

UNIVERSIDADE DE UBERABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E PRODUÇÃO ANIMAL NOS
TRÓPICOS (PPGSPAT) – MESTRADO
MARIA REJANE BORGES DE ARAÚJO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGENICO DA DORAMECTINA POR
MEIO DO TESTE DE DETECÇÃO DE CLONES DE TUMORES EPITELIAIS EM
Drosophila melanogaster

UBERABA – MG

2021

MARIA REJANE BORGES DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGENICO DA DORAMECTINA POR
MEIO DO TESTE DE DETECÇÃO DE CLONES DE TUMORES EPITELIAIS EM
*Drosophila melanogaster***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba (UNIUBE) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ian Martin

Coorientadora: Profa. Dra. Isabel Rodrigues Rosado

UBERABA – MG

2021

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

A15a Araújo, Maria Rejane Borges de.
Avaliação do potencial carcinogênico da Doramectina por meio do teste de detecção de clones de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster* / Maria Rejane Borges de Araújo. – Uberaba, 2021.
50 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação.

Orientador: Prof. Dr. Ian Martin.

Coorientadora: Profa. Dra. Isabel Rodrigues Rosado.

1. Farmacologia veterinária. 2. Drogas veterinárias. 3. Carcinogênese. 4. Toxicidade. I. Martin, Ian. II. Rosado, Isabel Rodrigues. III. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária. IV. Título.

CDD 636.08951

MARIA REJANE BORGES DE ARAÚJO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGENICO DA DORAMECTINA POR MEIO DO
TESTE DE DETECÇÃO DE CLONES DE TUMORES EPITELIAIS EM *Drosophila*
melanogaster

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Sanidade e
Produção Animal nos Trópicos do Programa de
Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal
nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Sanidade e Produção
Animal nos Trópicos

Aprovada em: 2/7/2021


BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Ian Martin - Orientador
Universidade de Uberaba



Profª. Drª. Joely Ferreira Figueiredo Bittar
Universidade de Uberaba



Profª. Drª. Priscila Capelari Orsolin
Centro Universitário de Patos de Minas

Dedico especialmente a Deus pelo milagre da capacidade cognitiva e aos meus eternos mestres inspiradores Bethânia Cristhine, Deusa Helena, José Maurício, Mariana Assunção e Rita de Cássia Weikert.

“Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores, para fazer melhor ainda”.

Mário Sérgio Cortella

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por permitir que esse momento acontecesse, por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades, e não foram poucas, por ser Ele o mestre dos mestres.

À Universidade de Uberaba, pela oportunidade de concretizar o sonho da pós-graduação *Stricto Sensu*.

Ao Centro Universitário de Patos de Minas, pela oportunidade de realizar os experimentos, inicialmente no Laboratório de Microbiologia e finalmente a concretização deste experimento no Laboratório de Citogenética e Mutagênese.

Ao orientador professor Dr. Ian Martin, pelo arremate da rifa! Digo acolhimento, orientação, correções, incentivo e confiança.

À professora coorientadora Dra. Isabel Rosado pela oportunidade, incentivo e apoio.

Ao coordenador da pós-graduação Dr. Endrigo pelo apoio.

Ao meu primeiro orientador, Dr. Álvaro Ferreira, que me iniciou no caminho da pesquisa em imunologia, bioquímica e bioinformática.

À ex aluna e estagiária do LabMicro, Bruna Silva, por me acompanhar e auxiliar nas coletas das amostras microbianas do segundo projeto no HVU-UNIUBE.

À ex aluna e colega de UNIPAM, Adriana, que juntas fomos pegadas de surpresa e nos vimos obrigadas a inverter nossas funções e mudar os conceitos a respeito das nossas capacidades! E também por participar na decisão do que eu poderia fazer no LABCIM, no momento de desespero, para não perder o investimento de dois anos na pós.

À ex aluna e colega de UNIPAM, Paula Marynella, pelo apoio e disponibilidade em auxiliar-me no novo caminho. Sem o teu auxílio ainda estaria na fase coleta de fêmeas! Quanta honra em vivenciar os papéis invertidos!

Aos colegas Mirley e Victor pelo apoio, dicas valiosas, pela empolgação com os resultados encontrados e direcionamentos na pesquisa, sem a ajuda de vocês este filho ainda estaria na fase embrionária.

Aos monitores do LABCIM, Victória e Tarcísio, que me auxiliaram digitalizando os resultados.

Agradeço a todos da equipe LABCIM que me acolheram e sempre têm contribuído para os novos investimentos em conhecimento científico. Vocês são o melhor legado que o Dr. Júlio Nepomuceno deixou para a comunidade científica.

Agradeço a todos os professores da UNIUBE que tive a oportunidade de conviver e me deleitar com o conhecimento.

Agradeço à Profa. Dra. Priscila Capelari Orsolin por aceitar o convite para integrar a banca examinadora e contribuir com seu esmerado conhecimento no teste de detecção de clones de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster*.

Agradeço à Profa. Dra. Joely Figueiredo Ferreira Bittar por aceitar o convite para integrar a banca examinadora e contribuir com seu brilhante conhecimento acadêmico.

Mais uma vez agradeço aos professores Dr. Endrigo, Dr. Ian e Dra. Isabel Rosado por me convencerem a encerrar esse ciclo da vida com a defesa final, uma vez que eu havia desistido do título de mestre.

Aos meus pais e irmão, pelo amor e acolhimento incondicional.

Meus agradecimentos aos amigos, aos companheiros de trabalho e de mestrado que fizeram parte da minha formação e que estarão presente na memória saudosista.

RESUMO

A doramectina (DORA) é um endectocida lactona macrocíclica de largo espectro do grupo das avermectinas, produzida por biossíntese mutacional da fermentação de *Streptomyces avermectilis*, diferindo da ivermectina pela substituição de um grupo ciclohexil na posição C25. Entre os diferentes modelos experimentais para estudo de toxicidade e carcinogênese de produtos químicos destaca-se *Drosophila melanogaster*. Considerando a dinâmica lipofílica da DORA e que o período de carência para consumo de produtos de origem animal nem sempre é respeitado, objetivou-se avaliar a toxicidade e atividade carcinogênica do medicamento de uso veterinário Dectomax[®] (doramectina 1%) por meio do teste de detecção de tumores epiteliais em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Para tanto, foram utilizadas larvas heterozigotas de 72 horas resultantes do cruzamento de fêmeas *wts/TM3, Sb¹* virgens e machos *mwh/mwh*, as quais foram alimentadas com meio de cultura contendo oito concentrações de DORA variando de $4,3 \times 10^{-7}$ a $5,56 \times 10^{-5}$ mM por 48 horas para obtenção da curva de toxicidade. Após a metamorfose determinou-se a curva de toxicidade e novas larvas heterozigotas foram expostas a cinco concentrações subletais cuja sobrevivência foi $\geq 70\%$. As concentrações variaram de $8,69 \times 10^{-7}$ a $1,39 \times 10^{-5}$ mM de DORA por 48 horas. Após, calculou-se a frequência de tumores em indivíduos heterozigotos marcados *mwh/wts*. Observamos que as duas maiores concentrações de DORA, $5,56 \times 10^{-5}$ e $2,78 \times 10^{-5}$ mM apresentaram toxicidade significativa ($p < 0,05$) na sobrevivência das larvas *Drosophila melanogaster*. Pressupõem-se que as larvas foram acometidas por paralisia flácida e impedidas de se movimentarem para o repasto, culminando em morte por inanição, uma vez que a substância atua sobre os canais dependentes de Cl⁻ controlados pelos neurotransmissores GABA e glutamato dos invertebrados, permitindo o influxo de Cl⁻ e hiperpolarização da membrana pós-sináptica. As cinco concentrações subletais $8,69 \times 10^{-7}$, $1,74 \times 10^{-6}$, $3,47 \times 10^{-6}$, $6,95 \times 10^{-6}$, $1,39 \times 10^{-5}$ mM induziram significativamente a formação de tumores epiteliais em *D. melanogaster* ($p < 0,05$), quando comparadas com o controle negativo. A carcinogênese pode ser explicada pelo fato da DORA ter alterado o gene supressor de tumor *wts* proporcionando a falha no reconhecimento ou impossibilitando a correção do defeito no DNA, ou encaminhamento para a apoptose. Então, reforça-se a necessidade de respeitar o período de carência para o consumo de produtos de origem animal.

Palavras-chave: Avermectinas. Carcinogênese. Discos imaginiais. Lactona macrocíclica. Toxicidade.

ABSTRACT

Assessment of the carcinogenic potential of doramectin through the detection test of clone epithelial tumor in *Drosophila melanogaster*

Doramectin (DORA) is a broad-spectrum macrocyclic lactone endectocide of the avermectin group, produced by mutational biosynthesis of *Streptomyces avermectilis* fermentation and differing of ivermectin by substitution of a cyclohexyl group at the C25 position. Among the different experimental models for the study of toxicity and carcinogenesis of chemicals products, draws attention *Drosophila melanogaster*. Considering the lipophilic dynamics of DORA and the grace period for consumption of animal products that is not always respected, the aim of the present study was to evaluate the toxicity and carcinogenic activity of the veterinary drug Dectomax® (doramectin 1%) by the test for detection of epithelial tumor in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. For that, it was used heterozygous 72-hour larvae, resulting from the crossing between *wts/TM3, Sb¹* virgin females and *mwh/mwh* males, which were fed with culture medium containing eight different concentrations of DORA ranging from 4.3×10^{-7} to 5.56×10^{-5} mM for 48 hours to obtain the toxicity curve. After metamorphosis, the toxicity curve was determined and another heterozygous larvae were exposed to five sublethal concentrations whose survival was $\geq 70\%$. The concentrations varied from 8.69×10^{-7} to 1.39×10^{-5} of DORA for 48 hours. After that, the frequency of tumors in heterozygotes marked *mwh/wts* were calculated. We observed that the two highest concentrations of DORA, 5.56×10^{-5} and 2.78×10^{-5} mM, showed significant toxicity ($P < 0.05$) on the survival of *Drosophila melanogaster* larvae. It is assumed that the larvae were affected by flaccid paralysis and were prevented from moving to the meal, culminating in death due to starvation, once the substance acts on the Cl^- dependent channels controlled by GABA and glutamate neurotransmitters in invertebrate allowing the influx of Cl^- and hyperpolarization of the post-synaptic membrane. The five sublethal concentrations 8.69×10^{-7} , 1.74×10^{-6} , 3.47×10^{-6} , 6.95×10^{-6} , 1.39×10^{-5} mM significantly induced epithelial tumor formation in *D. melanogaster* when compared to the negative control ($p < 0,05$). Carcinogenesis can be explained by the fact that DORA has altered the *wts* tumor suppressor gene, causing a failure in recognition or preventing the correction of the DNA defect, or referral to apoptosis. Therefore, the need to respect the grace period for the consumption of products of animal origin is reinforced.

