pm$ 0,39	0,37 $\pm$ 0,37

RBC = glóbulos vermelhos, Hb = hemoglobina, Hct = hematócrito, VCM = volume corpuscular médio, HCM = hemoglobina corpuscular média, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média.

Tabela 3.5 - Efeitos da administração de ivermectina (0,2 ou 1,0 mg/kg) ou solução controle (1,0 ml/kg - grupo controle) nos parâmetros bioquímicos do sangue de coelhos 1, 2 e 7 dias após a administração. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. N = número de animais por grupo. $p > 0,05$, comparado com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett).

Parâmetros	Dia	Controle (N=6)	Ivermectina (mg/kg)	
			0,2 (N=6)	1,0 (N=6)
AST (U/L)	1°	47,85 $\pm$ 8,11	46,83 $\pm$ 10,07	49,50 $\pm$ 3,69
	2°	39,14 $\pm$ 6,62	55,50 $\pm$ 6,28	47,66 $\pm$ 4,77
	7°	42,28 $\pm$ 9,06	37,66 $\pm$ 8,33	61,50 $\pm$ 13,71
ALT (U/L)	1°	59,57 $\pm$ 11,06	47,16 $\pm$ 9,93	51,66 $\pm$ 7,21
	2°	39,14 $\pm$ 6,62	55,50 $\pm$ 6,28	47,66 $\pm$ 4,77
	7°	56,42 $\pm$ 12,44	54,16 $\pm$ 12,98	57,00 $\pm$ 8,80
ALP (U/L)	1°	33,57 $\pm$ 6,12	36,83 $\pm$ 7,92	36,16 $\pm$ 2,37
	2°	30,42 $\pm$ 5,46	31,83 $\pm$ 3,02	30,16 $\pm$ 5,35
	7°	31,71 $\pm$ 6,82	34,33 $\pm$ 7,67	33,66 $\pm$ 4,20
GGT (U/L)	1°	4,00 $\pm$ 1,02	4,33 $\pm$ 0,66	3,16 $\pm$ 0,83
	2°	3,57 $\pm$ 0,99	3,33 $\pm$ 0,33	3,83 $\pm$ 0,30
	7°	4,57 $\pm$ 0,86	4,16 $\pm$ 0,98	4,33 $\pm$ 0,42
HDL (U/L)	1°	607,86 $\pm$ 108,98	641,83 $\pm$ 150,25	801,17 $\pm$ 130,68
	2°	868,43 $\pm$ 174,59	1204,7 $\pm$ 141,72	942,67 $\pm$ 120,91
	7°	570,29 $\pm$ 153,49	437,67 $\pm$ 121,96	628,33 $\pm$ 135,31
Triglicerídeos (mg/dl)	1°	71,57 $\pm$ 14,69	85,16 $\pm$ 18,42	90,00 $\pm$ 14,74
	2°	69,71 $\pm$ 13,42	111,67 $\pm$ 17,54	67,66 $\pm$ 8,09
	7°	66,42 $\pm$ 15,21	71,16 $\pm$ 25,37	85,66 $\pm$ 13,76
Colesterol total (mg/dl)	1°	23,00 $\pm$ 4,76	25,66 $\pm$ 7,83	24,83 $\pm$ 2,00
	2°	21,71 $\pm$ 4,03	24,33 $\pm$ 3,78	20,33 $\pm$ 0,84
	7°	20,00 $\pm$ 4,20	26,83 $\pm$ 5,81	24,33 $\pm$ 1,56
Albumina (g/dl)	1°	3,95 $\pm$ 0,66	3,95 $\pm$ 0,79	4,60 $\pm$ 0,08
	2°	3,81 $\pm$ 0,64	3,98 $\pm$ 0,80	4,53 $\pm$ 0,08
	7°	3,22 $\pm$ 0,84	4,08 $\pm$ 0,83	4,85 $\pm$ 0,17
Globulina (g/dl)	1°	1,24 $\pm$ 0,22	1,22 $\pm$ 0,25	1,43 $\pm$ 0,04
	2°	1,12 $\pm$ 0,19	0,90 $\pm$ 0,17	1,14 $\pm$ 0,02
	7°	1,08 $\pm$ 0,20	0,84 $\pm$ 0,33	1,31 $\pm$ 0,21
Úreia (mg/dl)	1°	44,00 $\pm$ 7,60	49,00 $\pm$ 10,03	54,16 $\pm$ 4,33
	2°	43,57 $\pm$ 7,51	55,50 $\pm$ 2,37	51,66 $\pm$ 5,11
	7°	41,85 $\pm$ 8,05	48,5 $\pm$ 10,35	58,00 $\pm$ 5,35
Creatinina (mg/dl)	1°	1,21 $\pm$ 0,20	1,28 $\pm$ 0,26	1,43 $\pm$ 0,10
	2°	1,13 $\pm$ 0,19	1,42 $\pm$ 0,08	1,29 $\pm$ 0,10
	7°	1,10 $\pm$ 0,19	0,75 $\pm$ 0,34	0,99 $\pm$ 0,31

AST = aspartato transaminase, ALT = alanina transaminase, ALP = fosfatase alcalina, GGT = gama glutamil transpeptidase, HDL = lipoproteína de alta densidade.

