

UNIVERSIDADE DE UBERABA
FRANCIELLE APARECIDA DE SOUSA

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE CARCINOGENICA DO ANTIPARASITA
IVERMECTINA, PELO TESTE DE DETECÇÃO DE TUMOR EPITELIAL EM
CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*

UBERABA-MG
2015

FRANCIELLE APARECIDA DE SOUSA

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE CARCINOGENICA DO ANTIPARASITA
IVERMECTINA, PELO TESTE DE DETECÇÃO DE TUMOR EPITELIAL EM
CÉLULAS SOMÁTICAS DE *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.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Eustáquio Coelho

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Ana Maria Bonetti

UBERABA-MG
2015

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

- S85a Sousa, Francielle Aparecida de.
Avaliação da capacidade carcinogênica do antiparasita ivermectina, pelo teste de detecção de tumor epitelial em células somáticas de *Drosophila melanogaster* / Francielle Aparecida de Sousa. – Uberaba, 2015.
54 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, 2015.
Orientador: Prof. Dr. Humberto Eustáquio Coelho.
1. Mosca-das-frutas. 2. Avermectinas. 3. Tumores. 4. Carcinógenos. 5. Antiparasitários. I. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação. II. Título.

CDD 595.774

FRANCIELLE APARECIDA DE SOUSA

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE CARCINOGENICA DO ANTIPARASITA
IVERMECTINA, PELO TESTE DE DETECÇÃO DE TUMOR EPITELIAL EM
CÉLULAS SOMÁTICAS DE *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

Aprovada em: 02/10/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Humberto Eustáquio Coelho
Universidade de Uberaba

Prof. Dr. Eustáquio Resende Bittar
Universidade de Uberaba

Prof. Dra. Anna Monteiro Correia Lima
Universidade Federal de Uberlândia

Dedico esse trabalho aos meus pais Antônio e Aparecida, aos meus irmãos Grazielle e Luís Antônio, e ao meu namorado Lúcio Flávio, por existirem em minha vida e pelo apoio nessa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me guiou e me protegeu durante a realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos – UNIUBE, e a todos os professores que participaram desse momento.

Ao coordenador do Mestrado Acadêmico em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da UNIUBE, Prof. Dr. Álvaro Ferreira Júnior, pela dedicação, apoio e incentivo sempre.

Ao professor Dr. Humberto Eustáquio Coelho pela orientação, confiança, companheirismo e por acreditar no meu crescimento, pelo exemplo de honestidade e dedicação à profissão, pelo apoio e incentivo. Obrigada por tudo!

À minha colega de mestrado, Renata Teixeira, pela amizade, pela ótima convivência e companhia nas estradas e nos estudos e por sua colaboração em todos os momentos que precisei.

Aos meus pais Aparecida Maria Soares e Sousa e Antônio Justino de Sousa pelo dom da vida, amor, colaboração e apoio. Vocês são exemplos de dedicação e honestidade. Obrigada por tudo!

Aos meus irmãos, Grazielle Aparecida de Sousa e Luís Antônio Soares e Sousa, pelo carinho, dedicação e incentivo sempre.

Ao meu namorado, Lúcio Flávio Gomes Rosa, e aos seus pais, Marilene Maria Gomes Rosa e Lúcio Flávio Rosa, pelo apoio e compreensão sempre que precisei me ausentar, pelo carinho, motivação e incentivo nesta jornada e por terem acreditado que seria capaz de chegar até aqui.

À professora Dra. Ana Maria Bonetti, do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), pelo apoio, colaboração e orientação.

Ao Prof. MSc. Cássio Resende de Moraes, pela dedicação, esforço, colaboração, ajuda e pelo incentivo para conclusão deste trabalho.

Aos meus colegas de trabalho da Prefeitura Municipal de Monte Carmelo e da Fundação Carmelitana Mário Palmério (FUCAMP), pelo apoio e compreensão sempre que precisei me ausentar para dar continuidade a esse trabalho.

À minha amiga Alessandra Pereira, que me acolheu na sua residência, durante o período de estudos, pelo carinho e incentivo, sem medir esforços.

Aos meus amigos e amigas: Mary Camargo, Mateus Rosa, Natália Mota de Oliveira, Thays Cunha Vieira, Abadia Naves (minha segunda mãe), Rayssa Amaral, Dênia Amaral, Francine Borges, Heloísa Fernandes, Luiz Fernando Vaz de Oliveira, Guilherme Caetano, Carlos Henrique Cavallari, Franciele Marques e Lorena Nogueira, pelo carinho, amizade e compreensão em todos os momentos.

A toda minha família pelo apoio para esta conquista.