Keywords: Avermectins. Carcinogenesis. Imaginal discs. Macrocyclic lactone. Toxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS

DORA	doramectina
C13	carbono treze
C17	carbono desessete
C28	carbono vinte e oito
C25	carbono vinte e cinco
GABA	ácido gama-aminobutírico
LM	lactona macrocíclica
ng/mol	nanograma por mol
Cl ⁻	cloro
°C	grau celsius
<i>wt</i>	gene de tumor epitelial em <i>Drosophila melanogaster</i>
<i>h-warts</i>	gene homólogo humano de tumor epitelial
LATS1	gene que codifica a enzima supressora de tumor quinase 1
6q24-25	cromossomo em que está localizado o gene LATS1
<i>TM3, Sb¹</i>	balanceador cromossômico
<i>bw</i>	linhagem de <i>D. melanogaster</i> de olhos castanhos
<i>flr³</i>	linhagem de <i>D. melanogaster</i> de pelos em chama
<i>mwh</i>	linhagem de <i>D. melanogaster</i> com marcador de múltiplos pelos curtos
<i>Dmel/NF1</i>	linhagem de <i>D. melanogaster</i> que expressa a proteína neurofibrina 1
<i>ORR</i>	linhagem de <i>D. melanogaster</i> de Oregon e resistente (com alta capacidade de bioativação)
<i>w</i>	linhagem de <i>D. melanogaster</i> de olhos brancos
ETT	epithelial tumor test
<i>mwh/mwh</i>	linhagem de <i>D. melanogaster</i> homozigota para o gene marcador de múltiplos pelos curtos
<i>mwh/wts</i>	linhagem de <i>D. melanogaster</i> heterozigota para o gene marcador de múltiplos pelos curtos e de tumor epitelial
<i>mwh/TM3, Sb¹</i>	linhagem de <i>D. melanogaster</i> heterozigota para o marcador de múltiplos pelos curtos e o balanceador cromossômico
LABCIM	Laboratório de Citogenética e Mutagênese

CAS	chemical abstract service
DXR	doxorubicina
tween	polissorbato
µg/mL	micrograma por mililitro
mL	mililitro
g	grama
mM	milimol
TX	toxicidade
C-	controle negativo
C+	controle positivo
µg/kg	micrograma por quilograma
P450	enzima do citocromo P450
DNA	ácido desoxirribonucleico
BAX	regulador apoptótico transcrito pelo gene p53
Bcl	death executioner Bcl-2 (regulador de morte celular programada)
Sf-9	linhagem de cultura de células do inseto <i>Spodoptera frugiperda</i>
ROS	espécie reativa de oxigênio
ThSB1	linhagem de cultura de células do inseto <i>Trichoplusia</i>
SMART	somatic mutation and recombination test

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência de tumor epitelial em descendentes heterozigotos para o gene supressor de tumor <i>wts</i> em <i>D. melanogaster</i> tratados com água de osmose reversa (controle negativo), DXR (controle positivo) e cinco concentrações crescentes de DORA.....	38
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química da molécula de DORA	19
Figura 2 -	Mecanismo de ação de antiparasitários. Em destaque LM (DORA). À esquerda ação antagonista sobre os canais de Cl ⁻ controlados pelo Glutamato. À direita ação moduladora sobre os canais de Cl ⁻ controlados por GABA.....	21
Figura 3 -	Esquema representando o ciclo de vida do inseto <i>D. melanogaster</i> indicando a duração em dias de cada estágio: embrião – um dia; larva de primeiro instar – um dia; larva de segundo instar – um dia; larva de terceiro instar – dois e meio a três dias; pupa - três e meio a quatro e meio dias.....	23
Figura 4 -	Relação dos discos imaginais da larva <i>D. melanogaster</i> com os respectivos órgãos parte da boca, placa frontal e lábio superior, antena, olho, perna, asa, halter, genitália do imago.....	24
Figura 5 -	Linhagem F1 do cruzamento de fêmea <i>wts/TM3, Sb¹</i> e macho <i>mwh/mwh</i> de <i>D. melanogaster</i> . Mosca a esquerda macho trans-heterozigota marcada de pelo longo e fino (<i>mwh/wts</i>). Mosca a direita fêmea heterozigota balanceada de pelo curto e grosso (<i>mwh/TM3, sb¹</i>).....	26
Figura 6 -	Evidência de formação tumoral em adultos da linhagem F1(<i>mwh/wts</i>) do cruzamento de fêmea <i>wts/TM3, Sb¹</i> e macho <i>mwh/mwh</i> de <i>D. melanogaster</i> apontada pelas setas. Cabeça (A), asa (B), tórax (C) e membro anterior (D).....	27
Figura 7 -	A: frascos de manutenção de estoque de linhagens na incubadora com fotoperíodo. B: frascos de acasalamento das linhagens parentais <i>wts/TM3, Sb¹</i> e <i>mwh/mwh</i> . C: frascos de postura).....	29

Figura 8 -	Escalonamento temporal do tratamento crônico de larvas da linhagem F1 do cruzamento de fêmea <i>wts/TM3, Sb^l</i> e macho <i>mwh/mwh</i> de <i>D. melanogaster</i> . Observa-se 24 h após postura o estágio larval I, após 48 h o estágio larval II, após 72 h o estágio larval III que entra em contato com as substâncias do tratamento por 48 h (azul) até completar 120 h quando empupa e metamorfoseia-se em adulto após três a quatro dias.....	30
Figura 9 -	A: mosca fêmea trans-heterozigota marcada de pelo longo e fino (<i>mwh/wts</i>). B: mosca macho heterozigota balanceada de pelo curto e grosso (<i>mwh/TM3, sb^l</i>).....	33
Figura 10 -	Curva de sobrevivência de larvas de <i>D. melanogaster</i> expostas cronicamente a 8 concentrações crescentes de DORA e do controle negativo (C-) (água) aplicando o teste Qui-quadrado com nível de significância 5%. *Concentrações que afetaram significativamente ($p < 0,05$) a sobrevivência das larvas quando comparadas com o controle negativo. **Maior concentração que não afetou significativamente ($p > 0,05$) a sobrevivência das larvas quando comparada com o controle negativo.....	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 DORAMECTINA.....	19
2.2 <i>Drosophila melanogaster</i>	23
2.3 TESTE PARA DETECÇÃO DE TUMORES EPITELIAIS EM <i>Drosophila melanogaster</i> – <i>EPITHELIAL TUMOR TEST</i> (ETT).....	25
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	29
4.2 LINHAGENS E CRUZAMENTO DE <i>Drosophila melanogaster</i>	29
4.3 AGENTES QUÍMICOS EMPREGADOS NO EXPERIMENTO.....	30
4.4 TESTE DE TOXICIDADE (ETT) EM <i>Drosophila melanogaster</i>	31
4.5 <i>EPITHELIAL TUMOR TEST</i> (ETT) – TESTE PARA DETECÇÃO DE TUMORES EPITELIAIS EM <i>Drosophila melanogaster</i>	32
4.6 COLETA DE MOSCAS E ANÁLISE DE TUMORES EPITELIAIS.....	32
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 TOXICIDADE DE DORA NA SOBREVIVÊNCIA DE <i>Drosophila melanogaster</i>	35
5.2 EFEITO CARCINOGENÉTICO DA DORA.....	36
6 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

A impulsão da atividade pecuária e a eficiência da produção de alimentos decorre dos avanços no melhoramento genético, na nutrição e sanidade animal. Entre os produtos indispensáveis para manutenção da sanidade animal destacam-se os antiparasitários, em especial os derivados de lactonas macrocíclicas (LM).

As LM foram descobertas no final da década de 1970 e são classificadas em avermectinas e milbemicinas, apresentando ação endocida e ectocida. As avermectinas incluem abamectina, doramectina (DORA), eprinomectina, ivermectina e selamectina, as quais apresentam amplo espectro de ação contra uma extensa variedade de nematódeos e artrópodes (BURG *et al.*, 1979). A estrutura básica das avermectinas é um anel de lactona de 16 membros aos quais são adicionados três grupos substituintes principais: um grupo hexahidrobenzofurano, um grupo dissacarídeo em C13 e um anel espirocetal (C17 a C28) (McKELLAR, BENCHAOUI, 1996; ALMEIDA *et al.*, 2018).

As milbemicinas incluem a milbemicina e moxidectina com atividade semelhante às avermectinas, no entanto diferem das avermectinas pela ausência de um grupo dissacarídeo no C13 do anel lactâmico. Quanto ao modo de produção das LM, a ivermectina e a moxidectina são classificadas em semissintéticos e a DORA em biossintética (McKELLAR; BENCHAOUI, 1996; TAYLORL; COOP; WALL, 2017).

As LM são altamente lipofílicas e são armazenadas em tecido adiposo, a partir do qual são liberadas paulatinamente, metabolizadas e excretadas. Essas características contribuem para a longa meia-vida destes compostos, mas também determina os teores de resíduos na carne e no leite e respectivos períodos de carência obrigatórios após o tratamento. Com exceção da eprinomectina, que não requer período de carência para o consumo de leite, o tratamento com esta classe de compostos não pode ser realizado em vacas lactantes ou nos últimos dois meses de gestação (TAYLORL; COOP; WALL, 2017; ALMEIDA *et al.*, 2018).

No entanto, o uso dessas substâncias em subdoses ou superdoses, ou o não atendimento ao período de carência promovem diversas situações indesejadas, entre elas, ineficácia do tratamento, multirresistência, contaminação ambiental, intoxicação animal e resíduos nos produtos de origem animal terrestres e aquáticos que são comercializados para a alimentação. Investigações científicas sugerem que a ingestão de alimentos contaminados com resíduos pode desencadear reações alérgicas, alterações neurotóxicas, efeitos teratogênicos e carcinogênicos, além de possibilitar o desenvolvimento de resistência parasitária aos

medicamentos (QU *et al.*, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2018; CARLSSON *et al.*, 2018; TÜRKAN; HUYUT; ATALAR, 2018).

Atualmente a investigação da atividade genética de diversas moléculas naturais e xenobióticas se dão em diferentes modelos experimentais, como cultura celular; bactéria (*Salmonella Typhimurium*); mamífero, *Rattus norvegicus* (camundongo); peixe, *Danio rerio* (peixe-zebra); inseto, *Drosophila melanogaster*; vegetal, *Tradescantia* (COSTA; OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2011; MOLINARI *et al.*, 2013; CARLSSON *et al.*, 2018; HONMA *et al.*, 2019; SOUSA *et al.*, 2019).

O inseto *D. melanogaster* é considerado pela comunidade científica um modelo experimental versátil. Muitos órgãos de *D. melanogaster* são funcionalmente análogos aos vertebrados, incluindo humanos, devido a presença de genes evolutivamente conservados, os quais tendem a ter funções moleculares semelhantes. Embora seres humanos e moscas sejam substancialmente diferentes quanto às características morfológicas e celulares, muitos mecanismos bioquímicos e moleculares que direcionam o desenvolvimento e impulsionam os processos celulares e fisiológicos são conservados entre os dois organismos (UGUR; CHEN; BELLEN, 2016; MILLET-BOUREIMA; MARROQUIN; GAMBERI, 2018).

Soma-se aos atributos do inseto o fato de os experimentos com *D. melanogaster* serem expressivamente fáceis, breves e de baixo custo, quando comparados àqueles realizados em camundongos, os quais são os principais modelos experimentais adotados visando a correlação com mamíferos (PANDEY; NICHOLS, 2011).

Diante do fato de substâncias medicamentosas não atuarem exclusivamente sobre as células, órgãos ou indivíduos alvos, mas também sobre aquilo que não é intuito do medicamento, causando alterações fisiológicas indesejadas, recentemente diversos pesquisadores têm investido em estudos sobre substâncias medicamentosas com atividade carcinogênica no modelo experimental *D. melanogaster* (CUNHA; NEPOMUCENO, 2011; ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2012; LOPES *et al.*, 2015; SATURNINO *et al.*, 2017). Muitas propriedades biológicas, fisiológicas e neurológicas básicas são conservadas entre mamíferos e *D. melanogaster*, e acredita-se que quase 75% dos genes que causam doenças humanas tenham um homólogo funcional no inseto (PANDEY; NICHOLS, 2011).

Aspectos carcinogênicos da DORA foram avaliados em cultura celular (GAO *et al.*, 2010; ANCHORDOQUY *et al.*, 2019) e, portanto, não retratam todas as variáveis metabólicas de um animal exposto à substância.