3.5 DISCUSSÃO

Os achados deste estudo mostraram que a ivermectina nas doses de 0,2 e 1,0 mg/kg, por via SC, não alterou nenhum dos parâmetros do sêmen de coelhos da raça Nova Zelândia, avaliados por até 60 dias após a administração.

Estudo realizado por Eman e El-Abdalla (2000) mostrou que em coelhos da raça Baladi, as avermectinas, ivermectina e moxidectina, quando administradas em doses terapêuticas (0,2 mg/kg), causaram efeitos adversos na fertilidade de machos. Os autores observaram que, 30 e 60 dias após a administração dessas avermectinas, houve diminuição na concentração de espermatozoides, na porcentagem de motilidade progressiva e no número de espermatozoides vivos. Comparando esse estudo com os resultados do presente trabalho, pode-se observar diferenças na raça dos coelhos e nas técnicas de coleta de espermatozoides. Eman e El-Abdalla (2000) coletaram os espermatozoides da cauda do epidídimo. Essa técnica, segundo Robaire e Viger (1995) e Cornwall (2009), permite a coleta de espermatozoides com motilidade progressiva. Contudo, a passagem dos espermatozoides ao longo do ducto epididimário é que determina a aquisição da capacidade fertilizante e da motilidade progressiva, sendo esse processo denominado maturação espermática (OLIVA; RINALDO; STUMPP, 2009). Além disso, a coleta de espermatozoides da cauda do epidídimo não permite que estes sejam coletados com o plasma seminal. Este fluído é rico em nutrientes, como proteínas e enzimas, e é fundamental para atestar a viabilidade dos espermatozoides (MORTON, 1988); portanto, a ausência de plasma seminal interfere na viabilidade espermática e, conseqüentemente, na motilidade progressiva (MORTON, 1988; FOOTE; CARNEY, 2000). Em contraste, no presente estudo empregou-se a técnica de coleta de sêmen por meio de uma vagina artificial, o que assegura a viabilidade espermática, uma vez que no sêmen os componentes indispensáveis para a motilidade progressiva dos espermatozoides estão presentes (CONSTANTINI, 1989; RODRIGUEZ, 1993; SINKOVICS; CENCI; DAL BOSCO, 1993). Assim, pode-se afirmar que as técnicas de coleta de espermatozoides são responsáveis pelas diferenças entre os trabalhos em relação aos resultados observados na motilidade progressiva dos espermatozoides de coelhos.

Em outro estudo que empregou a vagina artificial para coleta de sêmen, mas utilizando

outra espécie animal, corrobora parcialmente os presentes achados. Assim, Naoman (2012) observou que a administração de 0,2 mg/kg de ivermectina, por via SC, não prejudicou a motilidade espermática de carneiros sexualmente experientes. Contudo, o autor observou que nessa dose houve diminuição da concentração espermática, dos níveis de testosterona e alteração na morfologia espermática. Essas alterações não foram mais observadas cinco dias após a administração, o que pode estar associado com a meia-vida da ivermectina, que varia entre 5 a 7 dias (GUPTA, 2007; NAOMAN, 2012).

Prejuízos na motilidade espermática e no potencial de fertilização podem ocorrer devido a injúrias nas membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial dos espermatozoides, visto que a integridade dessas membranas garante, respectivamente, a capacidade e a viabilidade espermática, a fertilização e a motilidade espermática (CELEGHINI et al., 2010). Para tanto, a fim de avaliar os danos nessas membranas, no presente trabalho, empregaram-se sondas fluorescentes (PI, FITC-PSA e JC-1). Os resultados aqui obtidos mostram que a administração de 0,2 e 1,0 mg/kg de ivermectina não promoveu danos nas membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, corroborando o resultado de ausência de alteração na motilidade espermática, visto que danos nessas membranas podem prejudicar o potencial de fertilização.

Sabe-se que o peso dos testículos tem sido usado como um indicador quantitativo da normalidade dos testículos, devido à correlação entre o peso deste órgão e o número de células germinativas do epitélio seminífero (RUSSEL; MALONE; KARPAS, 1990). Em circunstâncias anormais são evidenciadas alterações no peso dos testículos, além de alterações histopatológicas nas células germinativas do epitélio seminífero (MEISTRICH, 1982; HIKIM et al., 1989; KOTULA-BALAC et al., 2011). Os resultados do presente trabalho não revelaram alterações no peso relativo dos testículos e das glândulas sexuais acessórias, nem no IGS, bem como não revelaram alterações histopatológicas nos órgãos sexuais. Vale ressaltar que as glândulas sexuais acessórias, como a próstata e a vesícula seminal, respondem de maneira diferente aos hormônios sexuais masculinos e femininos, e os pesos desses órgãos são bioindicadores dos níveis circulantes desses hormônios (FOOTE et al., 1977). A ausência de alterações nos níveis de testosterona de coelhos tratados com ivermectina e avaliados por até 60 dias corroboram as evidências que indicam que essa droga não perturbou a função

testicular, isto é, a produção e transporte de espermatozoides, bem como a produção de testosterona.