RESUMO

A ivermectina é um antiparasita macrocíclico semi-sintético do grupo das avermectinas, isolado a partir de *Streptomyces avermitilis*. Tem ação parasiticida potente em várias espécies animais, incluindo o ser humano. A sua principal utilização é no tratamento e controle de doenças parasitárias e infestação por carrapatos em animais de grande porte tais como, ruminantes e equinos. Este estudo avaliou o potencial carcinogênico do antiparasita ivermectina pelo Teste de Detecção de Tumor Epitelial utilizando a linhagem *wts* de *Drosophila melanogaster*, um organismo modelo para estudos de carcinogênese. Para avaliar os efeitos carcinogênicos foi utilizado o Ivomec® a 1%. Ensaio de sobrevivência foi realizado para determinar as concentrações subletais. Larvas de *D. melanogaster* de terceiro estágio, descendentes do cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3, sb¹* e machos *mwh/mwh* foram expostas a diferentes concentrações do composto ($2 \cdot 10^{-10}$ ng/ mL, $1 \cdot 10^{-10}$ ng/ mL, $5 \cdot 10^{-11}$ ng/ mL e $2,5 \cdot 10^{-11}$ ng/ mL) homogeneizadas em meio de cultura a base de batata. Os resultados da frequência de tumor epitelial nos grupos tratados com ivermectina obtidos nesta análise diferiram do controle negativo na densidade de moscas com 1 tumor e de 2 a 3 tumores. Em todas as séries tratadas com ivermectina, o corpo da mosca foi à região com maior número de tumor. Em ordem, nas pernas e asas as frequências de tumor foram maiores. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) na frequência de tumor foi observada nos olhos das moscas, nas doses mais concentradas ($2 \cdot 10^{-10}$ e $1 \cdot 10^{-10}$ ng/mL de ivermectina), na cabeça, na concentração $2,5 \cdot 10^{-11}$ ng/mL e nos halteres, na concentração de $2 \cdot 10^{-10}$ ng/mL quando comparadas ao controle negativo. Todos os grupos expostos a ivermectina demonstraram diferenças estatisticamente significativa ($P < 0,05$) na frequência total de tumor quando comparado ao controle negativo (água), o que confirma a atividade carcinogênica do antiparasita de maneira dose dependência. Conclui-se que este composto, sob essas condições experimentais e concentrações, apresenta efeito cancerígeno em *Drosophila melanogaster*.

Palavras-chave: Mosca da fruta; avermectina; tumor; carcinogenicidade; antiparasita.

ABSTRACT

Ivermectin is a semisynthetic macrolide antiparasitic, isolated from *Streptomyces avermitilis*, of the group of avermectins. It has potent parasitical action in several animal species, including the human being. Its main use is in the treatment and control of parasitic diseases, for the treatment of scabies and ticks in large animals such as cattle, ruminants and horses. This study evaluated the carcinogenic potential of antiparasitic ivermectin by the Epithelial Tumor Detection Test using *wts* strain of *Drosophila melanogaster*, a model organism for carcinogenicity studies. To evaluate the carcinogenic effects was used Ivomec® 1%. Survival assay was performed to determine the sublethal concentration. Third instar larvae from *wts/TM3, sb¹* virgin females mated with Canton-S males (wild type) were exposed to different compound concentrations ($2 \cdot 10^{-10}$ ng/ mL, $1 \cdot 10^{-10}$ ng/ mL, $5 \cdot 10^{-11}$ ng/ mL e $2.5 \cdot 10^{-11}$ ng/ mL) homogenized in potato-based medium. The results of the frequency epithelial tumor in the groups treated with ivermectin obtained in this analysis differ in density of the negative control flies with 1 tumor and 2 to 3 tumors. In all series treated with ivermectin, the body of the fly was the region with the highest number of tumor. In order, in the legs and wings tumor frequencies were higher. Statistically significant difference ($P < 0.05$) in tumor frequency was observed in the eyes of flies, in more concentrated doses ($2 \cdot 10^{-10}$ and $1 \cdot 10^{-10}$ ng / ml ivermectin), the head, the concentration $2,5 \cdot 10^{-11}$ ng / ml and halters in a concentration of $2 \cdot 10^{-10}$ ng / mL compared to the negative control. All groups exposed to ivermectin showed statistical difference ($P < 0.05$) in the total frequency of tumors as indicated in *Drosophila melanogaster* test when compared to negative control (water), indicating dose-dependence. In conclusion that this compound, under these experimental conditions and concentrations, presents carcinogenic effect in *Drosophila melanogaster*.