Organismos vivos são metabolicamente mais complexos que células isoladas em meios de cultura em condições ambientais controladas, as quais não sofrem consequências da interação célula/órgão e estresse advindo de intempéries ambientais. Para ampliar o entendimento sobre o efeito tóxico e o potencial carcinogênico da DORA torna-se fundamental estudo em modelo experimental como *D. melanogaster*, o qual permite avaliar a frequência de tumores expondo-o a diferentes concentrações da substância. Neste estudo hipotetiza-se que a DORA apresenta toxicidade e atividade carcinogênica em modelo experimental *D. melanogaster*. Portanto, o presente estudo objetivou avaliar a toxicidade e o potencial carcinogênico da DORA por meio do teste de detecção de tumores epiteliais em *D. melanogaster*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DORAMECTINA

A doramectina (CHC-B1), 25-ciclohexil-5-O-desmetil-25-de (1-metilpropil) avermectina A_{1a} é uma avermectina produzida por biossíntese mutacional da fermentação da bactéria *Streptomyces avermectilis* aveC (STUTZMAN-ENGWALL *et al.*, 2005). É um endectocida LM de largo espectro como a ivermectina, diferindo pela substituição de um grupo lipofílico ciclohexil na posição C25 (Figura 1) (BURG *et al.*, 1979; GOUDIE *et al.*, 1993; GAO *et al.*, 2010). Caracteriza-se em um pó de tonalidade branco a marrom de fórmula molecular C₅₀H₇₄O₁₄ e peso molecular 899,14 g/mol (PUBCHEM, 2020). Constitui-se produto altamente lipofílico, pouco solúvel em água, mas facilmente solúvel em solventes orgânicos (MCKELLAR; BENCHAOUI, 1996).

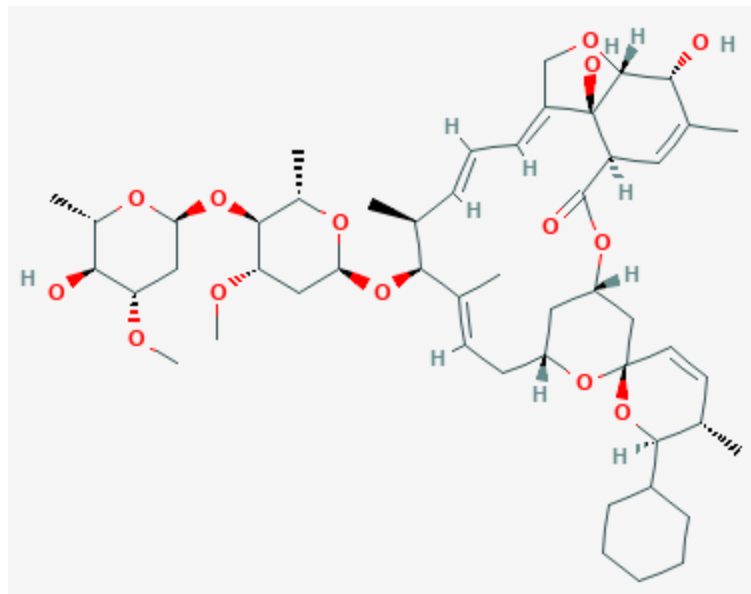


Figura 1- Estrutura química da molécula de DORA. **Fonte:** PUBCHEM. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doramectin>.

O produto comercial é uma solução de DORA a 1% em um veículo não aquoso de óleo de gergelim e oleato de etila (WICKS; KAYE; WAETHERLEY, 1993). A DORA é aprovada para uso na medicina veterinária para controle de endoparasitas e ectoparasitas nos animais de produção suínos e ruminantes (GOUDIE *et al.*, 1993); embora foi avaliada para controle de ectoparasitas em animais domésticos (HUTT; PRIOR; SHIPSTONE, 2015; CORDERO; QUEK; MULLER, 2017; PEREGO *et al.*, 2019) e lançado como comprimido para

controle e prevenção de carrapatos em cães pela União Química em 2020 (AGNER UNIÃO, 2020).

A DORA é pouco hidrossolúvel e apresenta meia-vida de absorção de 56,4 horas e concentração plasmática máxima ao sexto dia (LANUSSE *et al.*, 1997). Sendo que as concentrações acima de 1 ng/g no plasma podem ser detectadas até 38 dias após a aplicação e excretada em altas concentrações na bile e fezes aos 58 dias (LIFSCHITZ *et al.*, 2000), além de traços serem detectados no plasma aos 70 dias após aplicação (LANUSSE *et al.*, 1997). Quishpe e Bravo (2018) alegaram que diferentemente das outras avermectinas, a DORA se concentra em maior quantidade na luz intestinal e, o seu efeito residual é de até 30 dias em relação às doses recomendadas. Apesar de maior segurança clínica, ela pode ser tóxica aos animais e ao homem.

A toxicidade pode ocorrer em altas doses e em raças nas quais drogas semelhantes à ivermectina atravessam a barreira hematoencefálica. A toxicidade é neurotóxica e os sinais incluem depressão, ataxia, visão prejudicada, coma e morte. A sensibilidade às drogas do tipo ivermectina pode ser causada por mutação na barreira hematoencefálica com deficiência da glicoproteína P (PAPICH, 2016). Apresenta toxicidade alta para os organismos aquáticos de vida longa (MOSCHOU; DASENAKI; THOMAIDIS, 2019).

O material pode ser irritante para as membranas mucosas e para o trato respiratório superior. Pode ser nocivo por inalação ou absorção da pele. Pode causar irritação nos olhos, pele ou sistema respiratório e danos a lactentes. Os sinais clínicos incluem desidratação, bradicardia, depressão respiratória, cianose, midríase e um reflexo de vômito diminuído, além de ataxia ou tremores, hipersalivação, coma e morte (PUBCHEM, 2020).

As LM, como ivermectina e DORA, são moléculas neurotóxicas para os parasitas porque atuam potencializando os canais iônicos de cloro (Cl^-) controlados pelo glutamato pelo ácido gama-aminobutírico (GABA) (BOOTH; MCDONALD, 2013; PAPICH, 2016; PUBCHEM, 2020).

Como os mamíferos não possuem canais de Cl^- dependentes do glutamato, e estas moléculas possuem uma menor afinidade por outros canais de cloreto de mamíferos, normalmente estes não são afetados. Outra característica importante dessas moléculas, que confere margem de segurança na dose recomendada em mamíferos, é o fato de possuírem alto peso molecular, por isso, não penetram a barreira hematoencefálica e, assim os canais controlados pelo GABA no sistema nervoso central dos mamíferos não são acometidos. Por

consequente, as concentrações plasmáticas são mais prolongadas e mais sustentadas (WOLSTENHOLME; ROGERS, 2005; PAPICH, 2016; PUBCHEM, 2020).

A ativação dos canais de Cl⁻ leva ao aumento na permeabilidade do ânion de Cl⁻ que resulta em um potencial de membrana alterado e isso causa a inibição da atividade elétrica no nervo alvo ou na célula muscular. As moléculas atuam na fenda sináptica, ligando-se aos canais de Cl⁻ da membrana pós sináptica. Com isto ocorre hiperpolarização do neurônio pós sináptico. A ação é mantida devido à recaptação da substância pelo neurônio pré-sináptico. Estes eventos levam à paralisia flácida e morte do parasita (BOOTH; MCDONALD, 2013; PAPICH, 2016; PUBCHEM, 2020) (Figura 2).

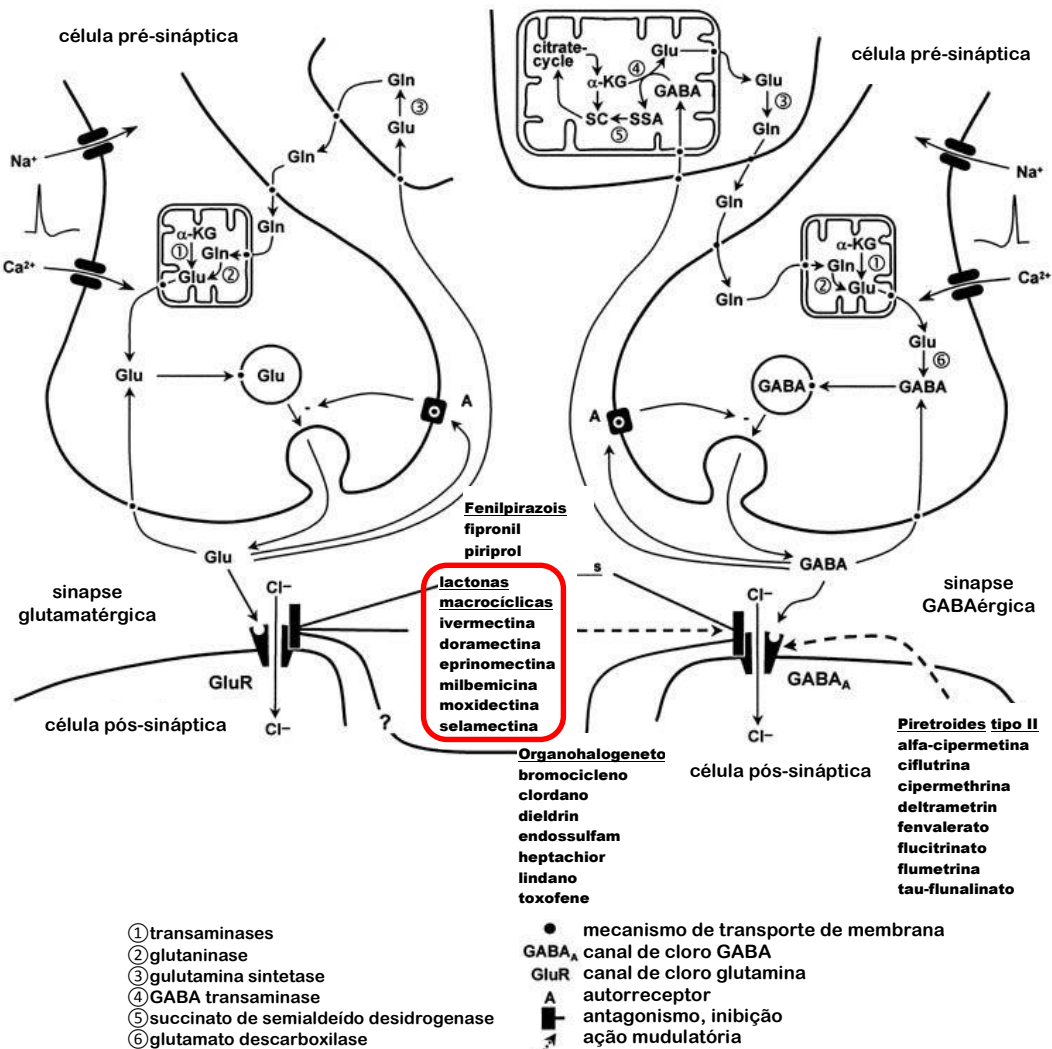


Figura 2 - Mecanismo de ação de antiparasitários. Em destaque LM (DORA). À esquerda ação antagonista sobre os canais de Cl⁻ controlados pelo Glutamato. À direita ação moduladora sobre os canais de Cl⁻ controlados por GABA. **Fonte:** Adaptado de TURBERG, 2015.

No entanto, o uso indiscriminado de LM, como a DORA, pode resultar na presença de resíduos no leite e produtos lácteos como queijo e manteiga, devido às suas propriedades lipofílicas e estabilidade térmica (CERKVENIK-FLAJS *et al.*, 2010; MACEDO *et al.*, 2015a,b; CHEIBUB; LYRA; PEREIRA NETTO, 2019). As avermectinas, entre elas a DORA, também apresentam atividade residual em tecido e órgão animal, incluindo produtos aquáticos (RÚBIES *et al.*, 2015; PIMENTEL-TRAPERO *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017; RIZZETTI *et al.*, 2018; MOSCHOU; DASENAKI; THOMAIDIS, 2019; NI *et al.*, 2019). Pesquisas advertem sobre efeitos indesejados da DORA sobre a fisiologia de mamíferos, incluindo efeito sobre a anidrase carbônica (KOSE *et al.*, 2016; CAGLAYAN; GULCIN, 2017), glutathione-S-transferase (TÜRKAN; HUYUT; ATALAR, 2018) e efeito citotóxico e genotóxico (ANCHORDOQUY *et al.*, 2019).