Por outro lado, El-Far (2013) investigou os efeitos da ivermectina, nas doses de 0,5 e 1,0 mg/kg (SC), sobre os níveis de testosterona e sobre os parâmetros bioquímicos séricos em coelhos machos, da raça Nova Zelândia, nos dias 1, 3 e 7 após administração. Esse autor observou aumento nos níveis séricos de testosterona e alterações nas funções hepática e renal nos três dias de avaliação. Nesse trabalho o autor não explicitou o método analítico empregado para avaliação da testosterona sérica e atribuiu as alterações nas funções hepática e renal a sobrecarga provocada pela droga nesses órgãos. A esse respeito, os resultados do presente estudo não revelaram alterações em nenhum dos parâmetros bioquímicos séricos, bem como nos parâmetros hematológicos em coelhos tratados com 0,2 e 1,0 mg/kg de ivermectina, avaliados nos dias 1, 2 e 7 após a administração. Ressalte-se que são escassos os achados na literatura sobre os efeitos da ivermectina em parâmetros bioquímicos séricos e hematológicos em coelhos; há apenas informações a esse respeito de parâmetros bioquímicos séricos, porém em exposição repetida à ivermectina em coelhos, causando alterações nesses parâmetros (AL-JASSIM et al., 2016).

Tomando todos os dados em conjunto, neste estudo temporal da administração de ivermectina em coelhos, nas doses de 0,2 e 1,0 mg/kg, por via SC, não foram observadas alterações nos parâmetros da fertilidade de machos, avaliada pela concentração, motilidade e morfologia de espermatozoides, e nem no potencial de fertilização, avaliado pela integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial dos espermatozoides. Acrescente-se, ainda, que a ivermectina mesmo na maior dose, não interferiu nos níveis séricos de testosterona, na bioquímica sérica e em parâmetros do hemograma.

3.6 CONCLUSÃO

A administração de ivermectina nas doses de 0,2 e 1,0 mg/kg, por via SC, em coelhos machos:

- Não promoveu prejuízo em nenhum dos parâmetros seminais de coelhos;
- Não interferiu na concentração sérica de testosterona;
- Não alterou o peso relativo dos órgãos sexuais, bem como não foram observadas alterações histopatológicas nos tecidos;
- Não alterou dos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos.

REFERÊNCIAS

- AL-JASSIM, K. B.; JAWAD, A. AD. H.; AL-MASOUDI, E. A.; MAJEED, S. K. Histopathological and biochemical effects of ivermectin on kidney functions, lung and the ameliorative effects of vitamin c in rabbits (*Lupus cuniculus*). **Basrah Journal of Veterinary Research**, v.14, p. 110-124,2016.
- ANDRADE, A. F. C.; YONEZAWA, L. A.; CELEGHINI, E. C. C.; SPERS, A.; ARRUDA, R. P. Um novo modelo de vagina artificial para coelhos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 201-204, 2002.
- ARRUDA, R. P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso demicroscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). 121 f. **Tese (Livre Docência)** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- BERNANDI, M. M.; KIRSTEN, T. B.; SPINOSA, H. S.; MANZANO, H. Ivermectin impairs sexual behavior in sexually naïve, but not sexually experienced male rats. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 77-81, 2011.
- BONDE, J. P. Male reproductive organs are at risk from environmental hazards. **Asian Journal of Andrology**, v.12, p.152-156, 2010.
- BORMANN, J. The “ABC” of the GABA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 21, p. 16-19, 2000.
- CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p. 289-299, 2004.
- CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; RODRIGUES, P. H. M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproductive Science**, v. 104, p. 119-131, 2008.
- CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 536-543, 2010.
- CONSTANTINI, F. F. A. Nel coniglio, sistemi de conservazione dello sperma. **Rivista di coniglicoltura**, v. 4, p. 14-18, 1989.
- CORNWALL, G. A. New insights into epididymal biology and function. **Human Reproduction Update**, v. 15, p. 213-227, 2009.