Keywords: Fruit flies; avermectin; tumor; carcinogenicity; antiparasitic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturação química da avermectina (ivermectina).....	18
Figura 2: Mecanismo de ação das avermectinas.....	19
Figura 3: Ciclo de vida da mosca <i>Drosophila melanogaster</i>	24
Figura 4: Dimorfismo sexual da espécie <i>Drosophila melanogaster</i>	25
Figura 5: Representação do cruzamento realizado entre a linhagem <i>multiple wing hairs</i> e a linhagem <i>warts</i> e seus respectivos descendentes.....	27
Figura 6: Fenótipo dos pelos no corpo da mosca nas diferentes progênies.....	28
Figura 7: Expressão de tumor epitelial em <i>Drosophila melanogaster</i> . Na cabeça (A), no olho (B), no corpo (C), na asa (D), na perna (E) e nos halteres (F).....	29
Figura 8: Sequência de procedimentos a serem adotados na metodologia descrita.....	34
Figura 9: Taxa de sobrevivência da prole resultante do cruzamento <i>mwh/mwh</i> x <i>wts/TM3, Sb¹</i> . Água - Controle negativo; Mitomicina C - 33 µg/mL (MMC) - Controle positivo.....	35
Figura 10: Distribuição de tumor epitelial nos apêndices de <i>D. melanogaster</i> tratadas com diferentes concentrações de Ivermectina. MMC = Mitomicina 33 µg/mL.....	41

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Frequência de moscas com tumor epitelial observados em descendentes heterozigotos para o gene supressor de tumor *wts* de *D. melanogaster* tratados com Mitomicina C (MMC) e diferentes concentrações de ivermectina..... 38
- Tabela 2.** Frequência de tumor epitelial observados nos apêndices dos descendentes heterozigotos para o gene supressor de tumor *wts* de *D. melanogaster* tratados com Mitomicina C (MMC) e diferentes concentrações de ivermectina..... 39
- Tabela 3.** Porcentagem de tumor epitelial observados em apêndices de *melanogaster* tratados com diferentes concentrações de Ivermectina (IVE).... 40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 PARASITISMO ANIMAL E COMBATE QUÍMICO	15
2.2 IVERMECTINA.....	16
2.3 MUTAÇÕES INDUZIDAS E CÂNCER.....	21
2.4 <i>Drosophila melanogaster</i> (DIPTERA, DROSOPHILIDADE): ASPECTOS GERAIS.....	22
2.5 TESTE DE DETECÇÃO DE TUMOR EPITELIAL EM <i>Drosophila melanogaster</i>	25
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 OBJETIVO GERAL.....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	31
4.2 AGENTES QUÍMICOS.....	31
4.3 TESTE DE DETECÇÃO DE TUMOR EPITELIAL EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE <i>Drosophila melanogaster</i> (TESTE WTS).....	31
4.3.1 Linhagens de <i>Drosophila</i> , cruzamento e tratamento.....	31
4.3.2 Fixação de moscas e análise de tumor epitelial.....	33
4.3.3 Análise estatística.....	33
5. RESULTADOS.....	35
5.1 CONCENTRAÇÕES USADAS NO TESTE DE DETECÇÃO DE TUMOR EPITELIAL.....	35
5.2 ANÁLISE DE TUMOR.....	36
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÕES.....	45
REFERENCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo (ANUALPEC, 2010). Os ganhos na pecuária, impulsionados pelos índices produtivos cada vez maiores no rebanho, resultam da implantação de novas técnicas de manejo reprodutivo, da melhoria genética dos animais e de novas culturas de pastagens. Isso trouxe benefícios, porém, em controversa criou inúmeros problemas sanitários e um bom exemplo, são as parasitoses (VIDOTTO, 2002).

A pecuária deve estar alicerçada em três pilares: manejo sanitário estruturado, disponibilidade de alimentos com qualidade nutricional e genética de boa qualidade dos animais. Atualmente, os pecuaristas procuram investir na produção, enfocando na qualidade genética do rebanho, na melhoria das pastagens e em programas de sanidade, principalmente no controle de parasitas, visando atender a exigência dos consumidores pela qualidade da carne e evitando prejuízos, já que animais parasitados deixam de expressar a potencialidade genética, mesmo tendo acesso a uma boa alimentação (RODRIGUES *et al*, 2012).

No quesito sanidade do rebanho, caso não seja efetuado o controle integrado e sistemático dos principais agentes etiológicos causadores de parasitoses, a criação de bovinos torna-se inviável. Para esse controle, é importante ressaltar a importância do conhecimento de certos aspectos das parasitoses, enfocando as suas formas subclínicas (COOP, HOLMES, 1996), que passam despercebidas pelos pecuaristas, impossibilitando maiores lucros. Os prejuízos econômicos relatados são devidos aos altos custos com o tratamento e prevenção de doenças infecto-parasitárias, além da mortalidade e conseqüente perda de material genético, baixa conversão alimentar, redução no ganho de peso e redução na produção animal de carne e leite (VIDOTTO, 2002).