Estudos evidenciaram efeito inibitório de DORA sobre a anidrase carbônica em eritrócitos bovinos e fígado de cabra. A anidrase carbônica é uma metaloenzima contendo zinco que catalisa a hidratação reversível do dióxido de carbono para produzir prótons (H^+) e bicarbonato (HCO_3^-) (KOSE *et al.*, 2016; CAGLAYAN; GULCIN, 2017), portanto a DORA pode interferir indiretamente na regulação do pH sanguíneo. Outros estudos registraram atividade inibitória das avermectinas, incluindo DORA, sobre a enzima glutathione-S-transferase humana. Enzima esta encontrada no tecido hepático com atividade multifuncional e papel primordial na via metabólica de desintoxicação (TÜRKAN; HUYUT; ATALAR, 2018).

Corroborando com a informação de toxicidade, pesquisadores argentinos registraram efeito citotóxico e genotóxico de DORA sobre linfócitos periféricos e células do *cumulus oophorus* de bovinos em teste *in vitro*. Os resultados obtidos em linfócitos periféricos demonstraram que DORA foi capaz de induzir efeito citotóxico, danos ao DNA e aumentou a frequência de micronúcleos (MNI) e botões nucleares nas três concentrações testadas 20, 40 e 60 ng/mL^{-1} . As duas concentrações de DORA 20 e 40 mg/mL^{-1} aumentaram significativamente a frequência de formação de micronúcleos em células *cumulus oophorus* (ANCHORDOQUY *et al.*, 2019).

Portanto, são necessários novos estudos com a DORA utilizando diferentes métodos e técnicas em organismos testes, como *Drosophila*, com a finalidade de avaliar a atividade carcinogênica, mutagênica e recombinogênica da DORA e corroborar com a literatura científica.

2.2 *Drosophila melanogaster*

A *Drosophila melanogaster*, conhecida como mosca-da-banana ou mosca-do-vinagre, é um inseto da ordem díptera e apresenta um par de cromossomo sexual e três pares de cromossomos autossômicos. Habita ambientes próximos a frutas e legumes e é um bom modelo de estudo utilizado em pesquisas científicas abordando genética evolutiva, molecular e toxicologia desde o início do século XX (ROCHA; ALVES; ORSOLIN, 2015).

Por ser um inseto holometábolo, a *D. melanogaster* apresenta ciclo de vida que compreende a fase de ovo, larva, pupa e adulto ou imago. As fêmeas depositam aproximadamente 100 ovos por dia e o desenvolvimento embrionário é curto, apenas 24 horas. O estágio larval de primeiro instar inicia sua alimentação na superfície do substrato, enquanto o segundo e terceiro instar se alimentam escavando o substrato; após, migram para superfície seca para empupar e, em três a quatro dias, já se torna o imago (Figura 3) (AMORETTY *et al.*, 2013).

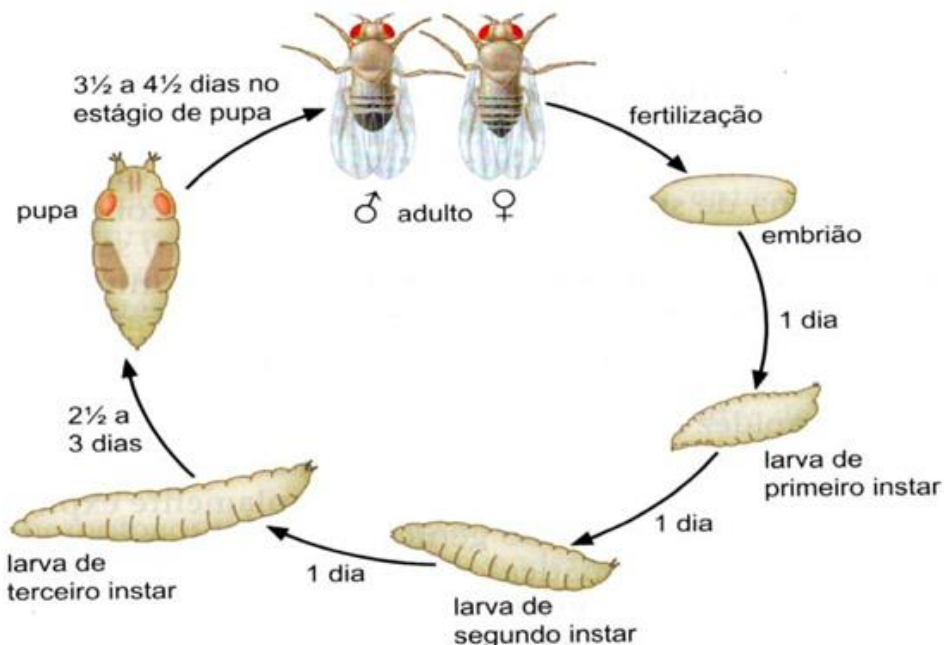


Figura 3 – Esquema representando o ciclo de vida do inseto *D. melanogaster* indicando a duração em dias de cada estágio: embrião – um dia; larva de primeiro instar – um dia; larva de segundo instar – um dia; larva de terceiro instar – dois e meio a três dias; pupa - três e meio a quatro e meio dias. **Fonte:** Watson *et al.*, 2015.

Diversas são as vantagens de se trabalhar com a *D. melanogaster* como modelo experimental. Destaca-se que os meios de cultura são baratos e permitem a criação de um grande número de indivíduos utilizando instalações simples; o ciclo de vida é relativamente

Levando-se em consideração que a *D. melanogaster* constitui um modelo experimental versátil, um grupo de pesquisadores da Universidade da Califórnia (EUA), em meados da década de 90, caracterizou um novo gene supressor de tumor, *wts*, acróstico derivado de verruga em inglês. Os estudos evidenciaram que o gene é importante no controle do crescimento, da proliferação e da forma celular (JUSTICE *et al.*, 1995).

No ano de 1999, Nishiyama e colaboradores identificaram um gene humano homólogo do gene *wts* da *D. melanogaster*, denominado *h-warts*, que foi mapeado no cromossomo 6q24-25. Hoje sabe-se que o gene *wts*, localizado no cromossomo 3R100A5, responsável pela regulação do ciclo celular da mosca é ortólogo ao LATS1 encontrado no cromossomo 6q24-25 em mamíferos (NISHIYAMA *et al.*, 1999; EEKEN *et al.*, 2002; SILVA; OLIVEIRA, 2017) e descrito em 273 espécies de Chordatas.

De acordo com Sidorov *et al.* (2001), o gene *wts* é uma mutação letal em homozigose nos zigotos, por esse motivo é mantido em linhagem estoque com a presença do balanceador cromossômico *TM3, Sb^l*. A deleção do gene *wts* e a expressão do alelo recessivo induz a formação de cópias celulares extremamente invasivas nos discos imaginais por todo o corpo da fase larval do inseto, que proporcionam a manifestação de tumores epiteliais no adulto (ORSOLIN; NEPOMUCENO, 2009; ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2012; SILVA; OLIVEIRA, 2017).

Diversas cepas mutantes de *D. melanogaster* são mantidas em estoque para os estudos em genética, entre elas *brown (bw)*, *flare (flr³)*, *multiple wing hairs (mwh)*, *Neurofibromin 1 (Dmel/Nf1)*, Oregon R (*ORR*), *warts (wts)*, *white (w)*, entre outras (GRAF *et al.*, 1989; BLOOMINGTON, 2019).

2.3 TESTE PARA DETECÇÃO DE TUMORES EPITELIAIS EM *Drosophila melanogaster* – EPITHELIAL TUMOR TEST (ETT)

O teste de tumor epitelial (ETT) em *D. melanogaster* é empregado para avaliar o potencial carcinogênico e anticarcinogênico de diversos compostos químicos (NEPOMUCENO, 2015). O teste foi descrito pela primeira vez em 2001 por Sidorov e colaboradores ao avaliarem 10 compostos químicos de cinco classes distintas. Os autores compararam as frequências de tumores epiteliais em diversas partes do corpo de *D. melanogaster* utilizando diversos cruzamentos. Atualmente, o cruzamento padrão para o teste

ETT é realizado entre fêmeas e machos das linhagens que apresentam o genótipo *wts/TM3, Sb¹* e *mwh/mwh*, respectivamente (ORSOLIN; NEPOMUCENO, 2009).

A linhagem *warts* (*wts/TM3, Sb¹*) possui o marcador *wts* no cromossomo 3, que é mantido em homozigose na presença do balanceador cromossômico *TM3, Sb¹*. O marcador *wts*, quando expresso na condição selvagem, atua como um gene supressor de tumor. A deleção desse gene, e a expressão do alelo recessivo, leva à formação de células que são consideradas altamente invasivas, acarretando na manifestação de tumores epiteliais no corpo e apêndices da mosca (MORAIS *et al.*, 2016).

A linhagem *multiple wing hairs* (*mwh/mwh*) é mantida em homozigose recessiva para o marcador *mwh*, localizado no cromossomo 3, em posição distal em relação ao centrômero. Quando expresso em homozigose recessiva, o gene *mwh* produz fenótipo de pelos nas asas da mosca em formato múltiplo, diferente do fenótipo selvagem, que possui um único pelo por célula (SPANÓ *et al.*, 2001).

Por meio do cruzamento *wts/TM3, Sb¹* e *mwh/mwh* produz-se a larva trans-heterozigota marcada *mwh/wts* e heterozigota balanceada *mwh/TM3, Sb¹* diferenciadas entre si pelo fenótipo de pelos longos e finos e, pelos curtos e grossos, respectivamente, (Figura 5).

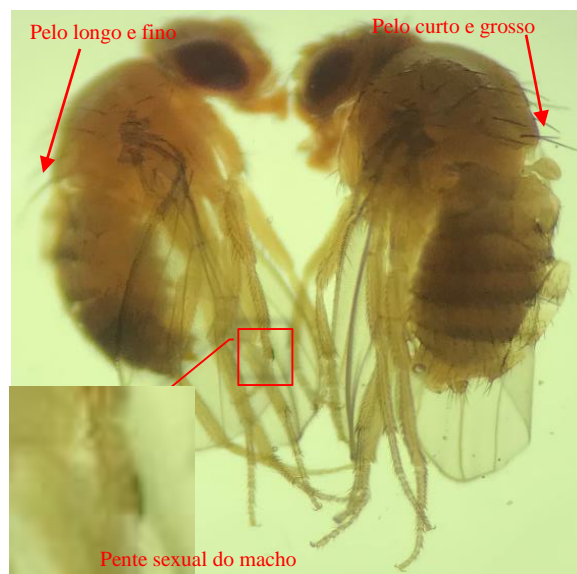


Figura 5 – Linhagem F1 do cruzamento de fêmea *wts/TM3, Sb¹* e macho *mwh/mwh* de *D. melanogaster*. Mosca a esquerda macho trans-heterozigota marcada de pelo longo e fino (*mwh/wts*). Mosca a direita fêmea heterozigota balanceada de pelo curto e grosso (*mwh/TM3, sb¹*). **Fonte:** Autor, 2019.

O ETT consiste em expor por 48 horas larvas de terceiro instar (72 horas de vida), de linhagem heterozigota resultantes do cruzamento *wts/TM3, Sb¹* e *mwh/mwh*, à composto

químico. Nesse período as larvas consomem o alimento fornecido embebido nas diferentes concentrações estabelecidas do composto avaliado e dos controles, antes de empupar.