- CULLY, D.F.; VASSILATIS, D. K.; LIU, K. K.; PARESS, P. S.; VAN DER PLOEG, L. H.; SCHAEFFER, J. M.; ARENA, J. P. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 371, p. 707-711, 1994.
- DADARKAR, S. S.; DEORE, M. D.; GATNE, M. M. Comparative evaluation of acute toxicity of ivermectin by two methods after single subcutaneous administration in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 47, p. 257-260, 2007.
- EL-FAR, A. H. 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**, v. 8, p. 128-133, 2013.
- EL-SAWY, A. E. F.; EL-MADDAWY, Z. K.; SEED, S. A. Adverse Effects of Ivermectin in comparison with Rafoxanide on Male Rats. **Alexandria Journal of Veterinary Science**, v. 47, p. 119-128, 2015.
- EMAM, E. E.; EL-ABDALLA, O. Effects of ivermectin and moxidectin on fertility and some biochemical parameters in male rabbits. **Egyptian Journal of Agricultural Research**, v. 78, p. 293-301, 2000.
- FERRI, R.; TODON e SILVA, A. F. S.; CABRAL, D.; MOREIRA, N.; SPINOSA, H. S.; BERNARDI, M. M. Doramectin reduces sexual behavior and penile erection in male rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 39, p. 63-68, 2013.
- FOOTE, R. H.; DRADDY, P. J.; BREITE, M.; OLTENACU, E. A. B. Action of androgen and estrone implants on sexual behavior and reproductive organs of castrated male rabbits. **Hormones and Behavior**, v. 9, p. 57-68, 1977.
- FOOTE, R. H.; CARNEY, E. W. The rabbit as a model for reproductive and developmental toxicity studies. **Reproductive Toxicology**, v. 14, p. 477-493, 2000.
- GEARY, T. G. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. **Trends in Parasitology**, v. 21 n. 11, p. 530-532, 2005.
- GOTARDO, A. T.; PAVANELLI, E. L.; CARVALHO, H. F.; LEMES, K. M.; ARRUDA, R. P.; KEMPINAS, W. G.; GÓRNIK, S. L. Endocrine disrupter action in ruminants: A study of the effects of *Ipomoea carnea* in adult male goats. **Small Ruminant Research**, v. 19, p. 81-87, 2014.
- GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 239-247, 2001.
- GUPTA, R. C. Ivermectin and selamectin. In: GUPTA, R. C. **Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles**, San Diego: Academic Press Inc, p. 508-513, 2007.

- HE, X. B.; HU, J. H.; WU, Q.; YAN, Y. C.; KOIDE, S. S. Identification of GABA(B) receptor in rat testis and sperm. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 283, p. 243-247, 2001.
- HE, X.; ZHANG, Y.; YAN, Y.; LI, Y.; KOIDE, S. S. Identification of GABABR2 in rat testis and sperm. **Journal of Reproduction and Development**, v. 49, p. 397-402, 2003.
- HIKIM, A. P. S.; AMADOR, A. G.; KLEMCKE, H. G.; BARTKE, A.; RUSSELL, L. D. Correlative morphology and endocrinology of Sertoli cells in hamster testes in active and inactive states of spermatogenesis. **Endocrinology**, v. 125, p. 1829-1843, 1989.
- JOHNSON, L.; PETTY, C. S.; NEAVES, W. B. A comparative study of daily sperm production and testicular composition in humans and rats. **Biology of Reproduction**, v. 22, p. 1233-1244, 1980.
- KOTULA-BALAK, M.; POCHEC, E.; HEJMEJ, A.; DUDA, M.; BILINNSKA, B. Octylphenol affects morphology and steroidogenesis in mouse tumor Leydig cells. **Toxicology in vitro**, v. 25, p. 1018-1026, 2011.
- LANKAS, G. R.; MINSKER, D. H.; ROBERTSON, R. T. Effects of ivermectin on reproduction and neonatal toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 27, p. 523-529, 1989.
- LI, S.; ZHANG, Y.; LIU, H.; YAN, Y.; LI, Y. Identification and expression of GABAC receptor in rat testis and spermatozoa. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 40, p. 761-767, 2008.
- MATOS, A. F. G.; MOREIRA, R. O.; GUEDES, E. P. Neuroendocrinology of the metabolic syndrome. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 47, p. 410-420, 2003.
- MCLACHLAN, R.I.; WREFORD, N.G.; O'DONNELL, L.; DE KRETZER, D.M.; ROBERTSON, D.M. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. **Journal of Endocrinology**, v. 148, p.1-9, 1996.
- MEISTRICH, M. Quantitative survival, sperm after correlation production between and testicular fertility stem in the cell mouse agents treatment with different cytotoxic. **Journal of Andrology**, v. 3, p. 58-68, 1982.
- MOREIRA, N.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Ivermectin reduces sexual behavior in female rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 43, p. 33-38, 2014.
- MOREIRA, N.; SANDINI, T. M.; REIS-SILVA, T. M.; NAVAS-SUÁREZ, P.; AUADA, A. V. V.; LEBRUN, I.; FLORIO, 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.

- MORTIMER, S. T. A critical review of physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v. 3, p. 403-439, 1997.
- MORTIMER, S. T. CASA - practical aspects. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 515-524, 2000.
- MORTON, D. The Use of Rabbits in Male Reproductive Toxicology. **Environmental Health Perspect**, v. 77, p. 5-9, 1988.
- MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. Sertoli-sertoli cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 25, p. 747-806, 2004.
- NAOMAN, U. D. Effect of ivermectin on semen characteristics of Iraqi Awassi ram. **Al-Anbar Journal of Veterinary Sciences**, v. 5, p. 129-133, 2012.
- O'DONNEL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 22, p. 289-318, 2001.
- O'DONNEL, M.; MCCLURE, M.; LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**, v. 17, p. 704-779, 2002.
- OLIVA, S. U.; RINALDO, P. A.; STUMPP, T. Biologia epididimária: maturação espermiática e expressão gênica. **O Mundo da Saúde**, v. 33, p.419-425, 2009.
- OMURA, S. Ivermectin: 25 years and still going strong. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 91-98, 2008.
- ÔURA, C.; TOSHIMORI, K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. **International Review of Cytology**, v. 122, p. 105-151, 1990.
- PONG, S. S.; WANG, C. C. Avermectin Bla modulation of yaminobutyric acid receptors in rat brain membranes. **Journal of Neurochemistry**, v. 38, p. 375-379, 1982.
- POUL, J. M. Effects of Perinatal Ivermectin Exposure on Behavioral Development of Rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 10, p. 267-272, 1988.
- PRESGRAVE, O. A. F. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 388, 2002.
- ROBAIRE, B.; VIGER, R. S. Regulation of epididymal epithelial cell functions. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 226-36, 1995.
- RODRIGUES-ALVES, P. S. B.; LEBRUN, I.; FLORIO, J. C.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Moxidectin interference on sexual behavior, penile erection and hypothalamic GABA levels of male rats. **Research in Veterinary Science**, v. 84, p. 100-

106, 2008.

RODRIGUES-ALVES, P. S. B.; FLORIO, J. C.; LEBRUN, I. BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Moxidectin Interference on Motor Activity of Rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 883-891, 2009.

RODRIGUEZ, R. M. Una vagina artificial para la extraccion de semen de conejo. **Revista Cubana de Reprodução Animal**, v. 17-18, p. 200-202, 1993.

RUSSEL, L.; ETTLIN, R.; HIKIN, A.; CLEGG, E. Histological and histopathological evaluation of the testis. **International Journal of Andrology**, v. 16, p. 83, 1990.

SARTOR, I. F.; SANTARÉM, V. A. Agentes empregados no controle de ectoparasitos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 599-608, 2017.

SHULMAN, L. M.; SPRITZER, M. D. Changes in the sexual behavior and testosterone levels of male rats in response to daily interactions with estrus females. **Physiology and Behavior**, v. 133, p. 08-13, 2014.

SINKOVICS, G.; CENCI, T.; DAL BOSCO, A. Un'idea per la f.a. Una nuova vagina artificiale per la raccolta igienica del seme di coniglio. **Rivista di coniglicoltura**, v. 9, p. 35-36, 1993.

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

SPINOSA, H. S.; GERENUTTI, M.; BERNARDI, M. M. Anxiolytic and anticonvulsant properties of doramectin in rats: behavioral and neurochemistic evaluations. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 127, p. 359-366, 2000.

SPINOSA, H. S.; STILCK, S. R.; BERNARDI, M. M. Possible anxiolytic effects of ivermectin in rats, **Veterinary Research Communications**, v. 26, p. 309-321, 2002.

TRAILOVIC, S. M.; IVANOVIC, S. R.; VARAGIĆ, V. M. Ivermectin effects on motor coordination and contractions of isolated rat diaphragm. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 426-433, 2011.

UHLIR, J.; VOLF, P. Ivermectin: its effect on the immune system of rabbits and rats infested with ectoparasitos. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 34, p. 325-336, 1992.

WONG, E. W..P.; CHEGN, C. Y. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.32, p. 290-299, 2011.

YATES, D. M.; PORTILLO, V.; WOLSTENHOLME, A. J. The avermectin receptors of *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans*. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 1183-1193, 2003.

4. Conclusão Geral

4. CONCLUSÃO GERAL

Em ratos a administração de ivermectina nas doses de 0,2 e 1,0 mg/kg, por via SC, não foi capaz de promover alterações em parâmetros reprodutivos e hormonais de machos e fêmeas, exceto a maior dose de ivermectina que causou desorganizado das células do epitélio seminífero observado até 72 horas após a administração, achado esse sugestivo de prejuízo na espermatogênese e na espermiogênese de machos.

Em coelhos, machos, a ivermectina, nessas mesmas doses, não promoveu alterações nos parâmetros da fertilidade (concentração, motilidade e morfologia de espermatozoides), nem no potencial de fertilização (integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial dos espermatozoides), bem como nos níveis séricos de testosterona, na bioquímica sérica e em parâmetros do hemograma.