Após a eclosão, os imagos são coletados e avaliados quanto a frequência de tumores nas diferentes regiões do corpo: olho, cabeça, tórax, abdômen, asas e pernas nos indivíduos de pelos longos e finos (*mwh/wts*), já os indivíduos de pelos curtos e grossos (*mwh/TM3, Sb^l*) são descartados (Figura 6).

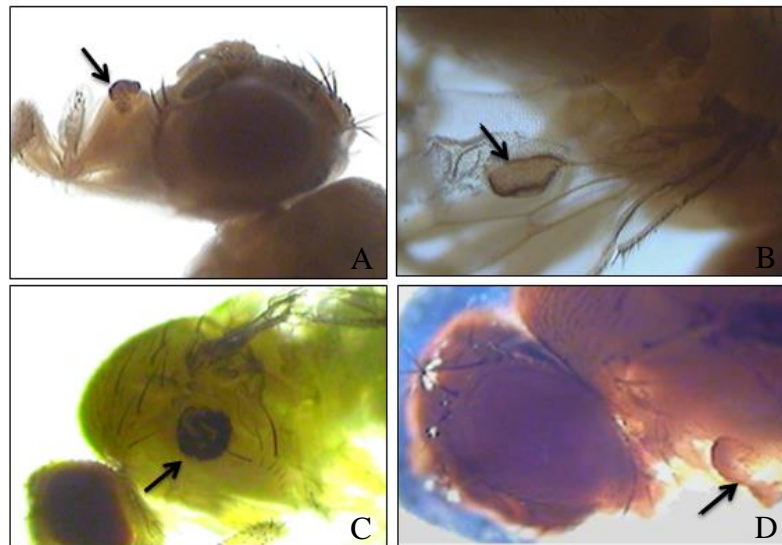


Figura 6 - Evidência de formação tumoral em adultos da linhagem F1(*mwh/wts*) do cruzamento de fêmea *wts/TM3, Sb^l* e macho *mwh/mwh* de *D. melanogaster* apontada pelas setas. Cabeça (A), asa (B), tórax (C) e membro anterior (D). **Fonte:** Imagem cedida pelo Laboratório de Citogenética e Mutagenese do UNIPAM (LABCIM), Patos de Minas-MG.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade e o potencial carcinogênico do medicamento de uso veterinário Dectomax[®] (doramectina 1%) por meio do teste de detecção de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar a toxicidade pela curva de sobrevivência de imagos de *Drosophila melanogaster* após tratamento com diferentes concentrações de DORA para determinar as concentrações subletais.

b) Avaliar as frequências de tumores epiteliais nos segmentos olhos, cabeça, asas, abdômen, tórax, pernas e halteres de moscas expostas às diferentes concentrações subletais de DORA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado no Laboratório de Citogenética e Mutagênese (LABCIM) do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM)- MG, no período de janeiro a abril de 2019.

4.2 LINHAGENS E CRUZAMENTO DE *Drosophila melanogaster*

Para a obtenção de larvas foram utilizadas duas linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*, *wts/TM3*, *Sb¹* e *mwh/mwh*, portadoras dos marcadores genéticos *warts* (*wts*, 3-100) e *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-3-0), respectivamente. O estoque das linhagens é mantido no LABCIM/UNIPAM em frascos de vidro de 250 mL com meio de cultura (Figura 7A) formulado com 820 mL de água deionizada, 156 g de banana nanica madura, 25 g de fermento biológico fresco massa forte (Itaiquara, Brasil), 11 g de ágar puro (Kasvi, Brasil) e 1 g de metilparabeno (Nipagin, Dinâmica, Brasil) (GRAF; SINGER, 1992). Os frascos são mantidos em incubadora B.O.D (Bioética) com fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, com umidade relativa de 60% e temperatura 25 ± 1 °C e repicados a cada 15 dias.



Figura 7 – **A:** frascos de manutenção de estoque de linhagens na incubadora com fotoperíodo. **B:** frascos de acasalamento das linhagens parentais *wts/TM3*, *Sb¹* e *mwh/mwh*. **C:** frascos de postura. **Fonte:** Autor, 2019.

Para o cruzamento das linhagens foram acasaladas 500 fêmeas virgens *wts/TM3*, *Sb¹* e 250 machos *mwh/mwh* em cinco frascos, sendo 100 fêmeas e 50 machos por frasco contendo meio de manutenção do estoque de linhagem (Figura 7B). Após, aproximadamente 40 horas de contato entre as duas linhagens, as mesmas foram transferidas para frascos contendo meio de ovoposição produzido com uma camada de ágar base (Kasvi, Brasil) 4% e sobrecamada

de uma mistura porosa constituída por aproximadamente de 100 g de fermento biológico fresco (Itaiquara, Brasil) e 10 g de açúcar de confeitiro (Glaçúcar®, Brasil) (Figura 7C) (GRAF; SINGER, 1992), onde permaneceram por oito horas e, após, retornaram aos frascos de acasalamento.

Transcorridas 72 horas, as larvas resultantes do cruzamento foram lavadas com água deionizada para compor o teste de toxicidade (TX) e *Epithelial Tumor Test* (ETT) (Figura 8).

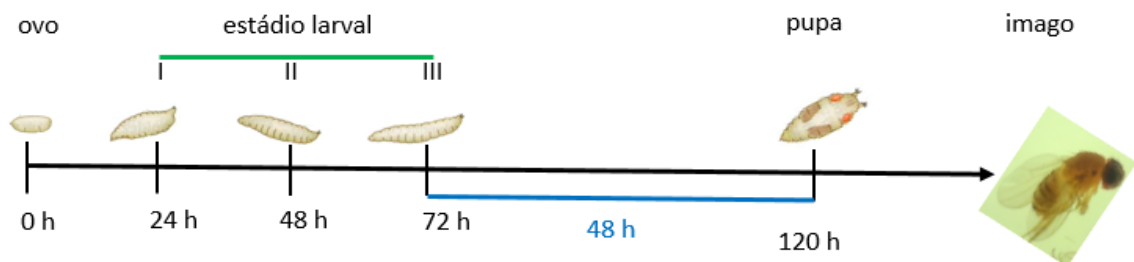


Figura 8 - Escalonamento temporal do tratamento crônico de larvas da linhagem F1 do cruzamento de fêmea *wts/TM3, Sb¹* e macho *mwh/mwh* de *D. melanogaster*. Observa-se 24 h após postura o estágio larval I, após 48 h o estágio larval II, após 72 h o estágio larval III que entra em contato com as substâncias do tratamento por 48 h (azul) até completar 120 h quando empupa e metamorfoseia-se em adulto após três a quatro dias. **Fonte:** Autor, 2019.

4.3 AGENTES QUÍMICOS EMPREGADOS NO EXPERIMENTO

Devido a característica hidrofóbica da solução de Dectomax® foi preparada solução diluente com o tensoativo polissorbato, nome comercial TWEEN 80¹. A solução diluente foi preparada a 0,5% com água deionizada estéril.

O composto químico avaliado foi a molécula de DORA, nome comercial Dectomax® (Zoetis, São Paulo, Brasil), contendo 1% de DORA². As concentrações foram predefinidas com base nos estudos de Sousa *et al.* (2019) que avaliaram carcinogenicidade da ivermectina sobre o modelo experimental *D. melanogaster*.

Foram definidas e preparadas as seguintes concentrações de DORA para determinar a curva de toxicidade: $4,3 \times 10^{-7}$, $8,69 \times 10^{-7}$, $1,74 \times 10^{-6}$, $3,47 \times 10^{-6}$, $6,95 \times 10^{-6}$, $1,39 \times 10^{-5}$, $2,78 \times 10^{-5}$ e $5,56 \times 10^{-5}$ mM. Para isto, foram adicionados 5 μ L de DORA em 1000 mL de solução diluente, obtendo-se a concentração $5,56 \times 10^{-5}$ mM. Desta diluição transferiu-se 50 mL para 50

¹ (CAS 9005-65-6) marca Dinâmica, sob o lote 85867, fabricado em 12/2016 e vencimento em 12/2020.

² (CAS 117704-25-3) sob o número de partida 006/18, fabricado em fevereiro de 2018, vencimento em fevereiro 2021.

mL de solução diluente e obteve-se a concentração $2,78 \times 10^{-5}$ mM. Repetiu-se o procedimento de transferência de 50 mL da última diluição até obter-se a concentração $4,3 \times 10^{-7}$ mM.

Como mutágeno e controle positivo foi utilizado doxorubicina (DXR)³ na formulação em pó liofilizado que possui efeito carcinogênico comprovado em *D. melanogaster* (ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2012). A solução do controle positivo foi preparada a 0,4 mM com água deionizada estéril (FRAGIORGE; SPANÓ; ANTUNES, 2007). A DXR é uma antraciclina citotóxica e genotóxica que age ligando ao DNA e inibindo a síntese de ácido nucleico. Inibe a atividade da enzima topoisomerase II formando complexos que intercalam e clivam a fita de DNA, geram ROS que, se não for reparado pela célula, pode provocar mutações e aberrações cromossômicas em células tumorais e não tumorais ((FRAGIORGE; SPANÓ; ANTUNES, 2007; RESENDE *et al.*, 2011).

4.4 TESTE DE TOXICIDADE (TX) EM *Drosophila melanogaster*

Realizou-se o teste de toxicidade para definir as concentrações de DORA para o teste ETT. Cinquenta larvas F1 obtidas do cruzamento fêmea *wts/TM3, Sb¹* e macho *mwh/mwh* de *D. melanogaster* foram contadas e colocadas em tubos separados contendo 1,5 g de meio de cultura alternativo purê de batata (Yoki) para *D. melanogaster* (SPANÓ *et al.*, REZENDE *et al.*, 2011) e 5 mL das concentrações crescentes de DORA $4,3 \times 10^{-7}$, $8,69 \times 10^{-7}$, $1,74 \times 10^{-6}$, $3,47 \times 10^{-6}$, $6,95 \times 10^{-6}$, $1,39 \times 10^{-5}$, $2,78 \times 10^{-5}$ e $5,56 \times 10^{-5}$ mM, água de osmose reversa estéril (controle negativo), DXR 0,4 mM (controle positivo) e solução de polissorbato (controle solvente).

Após, as larvas ficaram expostas aos agentes químicos por cerca de 48 horas, até empupar e metamorfosear e, depois foram submetidas à contagem individual por concentração e controles para determinar a curva de sobrevivência ou toxicidade.

As doses não letais foram consideradas aquelas em que a sobrevivência foi $\geq 70\%$. Após a determinação das doses não letais realizou-se o teste ETT (NAVES, *et al.*, 2018).

³ (CAS 25316-40-9) sob o lote 7PL5091, fabricado em junho de 2017 e vencimento em junho de 2021. nome comercial Adriblastina® RD (Pfizer, São Paulo, Brasil).

4.5 EPITHELIAL TUMOR TEST (ETT) – TESTE PARA DETECÇÃO DE TUMORES EPITELIAIS EM *Drosophila melanogaster*

Para a realização do ETT foram utilizadas larvas heterozigotas de terceiro estágio descendentes do cruzamento entre *wts/TM3, Sb¹* e *mwh/mwh*. As larvas foram transferidas para frascos, em triplicata, contendo meio de tratamento alternativo constituído de 1,5 g de purê de batata (Yoki) (SPANÓ *et al.*, 2001) e 5 mL de DORA de cinco concentrações crescentes, $8,69 \times 10^{-7}$, $1,74 \times 10^{-6}$, $3,47 \times 10^{-6}$, $6,95 \times 10^{-6}$ e $1,39 \times 10^{-5}$ mM diluídas em polissorbato. Também foram incluídos os grupos de controle, com água de osmose reversa estéril (controle negativo), DXR 0,4 mM (controle positivo) e solução de polissorbato 0,5% (controle solvente).

Após, as larvas ficaram expostas aos agentes químicos por cerca de 48 horas, até empupar e metamorfosear.

Preconiza-se avaliar 200 moscas de cada tratamento (ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2012), no entanto quando não eclodem moscas suficientes permite-se a contagem de número inferior. Foram analisadas 1505 moscas, sendo 200 moscas do controle positivo (DXR), 200 moscas do controle negativo (água de osmose reversa), 200 moscas do controle solvente (Tween 80 0,5%) e, 200 moscas da concentração $8,69 \times 10^{-7}$, 186 moscas da concentração $1,74 \times 10^{-6}$, 188 moscas da concentração $3,47 \times 10^{-6}$, 131 moscas da concentração $6,95 \times 10^{-6}$ e 200 moscas da concentração $1,39 \times 10^{-5}$ mM de DORA.

4.6 COLETA DE MOSCAS E ANÁLISE DE TUMORES EPITELIAIS

Após sofrerem metamorfose, os imagos foram transferidos para frascos de vidro com 10 mL de etanol a 70%. Então, foram colocados em placa de Kline[®] de vidro e imersos em glicerina e, com auxílio de microscópio estereoscópio sob o aumento de 40x, foram segregados de acordo com o fenótipo, ou seja, foram selecionados indivíduos de ambos os sexos que apresentavam fenótipo de pelo longo e fino (*mwh/wts*) (Figura 9A) para a contagem de tumores.

Indivíduos que apresentavam como característica pelo curto e grosso (Figura 9B) foram descartados por não possuírem o gene *wts*, ou seja, avaliou-se apenas moscas que não apresentavam o balanceador cromossômico (*TM3, Sb¹*), por este não permitir a manifestação de tumor. Foram identificados e contados tumores no olho, cabeça, asa, abdômen e tórax e anotados em planilha padronizada (ANEXO A)

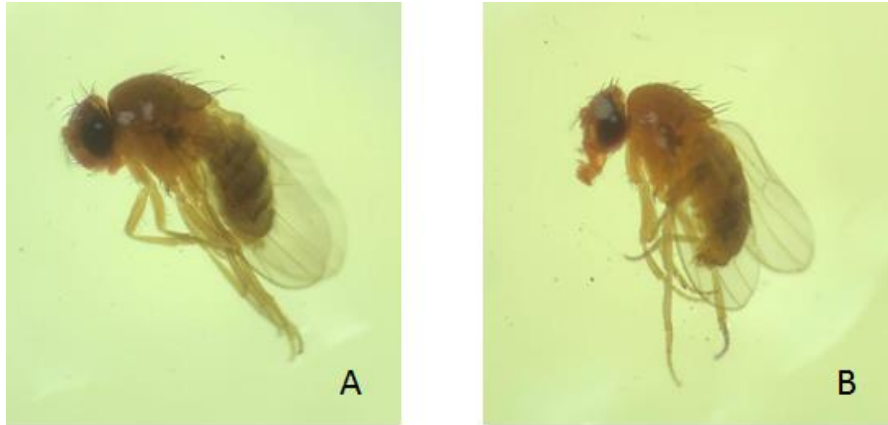


Figura 9 – **A:** Mosca fêmea trans-heterozigota marcada de pelo longo e fino (*mwh/wts*).
B: Mosca macho heterozigota balanceada de pelo curto e grosso (*mwh/TM3, sb^l*).
Fonte: Autor, 2019.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A curva de sobrevivência das larvas de *D. melanogaster* no teste de toxicidade da DORA e do controle positivo se deu comparando o número de sobreviventes e mortas de cada concentração com sobreviventes e mortas do controle negativo aplicando o teste Qui-Quadrado, com nível de significância 5% do software GraphPad Prism 6 (MORAIS *et al.*, 2016).

Devido as frequências tumorais não possuírem normalidade na distribuição, as frequências de tumores das concentrações testadas e os controles foram calculados dividindo o valor total de tumores encontrados pelo número de indivíduos analisados. Utilizando o teste *U*, não paramétrico, de Mann-Whitney, com nível de significância 5% do software Prophet 5.0 comparou-se as frequências (COSTA; OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2011; MORAIS *et al.*, 2017).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TOXICIDADE DE DORA SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DE *Drosophila melanogaster*

O teste de toxicidade é aplicado para avaliar a curva de sobrevivência de modelo experimental quando submetidos a um tratamento com substância onde se desconhece a concentração tóxica da mesma àquele grupo. O conhecimento da dose letal permite que o teste para detecção de tumores epiteliais seja executado de maneira a garantir maior número de indivíduos para a aplicação estatística (REZENDE *et al.*, 2011).

De acordo com os procedimentos experimentais utilizados, o teste de toxicidade demonstrou que as concentrações $2,78 \times 10^{-5}$ e $5,56 \times 10^{-5}$ mM afetaram significativamente a sobrevivência das larvas expostas, quando comparadas ao controle negativo, apresentando respectivamente $p < 0,0007$ e $p < 0,0001$. Esses resultados demonstraram efeito tóxico de DORA nas duas maiores concentrações testadas (Figura 10).

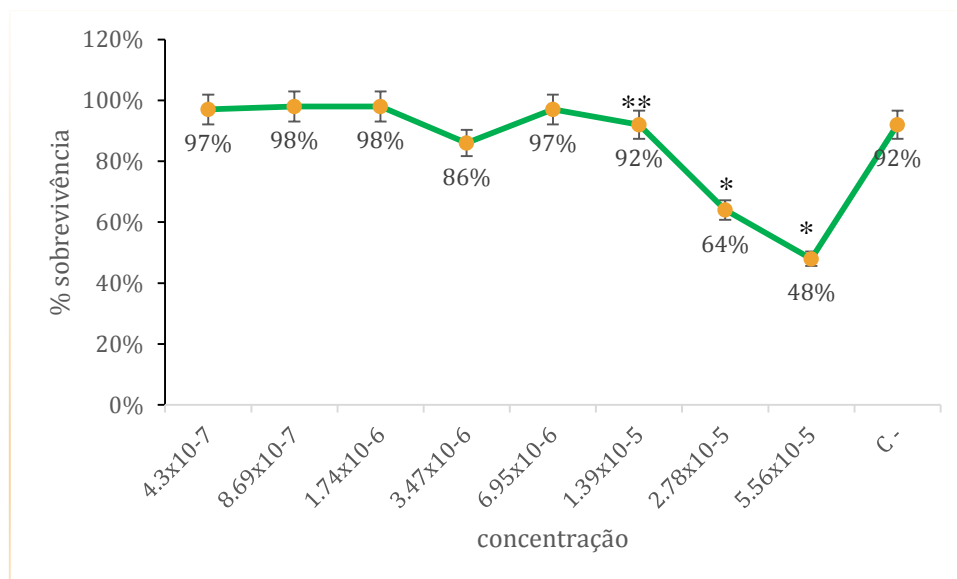


Figura 10 - Curva de sobrevivência de larvas de *D. melanogaster* expostas cronicamente a 8 concentrações crescentes de DORA e do controle negativo (C-) (água) aplicando o teste Qui-quadrado com nível de significância 5%. *Concentrações que afetaram significativamente ($p < 0,05$) a sobrevivência das larvas quando comparadas com o controle negativo. **Maior concentração que não afetou significativamente ($p > 0,05$) a sobrevivência das larvas quando comparada com o controle negativo. **Fonte:** Autor, 2019.

A toxicidade apresentada pelas concentrações $2,78 \times 10^{-5}$ e $5,56 \times 10^{-5}$ Mm de DORA é explicada pelo mecanismo de ação da substância que atua sobre os canais dependentes de Cl^- controlados pelos neurotransmissores GABA e glutamato dos invertebrados permitindo o influxo de Cl^- e hiperpolarização da membrana pós-sináptica (PAPICH, 2016). Assim, no presente estudo, pressupõem-se que as larvas foram acometidas por paralisia flácida e impedidas de se movimentarem para o repasto, culminando em morte por inanição.

O efeito de toxicidade observado nas condições experimentais do presente estudo sugere que os indivíduos heterozigotos de *D. melanogaster* são resistentes a DORA. Nem todas as LM apresentam o mesmo perfil de toxicidade sobre *D. melanogaster*, uma vez que Sousa *et al.* (2019) asseguraram que a molécula de ivermectina apresentou toxicidade elevada, na qual a concentração $46,4 \times 10^{-17}$ mM foi tóxica para os indivíduos testados. Anteriormente, Kim *et al.* (2018) relataram sensibilidade aumentada à ivermectina em mutantes de *D. melanogaster* com expressão suprimida dos genes codificadores da enzima citocromo P450 quando comparado a indivíduos em que a expressão da P450 era normal.

As enzimas P450s são conhecidas por estarem envolvidas em vias do processo biossintético de ecdisteróides e hormônios juvenis, que são cruciais para o crescimento, desenvolvimento e reprodução dos insetos. Elas também metabolizam produtos naturais de plantas e inseticidas, resultando em bioativação ou desintoxicação (TIJET; HELVIG; FEYEREISEN, 2001).

Então, uma possível explicação para a resistência à concentração de $1,39 \times 10^{-5}$ mM, observada neste estudo, pode ser a presença da enzima citocromo P450 em níveis suficientes para detoxicação da LM DORA. Zuo *et al.* (2021) relataram uma mutação pontual de ocorrência natural e ou superexpressão do gene CYP9A186 do P450 associada à resistência à avermectina em *Spodoptera exigua*. Mudanças na transcrição do P450, bem como mudanças estruturais, parecem alterar a suscetibilidade aos inseticidas e devem ser avaliadas, visto que as mutações de ganho de função são comuns para várias classes de inseticidas.

5.2 EFEITO CARCINOGENÉTICO DA DORA

Após a realização do teste de toxicidade e determinação das doses não letais, realizou-se o teste ETT e, posteriormente, procedeu-se a contagem de tumores dos controles e de cinco diluições consecutivas em que a de sobrevivência foi $\geq 70\%$.

No presente estudo foi constatado potencial carcinogênico de DORA nas cinco concentrações avaliadas quando comparadas com o controle negativo. O controle solvente não diferiu do controle negativo o que evidencia que o solvente não interferiu na indução de tumores. Os mecanismos pelos quais a DORA produz o dano ao DNA e a formação de tumor não foram diretamente verificados no presente estudo.

Os carcinógenos podem interagir diretamente com o DNA por meio da formação de ligações covalentes da molécula ou seus metabólitos formando complexos de DNA. Esses complexos levam a vários tipos de danos ao DNA, como mutações pontuais, quebra de cromossomos, fusão, segregação e não disjunção, os quais resultam em modificações nas informações do DNA, além da instabilidade genômica. Existem também substâncias que podem ser carcinógenos sem interagir diretamente com o DNA, causando mecanismos diferentes, como ligação a proteínas específicas, interações com receptores, efeitos modificadores hormonais e endócrinos e metilação do DNA (CHOUDHURI; CHANDERBHAN; MATTIA, 2018).

As frequências de tumores observadas nos diferentes segmentos de *D. melanogaster* tratadas com as diferentes concentrações de DORA estão representada na Tabela 1.