Esses resultados em conjunto são indicativos de que a ivermectina causa poucos efeitos prejudiciais em aspectos reprodutivos de ratos e coelhos.

Anexos

ANEXOS

ANEXO 1 - Representação esquemática do eixo Hipotálamo-Hipófise-Testículo.

Legenda: GnRH = Hormônio Liberador de Gonadotrofina; LH = Hormônio Luteinizante; FSH = Hormônio Folículo Estimulante; - retroalimentação negativa; + retroalimentação positiva.

Fonte: (MOREIRA, 2018)

ANEXO 2 - Representação esquemática das etapas de produção de progesterona, estradiol e testosterona na via esteroidogênica.

Legenda: StAR = proteína reguladora esteroidogênica aguda; P450scc = enzima citocromo P450, enzima de clivagem de cadeia lateral; 3β-HSD = 3β-hidroesteroide desidrogenase; 17β-HSD = 17β hidroesteroide desidrogenase; CYP = enzima citocromo específica.

Fonte: (MOREIRA, 2018)

ANEXO 3 - Resultados parciais publicados na *Research in Veterinary Science*

Research in Veterinary Science 117 (2018) 178–186

Contents lists available at ScienceDirect

Research in Veterinary Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rvsc

Ivermectin acute administration impaired the spermatogenesis and spermiogenesis of adult rats

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

^a Graduate Program of Environmental and Experimental Pathology, Paulista University, Rua Dr. Bacelar, 1212, 04026-002 São Paulo, SP, Brazil^b Graduate Program of Experimental and Comparative Pathology, Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, São Paulo, SP 05508-270, Brazil^c Pesticide Residues Laboratory, Biological Institute, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, São Paulo, SP 04014-002, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Avermectin
Testosterone levels
LC-MS/MS
Histological examination
Morphometry
Immunohistochemistry

ABSTRACT

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

1. Introduction

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

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

Data about IVM on reproductive parameters are controversial.

* Corresponding author.

E-mail address: maria.bernardi@docente.unip.br (M.M. Bernardi).<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.12.013>Received 28 September 2017; Received in revised form 24 November 2017; Accepted 16 December 2017
0034-5288/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

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

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

2. Material and methods

2.1. Animals

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

2.2. Drugs

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

2.3. Groups and treatments

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

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

2.4. Procedures

2.4.1. Testicular weight and testis volume

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

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

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

2.4.2. Histological examination

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

2.4.3. Morphometric examination

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

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

2.4.4. Testosterone levels

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

2.4.5. IVM serum levels

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

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

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

2.4.6. GFAP immunohistochemistry

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

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

2.5. Statistical methods

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

3. Results

3.1. Testicular weight and testis total volume

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

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

3.2. Histological examination

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

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

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

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

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

3.3. Morphometric examination

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

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

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

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

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

3.4. Testosterone levels

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

3.5. IVM serum levels

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

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

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

3.6. GFAP immunohistochemistry

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

4. Discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Table 1

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

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

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

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

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

5. Conclusion

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

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

Table 2

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

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

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

Acknowledgements

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

References

Committee, 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Eighth Edition. <http://dx.doi.org/10.2307/1525495>.