Tabela 1 - Frequências relativas e absolutas de tumores epiteliais em descendentes heterozigotos para o gene supressor de tumor *wts* em *D. melanogaster* tratados com água de osmose reversa (controle negativo), DXR (controle positivo), Tween 80 (controle solvente) e concentrações subletais crescentes de DORA

Tratamento	Frequência relativa e absoluta de tumor por segmento								
	n° indivíduos	olho	cabeça	asa	abdômen	tórax	perna	halter	Frequência relativa e absoluta acumuladas
Água	200	0(0)	0,05(2)	0,29(12)	0,24(10)	0,1(4)	0,32(13)	0(0)	0,2(41) ^a
DXR 0,4 mM	200	0(2)	0,05(67)	0,26(330)	0,09(116)	0,31(384)	0,27(335)	0,01(15)	6,23(1249) ^b
Tween 80 0,5%	200	0(0)	0,02(1)	0,23(13)	0,17(10)	0,33(19)	0,24(14)	0(0)	0,28(57) ^a
DORA 8,69x10 ⁻⁷ mM	200	0(0)	0,01(1)	0,13(16)	0,49(62)	0,23(29)	0,14(18)	0(0)	0,63(126) ^c
DORA 1,74x10 ⁻⁶ mM	186	0(0)	0,06(6)	0,14(15)	0,42(45)	0,15(16)	0,22(23)	0,01(1)	0,57(106) ^c
DORA 3,47x10 ⁻⁶ mM	188	0(0)	0,01(2)	0,09(16)	0,53(98)	0,12(23)	0,23(42)	0,01(2)	0,97(183) ^d
DORA 6,95x10 ⁻⁶ mM	131	0(0)	0,03(5)	0,1(20)	0,61(117)	0,11(22)	0,12(23)	0,01(3)	1,45(190) ^e
DORA 1,39x10 ⁻⁵ mM	200	0(0)	0,02(2)	0,1(10)	0,41(42)	0,25(25)	0,22(22)	0(0)	0,5(101) ^c

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna evidenciam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Mann-Whitney. **Fonte:** Autor, 2019.

As frequências significativas de tumores em relação ao controle negativo observadas neste estudo, podem sugerir que a DORA ou seus metabólitos agiram como um carcinógeno e causaram alteração no gene supressor de tumor *wts* nos indivíduos heterozigotos *wts/mwh*, podendo ser uma deleção, recombinação ou mutação, em que o mesmo perdeu sua heterozigose e, conseqüentemente, não sinalizou a reparação do DNA. As mutações são normalmente corrigidas por mecanismos de reparo de DNA; no entanto, se a replicação do DNA ocorrer antes da ação de um mecanismo de reparo, as mutações podem tornar-se permanentes (CHOUDHURI; CHANDERBHAN; MATTIA, 2018).

É importante salientar que houve menor frequência de tumores na maior concentração testada, $1,39 \times 10^{-5}$ mM, a qual diferiu significativamente ($p < 0,05$) da segunda maior concentração $6,95 \times 10^{-6}$ mM.

Sugere-se que DORA na maior concentração subletal $1,39 \times 10^{-5}$ mM provocou danos acentuados ao material genético que impossibilitaram o crescimento celular e desenvolvimento de tumor, e que a célula tenha sido encaminhada para um processo de apoptose. Supõem-se que a proporção do dano causado às células possa ter inviabilizado a correção do DNA, ativando o gene indutor de morte celular BAX e inibido o gene repressor de morte celular BCL que controlam apoptose em células de larvas de *D. melanogaster* (CASTILLO *et al.*, 2011; NCBI, 2019). Outro mecanismo que possa ter ocorrido é o dano oxidativo que inviabilizou o crescimento celular.

Corroborando com a hipótese da ocorrência de dano oxidativo nas células das larvas de *D. melanogaster* expostas à concentração subletal $1,39 \times 10^{-5}$ mM de DORA, Wu *et al.* (2016) observaram o efeito da LM benzoato de emamectin na redução da viabilidade em células da linhagem Sf-9 do inseto *Spodoptera frugiperda* e indução da apoptose de maneira dependente da concentração, e sugeriram que o conteúdo de ROS liberado pela LM contribuiu para a morte celular.

Luan *et al.* (2017) observaram que o conteúdo de ROS nas células de larvas de *Trichoplusia* Tn5B1-4 aumentou rapidamente à medida que a concentração da LM benzoato de emamectin aumentou, e que as células expostas à 15 μ M, apresentavam alto nível de expressão de caspase 3 de maneira dependente do tempo, que conseqüentemente levou à apoptose. A enzima apoptótica caspase 3 também é expressa em *D. melanogaster* (XU *et al.*, 2006) a qual exerce papel regulador de morte em células danificadas. Portanto, a presença dessa enzima justifica a hipótese da ocorrência de dano oxidativo nas células das larvas de *D. melanogaster* expostas à concentração subletal $1,39 \times 10^{-5}$ mM de DORA.

Considerando as frequências significativas de tumores observadas no presente estudo é provável que a DORA alterou o gene supressor de tumor *wts* nos indivíduos heterozigotos *wts/mwh* favorecendo a falha no reconhecimento ou impossibilitando a correção do defeito no DNA, ou encaminhamento para a apoptose. Portanto, a mutação resultante pode ter levado a célula a sofrer transformação neoplásica nos diferentes tecidos expostos à substância testada (BRASILEIRO FILHO, 2019). O desenvolvimento celular exige a interação precisa de várias vias de sinalização intercelular (SASAMURA; MATSUNO; FORTINE, 2013; MATTILA; HIETAKANGAS, 2017) e a interação da DORA ou de seus metabólitos com essas vias pode ter desviado a rota de um sistema de reparação de danos e transformou-se em tumor.

Levando em consideração que *Drosophila* pode exibir mais de 1200 genes relacionados com as vias metabólicas (TENNESSEN *et al.*, 2014), estudos que abalzem a interação da DORA com o metabolismo celular do inseto devem conduzir a novas abordagens sobre a sua genotoxicidade como o teste de mutação e recombinação somática (SMART).

Devido ao fato de estudos retratarem a presença de resíduos de LM em derivados lacteos (SILVA *et al.*, 2019; AVCI; FILAZI, 2020; MULLER *et al.*, 2020) e este trabalho demonstrou a indução de tumor por DORA no modelo experimental *D. melanogaster* que tem homologia de 80% dos genes de doenças humanas, inclusive a presença de um gene ortólogo para o controle do crescimento celular, há indício de que a DORA também possa ser carcinogênica em humanos. Por isso, reforça-se a necessidade de maior fiscalização sobre os produtos de origem animal e que atendam os períodos de carência para consumo humano.

6 CONCLUSÕES

De acordo com as condições experimentais do presente estudo conclui-se que a DORA apresenta toxicidade para larvas de *D. melanogaster* porque afetou a sobrevivência nas duas maiores concentrações que foram testadas $2,78 \times 10^{-5}$ e $5,56 \times 10^{-5}$ mM.

A DORA possui atividade carcinogênica nas cinco concentrações que são subletais $8,69 \times 10^{-7}$, $1,74 \times 10^{-6}$, $3,47 \times 10^{-6}$, $6,95 \times 10^{-6}$ e $1,39 \times 10^{-5}$ mM.

Há a necessidade de se respeitar o período de carência para o consumo de carne e produtos lácteos de animais que foram submetidos a terapia com DORA, visto que o fármaco é capaz de induzir a formação de tumor em um inseto que apresenta homologia gênica com o ser humano.

REFERÊNCIAS

AGENER UNIÃO, SAÚDE ANIMAL. Dorax® Pet. São Paulo, julho de 2020. <https://agener.com.br/novidades/dorax-pet/>

ALMEIDA, M. A. O. *et al.* **Considerações gerais sobre anti-helmínticos**. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 6. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2018 p.547-555.

AMORETTY, P. R. *et al.* Uso de *Drosophila melanogaster* como modelo para estudo do relógio circadiano em insetos vetores. **Acta Scientiae Technicae**, v. 1, n.1, p 87- 98, 2013. <https://doi.galoa.com.br/doi/10.17648/uezo-ast-v1i1.9>

ANCHORDOQUY, J. M. *et al.* Doramectin induced cytotoxic and genotoxic effects on bovine peripheral lymphocytes and cumulus cells in vitro. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 54, n.2, p147–154, 2019. <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1559569>

AVCI, B.; FILAZI, A. The effects of heat applications on macrocyclic lactone-structured antiparasitic drug residues in cows' milk. **Food Additives and Contaminants: part A**, v. 37, p 1145-1155. 2020. <https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1753892>

BEIRA, J. V.; PARO, R. The legacy of *Drosophila* imaginal discs. **Chromosoma**, v. 125, n. 4, p 573–592. 2016. <https://doi.org/10.1007/s00412-016-0595-4>

BLOOMINGTON. Bloomington *Drosophila* Stock Center. Stock, human disease model. **Indiana University Bloomington**. <https://bdsc.indiana.edu/stocks/index.html>

BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. **Farmacologia e terapêutica veterinária**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo. Patologia geral**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.

BURG, R. W. *et al.* Avermectins, new family of potent antihelminthic agents: producing organism and fermentation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 15, p 361–367, 1979. <https://doi.org/10.1128/AAC.15.3.361>

CAGLAYAN, C.; GULCIN, İ. The toxicological effects of some avermectins on goat liver carbonic anhydrase enzyme. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 32 n. 1, 2018. <https://doi.org/10.1002/jbt.22010>

CARLSSON, G. *et al.* Swimming activity in zebrafish larvae exposed to veterinary antiparasitic pharmaceuticals. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 63, p 74-77, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.015>

CASTILLO, K. *et al.* BAX inhibitor-1 regulates autophagy by controlling the IRE1 a branch of the unfolded protein response. **The EMBO Journal**, v. January, p 4465–4478, 2011. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.318>

CERKVENIK-FLAJS, V. *et al.* Trace analysis of endectocides in milk by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 663, n. 2, p 165–171, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.01.040>

CHEIBUB, A. M. S. S.; LYRA, E. S. B.; PEREIRA NETTO, A. D. Development and validation of a method for simultaneous determination of trace levels of five macrocyclic lactones in cheese by HPLC-fluorescence after solid–liquid extraction with low temperature partitioning. **Food Chemistry**, v. 272, p 148–156, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.027>

CHOUDHURI, S., CHANDERBHAN, R., MATTIA, A. **Carcinogenesis: Mechanisms and Models**. In: GUPTA, R. C. (edit). *Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles*. 3 ed. Amsterdã: Academic Press Elsevier, p 339–354. 2018. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811410-0.00020-9>

CORDERO, A. M.; QUEK, S.; MUELLER, R. S. Doramectin in the treatment of generalized demodicosis. **Veterinary Dermatology**, v. 29, n. 2, p 104-e41, 2017. <https://doi.org/10.1111/vde.12515>

COSTA, W. F.; OLIVEIRA, A. B.; NEPOMUCENO, J. C. Lapachol as an epithelial tumor inhibitor agent in *Drosophila melanogaster* heterozygote for tumor suppressor gene *wts*. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p 3236–3245, 2011. <https://doi.org/10.4238/2011.December.22.1>

CUNHA, D. L.; NEPOMUCENO, J. C. Genotoxicidade do anastrozol avaliado por meio do Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. **Revista Do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão**, v. 1, p 79–99, 2011.

EEKEN, J. C. J. *et al.* Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene *wts*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 40, n. 4, p 277–282, 2002. <https://doi.org/10.1002/em.10119>

FRAGIORGE, E. J.; ANTUNES, L. M. G.; SPANÓ, M. A. Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 2, p. 449-455, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000300025>

GAO, A. *et al.* Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in vitro by doramectin and nemadectin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 3, p 393–399, 2010. <https://doi.org/10.1211/jpp.62.03.0016>

GOUDIE, A. C. *et al.* Doramectin - a potent novel endectocide. **Veterinary Parasitology**, v. 49, n. 1, p 5–15, 1993. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90218-C](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90218-C)

GRAF, U. *et al.* Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test; **Mutation Research**, v. 222, p 359-373, 1989.

GRAF, U.; SINGER, D. Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v. 8, n. 1, p 15-27, 1992.