- Almeida, M., Ayres, M., Santarem, V., Lambert, S., 2017. A. Agentes empregados no controle de ectoparasitos. In: Spinoza, H.S., Górniak, S.L., Bernardi, M.M. (Eds.), *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 567–583 (in: Spinoza, H., Górniak, S., Bernardi, M. (Eds.), *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 553–576).
- Ben-Ari, Y., 2002. Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 728–739. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn920>.
- Bernardi, M.M., Kirsten, T.B., Spinoza, H.S., Manzano, H., 2011. Ivermectin impairs sexual behavior in sexually naive, but not sexually experienced male rats. *Res. Vet. Sci.* 91, 77–81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.07.026>.
- Bloomquist, J.R., 2003. Chloride channels as tools for developing selective insecticides. In: *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, pp. 145–156. <http://dx.doi.org/10.1002/arch.10112>.
- Botelho Cabral, M.G., Hayashi, H., Miraglia, S.M., 1997. Histomorphometry of sexually immature albino rat testis after X ray-irradiation. *Interciencia* 22, 71–80.
- Campbell, W.C., 2016. Ivermectin: a reflection on simplicity (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201601492>.
- Casida, J.E., Durkin, K.A., 2013. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 99–117. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153645>.
- Chatton, J.Y., Pellerin, L., Magistretti, P.J., 2003. GABA uptake into astrocytes is not associated with significant metabolic cost: implications for brain imaging of inhibitory transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 12456–12461. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2132096100>.
- Cordeiro, F., 2000. Efeito da Cisplatina sobre a morfologia de testículos de ratos albinos tratados na fase intra-uterina. Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).
- Creasy, D.M., 1997. Review article: evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: the appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicol. Pathol.* 25, 119–131. <http://dx.doi.org/10.1177/019262339702500201>.
- Dadgar, S.S., Deore, M.D., Gatne, M.M., 2007. Comparative evaluation of acute toxicity of ivermectin by two methods after single subcutaneous administration in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 47, 257–260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2006.10.009>.
- Dawson, G.R., Wafford, K.A., Smith, A., Marshall, G.R., Bayley, P.J., Schaeffer, J.M., Meinke, P.T., McKernan, R.M., 2000. Anticonvulsant and adverse effects of ivermectin analogs in mice are mediated through the gamma-aminobutyric acid(A) receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295, 1051–1060.
- Decavel, C., Van Den Pol, A.N., 1990. GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 302, 1019–1037. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.903020423>.
- Du, Y., Du, Z., Zheng, H., Wang, D., Li, S., Yan, Y., Li, Y., 2013. GABA exists as a negative regulator of cell proliferation in spermatogenic stem cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 18, 1–14. <http://dx.doi.org/10.2478/s11658-013-0081-4>.
- El-Far, A.H., 2013. Effect of therapeutic and double therapeutic doses of ivermectin on oxidative status and reproductive hormones in male rabbits. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* 8, 128–133. <http://dx.doi.org/10.3844/ajavsp.2013.128.133>.
- Elgart, G.W., Meinking, T.L., 2003. Ivermectin. *Dermatol. Clin.* [http://dx.doi.org/10.1016/S0733-8635\(02\)00095-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0733-8635(02)00095-5).
- El-Nahas, A.F., El-Ashawy, I.M., 2008. Effect of ivermectin on male fertility and its interaction with P-glycoprotein inhibitor (verapamil) in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 26, 206–211. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2008.03.011>.
- El-Sawy, A., El-Maddawy, Zk, El-Sawy, A., 2015. Adverse effects of Ivermectin in comparison with Rafoxanide on male rats. *Alexandria J. Vet. Sci.* 47, 119–128.
- Erdo, S.L., Nemet, L., Szporny, L., 1983. The occurrence of GABA in vas deferens, prostate, epididymis, seminal vesicle and testicle of the rat. *Acta Biol. Hung.* 34, 435–437.
- Estrada-Mondragon, A., Lynch, J.W., 2015. Functional characterization of ivermectin binding sites in $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABA(A) receptors. *Front. Mol. Neurosci.* 8 (55). <http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2015.00055>.
- Fraser, D.D., Mudrick-Donnon, L.A., Macvicar, B.A., 1994. Astrocytic GABA receptors. *Glia* 11, 83–93. <http://dx.doi.org/10.1002/glia.440110203>.
- Freitas, F., Cordeiro-Mori, F., Sasso-Cerri, E., Lucas, S., MIRAGLIA, S.M., 2002. Alterations of spermatogenesis in etoposide-treated rats: a stereological study. *Interciencia* 27, 227–235.
- Frungieri, M., Gonzalez Galvar, S., Calandra, R., 1996. Influence of photoinhibition of GABA and glutamic acid levels, and on glutamate decarboxylase activity in the testis and epididymis of the golden hamster. *Int. J. Androl.* 19, 171–178. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2605.1996.tb00458.x>.
- Geigerseder, C., Doepner, R., Thalhammer, A., Frungieri, M.B., Gamel-Didelon, K., Calandra, R.S., Köhn, F.M., Mayerhofer, A., 2003. Evidence for a GABAergic system in rodent and human testis: local GABA production and GABA receptors. *Neuroendocrinology* 77, 314–323. <http://dx.doi.org/10.1159/000070897>.
- Gundersen, H.J.G., Bagger, P., Bendtsen, T.F., Evans, S.M., Korbo, L., Marcussen, N., Møller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., Sørensens, F.B., Vesterby, A., West, M.J., 1988. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96, 857–881 1988 Oct.
- Hauet, T., Yao, Z.-X., Bose, H.S., Wall, C.T., Han, Z., Li, W., Hales, D.B., Miller, W.L., Culty, M., Papadopoulos, V., 2005. Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into leydig cell mitochondria. *Mol. Endocrinol.* 19, 540–554. <http://dx.doi.org/10.1210/me.2004-0307>.
- He, X.B., Hu, J.H., Wu, Q., Yan, Y.C., Koide, S.S., 2001. Identification of GABA(B) receptor in rat testis and sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 243–247. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2001.4732>.
- He, X., Zhang, Y., Yan, Y., Li, Y., Koide, S.S., 2003. Identification of GABABR2 in rat testis and sperm. *J. Reprod. Dev.* 49, 397–402. <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.49.397>.
- Hikim, A.P.S., Amador, A.G., Klemcke, H.G., Bartke, A., Russell, L.D., 1989. Correlative

- morphology and endocrinology of Sertoli cells in hamster testes in active and inactive states of spermatogenesis. *Endocrinology* 125, 1829–1843.
- Joaquim, A., Coelho, C., Motta, P., Bondan, E., Teodorov, E., Martins, M., Kirsten, T., Casarin, R., Bonamin, L., MM, B., 2015. Transgenerational effects of a hypercaloric diet. *Reprod. Fertil. Dev.* <http://dx.doi.org/10.1071/RD15165>.
- Kaipia, A., Penttilä, T.L., Shimasaki, S., Ling, N., Parvinen, M., Toppari, J., 1992. Expression of inhibin-bA and Inhibin-bB, follistatin and Activin-A receptor messenger ribonucleic acids in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology* 131, 2703–2710.
- Kanbara, K., Okamoto, K., Nomura, S., Kaneko, T., Shigemoto, R., Azuma, H., Katsuoka, Y., Watanabe, M., 2005. Cellular localization of GABA and GABAB receptor subunit proteins during spermiogenesis in rat testis. *J. Androl.* 26, 485–493. <http://dx.doi.org/10.2164/jandrol.04185>.
- Kircik, L., Del Rosso, J., Layton, A., Schaubert, J., 2016. Over 25 years of clinical experience with Ivermectin: an overview of safety for an increasing number of indications. *J. Drugs Dermatol.* 15, 325–332.
- de Kretser, D.M., Loveland, K.L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., Wreford, N., 1998. Spermatogenesis. *Hum. Reprod.* 13 (Suppl. 1), 1–8.
- Li, S., Zhang, Y., Liu, H., Yan, Y., Li, Y., 2008. Identification and expression of GABAC receptor in rat testis and spermatozoa. *Acta Biochim. Biophys. Sin. Shanghai* 40, 761–767. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-7270.2008.00453.x>.
- Markwardt, S., Overstreet-Wadiche, L., 2008. GABAergic signalling to adult-generated neurons. *J. Physiol.* 586, 3745–3749. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2008.155713>.
- Meistrich, M., 1982. Quantitative survival, sperm after correlation production between and testicular fertility stem in the cell mouse agents treatment with different cytotoxic. *J. Androl.* 3, 58–68.
- Meistrich, M.L., 1986. Critical components of testicular function and sensitivity to disruption. *Biol. Reprod.* 34, 17–28.
- Miraglia, S.M., Hayashi, H., 1993. Histomorphometry of immature rat testis after heating. *J. Morphol.* 217, 65–74. <http://dx.doi.org/10.1002/jmor.1052170106>.
- Moreira, N., Bernardi, M.M., Spínosa, H.S., 2014. Ivermectin reduces sexual behavior in female rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 43C, 33–38.
- Moura, C., Guerra, M., Silva Júsilva, C., Caju, F., Alves, L., 2006. Avaliação histomorfométrica do parênquima testicular de ratos adultos tratados com diferentes doses de ivermectina. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 58, 799–808.
- Ramaswamy, S., Weinbauer, G.F., 2014. Endocrine control of spermatogenesis: role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis* 4, e996025. <http://dx.doi.org/10.1080/21565562.2014.996025>.
- Represa, A., Ben-Ari, Y., 2005. Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2005.03.010>.
- Ritta, M., Calandra, R., 1986. Occurrence of GABA in rat testis and its effect on androgen production. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 42, 291–297.
- Russell, L., Ettlin, R., Hikin, A., Clegg, E., 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. *Int. J. Androl.* 16. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2605.1993.tb01156.x>.
- Russell, L.D., Peterson, R.N., 1985. Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. *Int. Rev. Cytol.* 94, 177–211. [http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60397-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60397-6).
- Russell, L.D., Malone, J.P., Karpas, S.L., 1981. Morphological pattern elicited by agents affecting spermatogenesis by disruption of its hormonal stimulation. *Tissue Cell* 13, 369–380. [http://dx.doi.org/10.1016/0040-8166\(81\)90011-2](http://dx.doi.org/10.1016/0040-8166(81)90011-2).
- Shoop, W.L., Mrozik, H., Fisher, M.H., 1995. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Vet. Parasitol.* 59, 139–156. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)00743-V](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017(94)00743-V).
- Sofikitis, N., Giotitis, N., Tsounapi, P., Baltogiannis, D., Giannakis, D., Pardalidis, N., 2008. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 109, 323–330. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.03.004>.
- Soll, M., 1989. Use of ivermectin in laboratory and exotic mammals and in birds, fish, and reptiles. In: Campbell, W.C., William, C. (Eds.), *Ivermectin and Abamectin*, pp. 265 New York.
- Yoon, B.E., Woo, J., Lee, C.J., 2012. Astrocytes as GABA-ergic and GABA-receptive cells. *Neurochem. Res.* <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-012-0808-z>.
- Yoshida, M., Akane, A., 1999. Subzero-temperature liquid-liquid extraction of benzodiazepines for high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* 71, 1918–1921. <http://dx.doi.org/10.1021/ac981276g>.