HONMA, M. *et al.* Improvement of quantitative structure-activity relationship (QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity: Outcomes of the Ames/QSAR International Challenge Project. **Mutagenesis**, v. 34, n. 1, p 41–48, 2019. <https://doi.org/10.1093/mutage/gey031>

HUTT, J. H. C.; PRIOR, I. C.; SHIPSTONE, M. A. Treatment of canine generalized demodicosis using weekly injections of doramectin: 232 cases in the USA (2002-2012). **Veterinary Dermatology**, v. 26, n. 5, p 345-e73, 2015. <https://doi.org/10.1111/vde.1222>

JUSTICE, R. W. *et al.* The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. **Genes and Development**, v 9, p 534-546, 1995. <https://doi.org/10.1101/gad.9.5.534>

KIM, J. H. *et al.* RNA interference validation of detoxification genes involved in ivermectin tolerance in *Drosophila melanogaster*. **Insect Molecular Biology**, v.27, n. 5, p 651–660, 2018. <https://doi.org/10.1111/imb.12512>

KOSE, L. P. *et al.* The effects of some avermectins on bovine carbonic anhydrase enzyme. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 5, p 773–778, 2016. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1064406>

LANUSSE, C. *et al.* Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 20, n. 2, p 91–99, 1997. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.1997.00825.x>

LIFSCHITZ, A. *et al.* Comparative distribution of ivermectin and doramectin to parasite location tissues in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 87, n. 4, p 327–338, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00175-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00175-2)

LOPES, J. C. *et al.* Recombinogenic activity of pantoprazole[®] in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n. 1, p 101–106, 2015. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738120140154>

LUAN, S. *et al.* Emamectin benzoate induces ROS-mediated DNA damage and apoptosis in *Trichoplusia Tn5B1-4* cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 273, p 90–98, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.06.004>

MACEDO, F. *et al.* Development and validation of a method for the determination of low-ppb levels of macrocyclic lactones in butter, using HPLC-fluorescence. **Food Chemistry**, v. 179, p 239–245, 2015a. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.046>

MACEDO, F. *et al.* Short communication: Macrocyclic lactone residues in butter from Brazilian markets. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 6, p 3695–3700, 2015b. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9130>

MATTILA, J.; HIETAKANGAS, V. Regulation of carbohydrate energy metabolism in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 207, n. 4, p 1231–1253, 2017. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.199885>

MCKELLAR, Q. A.; BENCHAOUI, H. A. Avermectins and milbemycins. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 19, n.5, p 331-351, 1996. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1996.tb00062>

MILLET-BOUREIMA, C.; MARROQUIN, J. P.; GAMBERI, C. Modeling Renal Disease “on the Fly.” **BioMed Research International**, v. 2018, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5697436>

MOLINARI, G. DNA damage kinetics and apoptosis in ivermectin-treated chinese hamster ovary cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 11, p 1260–1267, 2013. <https://doi.org/10.1002/jat.2782>

MORAIS, C. R. *et al.* Assessment of the mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of fipronil insecticide in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Chemosphere**, v.165, p 342–351, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.023>

MORAIS, C. R. *et al.* Mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of thiamethoxam insecticide and formulated product in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Chemosphere**, v. 187, p 163–172, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.108>

MOSCHOU, I. C.; DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S. Ionization study and simultaneous determination of avermectins and milbemycines in fish tissue by LC-ESI-MS/MS. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1104, p 134–140, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.11.017>

MULLER, P. M. *et al.* Avermectins residues in milk produced in the state of Pernambuco. **Food Science and Technology**, maio, 2020. https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612020005008204&script=sci_arttext

NAVES, M. P. C. *et al.* Assessment of mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of titanium dioxide nanocrystals in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v.112, p 273-281, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.040>

NCBI. 2019. Reference Sequence: NM_176098.3. *Drosophila melanogaster* death executioner Bcl-2 (Debcl), mRNA. Locus: NM_176098 1724 bp mRNA linear INV 25-APR-2019. Definition *Drosophila melanogaster* death executioner Bcl-2 (Debcl), mRNA. Accession: NM_176098. VERSION: NM_176098.3. DBLINK: BioProject: PRJNA164 and BioSample: SAMN02803731

NEPOMUCENO, J. C. Using the *Drosophila melanogaster* to Assessment Carcinogenic Agents through the Test for Detection of Epithelial Tumor Clones (Warts). **Advanced Techniques in Biology & Medicine**, v,3, n. 3, 2015. <https://doi.org/10.4172/2379-1764.1000149>

NI, T. *et al.* Development of a broad-spectrum monoclonal antibody-based indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the multi-residue detection of avermectins in edible animal tissues and milk. **Food Chemistry**, v. 286, n. december, 2018, p 234–240, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.011>

NISHIYAMA, Y. *et al.* A human homolog of *Drosophila* warts tumor suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. **FEBS Letters**, v. 459, p. 159 -165, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01224-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01224-7)

ORSOLIN, P. C.; NEPOMUCENO, J. C. Potencial carcinogênico do açafrão (*Curcuma longa* L.) identificado por meio do teste para detecção de clones de tumor em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**, v. 6, p. 55-69, 2009.

ORSOLIN, P. C., SILVA-OLIVEIRA, R. G., NEPOMUCENO, J. C. Assessment of the mutagenic, recombinagenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p 2598–2604, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.05.008>

PANDEY, U. B., NICHOLS, C. D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 2, p 411–436, 2011. <https://doi:10.1124/pr.110.003293>

PAPICH, M. G. Doramectin. **Saunders Handbook of Veterinary Drugs**, 2016, p 266–268. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-24485-5.00228-x>

PEREGO, R. *et al.* Critically appraised topic for the most effective and safe treatment for canine generalised demodicosis. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p 1–7, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1767-7>

PIMENTEL-TRAPERO, D. *et al.* Determination of macrocyclic lactones in bovine liver using QuEChERS and HPLC with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1015–1016, p 166–172, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.01.055>

PUBCHEM. Doramectin. **National Library of Medicine**. National Center Biotechnology Information. 2020. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doramectin>.

QU, J. *et al.* Autophagy is upregulated in brain tissues of pigeons exposed to avermectin. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p 159–168, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.002>

QUISHPE, J. A. P.; BRAVO, J. J. S. **Uso de endoparasiticidas y su efecto antinematelmíntico sobre el incremento de peso en vacas mestizas**. 2018. 53 f. Dissertação (Graduação em Medicina Veterinária) - Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López”. Calceta, novembro, 2018.

REZENDE, A. A. A. *et al.* The effect of the dibenzylbutyrolactolic lignan (?) -cubebin on doxorubicin mutagenicity and recombinogenicity in wing somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, p. 1235-1241, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.001>

RIZZETTI, T. M. *et al.* Optimization of sample preparation by central composite design for multi-class determination of veterinary drugs in bovine muscle, kidney and liver by ultra-high-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 246, n. May 2017, p 404–413, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.049>

ROCHA, A. A. O.; ALVES, G. C. B.; ORSOLIN, P. C. Efeito modulador do Roacutan (isotretinoína) sobre a carcinogenicidade da Doxorubicina, avaliado por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**, v. 12, n. 2, p 201- 212, dez 2015.

RÚBIES, A. *et al.* Determination of avermectins: A QuEChERS approach to the analysis of food samples. **Food Chemistry**, v. 181, p 57–63, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.067>

SATURNINO, R. S. *et al.* Assessment of the mutagenic, recombinogenic, and carcinogenic potential of amphotericin B in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 1, p 9–15, 2017. <https://doi.org/10.1080/01480545.2016.1188302>

SASAMURA, T.; MATSUNO, K.; FORTINI, M. E. Disruption of *Drosophila melanogaster* Lipid Metabolism Genes Causes Tissue Overgrowth Associated with Altered Developmental Signaling. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 11, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003917>

SIDOROV, R. A. *et al.* Induction of tumor clones in *D. melanogaster* wts/+ heterozygotes with chemical carcinogens. **Mutation Research**, v. 498, p 181-191, 2001. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(01\)00277-7](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(01)00277-7)

SILVA, G. R. *et al.* Multiresidue method for identification and quantification of avermectins, benzimidazoles and nitroimidazoles residues in bovine muscle tissue by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) using a QuEChERS approach. **Talanta**, v. 171, n. March, p 307–320, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.012>

SILVA, M. R.; OLIVEIRA, R. G. S.; VASCONCELOS, M. A. Avaliação do efeito anticarcinogênico da própolis verde (Artepelin C) por meio do teste warts em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**. v. 15, n.1, p 285-296, 2018.

SILVA, M. R.; OLIVEIRA, R. G. S. Avaliação do efeito carcinogênico e anticarcinogênico do levonogestrel através do teste de detecção de clones de tumores epiteliais em células de *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**. v. 14, n 1 p. 200-217, 2017.

SILVA, P. S. *et al.* Ivermectin and albendazole with drawal period in goat milk. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, v.20, n. Abril, 2019. <https://doi.org/10.1590/s1519-99402001012019>

SPANÓ, M. A. *et al.* Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. **Mutagenesis**, v. 16, p 385-394, 2001.

SOUSA, F. A. *et al.* Genotoxicity and carcinogenicity of ivermectin and amoxicillin in vivo systems. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 70, n. April, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103196>

STUTZMAN-ENGWALL, K. *et al.* Semi-synthetic DNA shuffling of aveC leads to improved industrial scale production of doramectin by *Streptomyces avermitilis*. **Metabolic Engineering**, v7, n1, p 27-37, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2004.07.003>

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

TENNESSEN, J. M. Coordinated Metabolic Transitions During *Drosophila* Embryogenesis and the Onset of Aerobic Glycolysis. **Genes Genomes Genetics**, v. 4, n. 5, p 839–850, 2014. <https://doi.org/10.1534/g3.114.010652>

TIJET, N.; HELVIG, C.; FEYEREISEN, R. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: Annotation, intron–exon organization and phylogeny. **Gene**, v. 262, p 189–198, 2001. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00533-3](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00533-3)

TURBERG, A. **Ectoparasitocides: Antagonists and Modulators of Chloride Channels**. In: Mehlhorn H. (eds) *Encyclopedia of Parasitology*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27769-6_999-2

TÜRKAN, F.; HUYUT, Z.; ATALAR, M. N. The toxicological impact of some avermectins on human erythrocytes glutathione S-transferase enzyme. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 32, n. 10, p 1–7, 2018. <https://doi.org/10.1002/jbt.22205>

UGUR, B.; CHEN, K.; BELLEN, H. J. *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. **Disease Models & Mechanisms**, v. 9, n. 3, p 235–244, 2016. <https://doi.org/10.1242/dmm.023762>

WATSON, D. J. *et al.* **Biologia Molecular do Gene**. Porto Alegre: Artmed. 2015.

WICKS, M. S.; KAYE, B.; WAETHERLEY, A. J. Effect of formulation on the pharmacokinetics and efficacy of doramectin. Amsterdam, **Veterinary Parasitology**, v. 49, p 17–26, 1993. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90219-D](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90219-D)

WOLSTENHOLME, A. J.; ROGERS, A. T. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. **Parasitology**, v. 131, n. SUPPL, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2011.09.003>

WU, X. *et al.* Detection on emamectin benzoate-induced apoptosis and DNA damage in *Spodoptera frugiperda* Sf-9 cell line. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 126, p 6–12, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.06.009>

XU, D. *et al.* The effector caspases drICE and dcp-1 have partially overlapping functions in the apoptotic pathway in *Drosophila*. **Cell Death Differentiation**, v. 13, n. 10, p 1697–1706, 2006.

ZUO, Y. *et al.* Genome mapping coupled with CRISPR gene editing reveals a P450 gene confers avermectin resistance in the beet armyworm. **PLoS Genetics**, v. 17, n. 7, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009680>

ANEXO A