Em um mesmo rebanho é possível que todos os animais apresentem algum grau de infecção. No entanto, somente os susceptíveis poderão apresentar sintomatologia clínica da infecção, resultando em enormes perdas econômicas no lucro do pecuarista. Os animais que apresentam algum grau de parasitismo sem apresentar sintomas, são considerados resilientes ou resistentes quando apresentam parasitismo nulo. Isso quer dizer que, melhorias em relação ao custo na

criação podem ser conseguidas a partir do tratamento seletivo dos animais (VERÍSSIMO, 2008).

A utilização e o gasto com medicamentos antiparasitários são fatores de grande importância na atividade, interferindo no lucro do pecuarista (VERÍSSIMO, 2008). A ivermectina é um produto de ampla utilização em programas de controle e manejo sanitário, pela alta eficiência sobre vários tipos de parasitas, impedindo a infecção e infestação de animais e consequentes prejuízos na produção (SHOOP e SOLL, 2002).

A ivermectina (dissacarídeo lactona macrocíclico) é formada pela hidrogenação catalítica seletiva das avermectinas B_{1a} e B_{1b} nas proporções de 80% ou mais e 20% ou menos, respectivamente. Age nos canais de cloro controlados pelo ácido glutâmico e, secundariamente, em canais de cloro controlados pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), ocasionando aumento no fluxo de cloro nas células do sistema nervoso de vermes e na placa ou no botão neuromuscular de artrópodes. Pequena quantidade de avermectinas (menos de 1 µg/kg de peso animal), tanto por via oral como parenteral podem levar à paralisia severa e morte de vermes e insetos hematófagos (BOOTH; McDONALD, 1992; LEES *et al.*, 2014).

A ivermectina é um fármaco utilizado na medicina veterinária desde 1981 e pelo seu mecanismo de ação seletivo no sistema nervoso dos parasitas é até hoje um dos antiparasitários de maior sucesso no tratamento e controle sistêmico de endo e ectoparasitas, abrangendo um manejo sanitário estruturado do rebanho. Em contrapartida, começaram a serem observados sinais clínicos em vertebrados, variando desde incoordenação motora e tremores transitórios, perda de fertilidade em mamíferos e até mortes em alguns casos, decorrentes de efeitos colaterais do medicamento (MIGUEL, 1998).

Organismos submetidos a medicações frequentemente apresentam vulnerabilidade do material genético (DNA) às mutações, já que agentes naturais ou artificiais podem provocar modificações na sua estrutura ou composição química levando o surgimento de lesões no DNA. Essas lesões podem ser induzidas por agentes químicos, físicos ou biológicos, que podem ser de diferentes origens, incluindo medicamentos, que podem prejudicar as células, uma vez que afetam processos vitais como a replicação e a transcrição gênica. As alterações podem, também, causar mutações e aberrações cromossômicas e levar a processos tumorais e morte celular (COSTA; MENK, 2000).

Estas agressões impostas pelo ambiente motivou um aumento no número de estudos sobre as lesões e alterações induzidas por estas substâncias e sobre os possíveis agentes causadores das mesmas. Logo, há algumas décadas, as análises genéticas tornaram-se essenciais para compreender a fisiopatogenia de doenças, visto que fornecem bases para a compreensão das funções celulares que são controladas pela expressão de genes codificadores de proteínas e enzimas funcionais e para a compreensão da ação dos produtos gênicos (LOURO *et al.*, 2002).

O Teste de Detecção de Tumor Epitelial em *Drosophila melanogaster* é utilizado na detecção de tumor proporcionado por potenciais xenobióticos (SIDOROV *et al.*, 2001; ORSOLIN e NEPOMUCENO, 2009; SILVA e NEPOMUCENO, 2011; COSTA; OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2011; FURTADO e NEPOMUCENO, 2012; ORSOLIN, SILVA-OLIVEIRA e NEPOMUCENO, 2012). O teste faz uso de uma linhagem de *D. melanogaster* que possui o marcador *wts* (*Warts*), que quando expresso na condição selvagem atua como um gene supressor de tumor (XU *et al.*, 1995). A deleção do gene e a consequente expressão do alelo recessivo, leva à formação de clones de células que são consideradas altamente invasivas, acarretando na manifestação de tumor epitelial no corpo e apêndices da mosca (NISHIYAMA *et al.*, 1999).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PARASITISMO ANIMAL E COMBATE QUÍMICO

A sociedade brasileira tem se beneficiado com a tecnologia agropecuária, particularmente no que se refere à saúde animal, resultando no aumento da escala de produção. Entretanto, existe um fator limitante na produção animal que gera prejuízos em todos os sistemas, definido pelas enfermidades parasitárias que afetam animais domésticos. Na pecuária bovina, as elevadas perdas econômicas e de desenvolvimento sofrem interferência de vários fatores, com destaque das helmintoses gastrintestinais (LIMA, 1994). Na verdade o maior prejuízo na pecuária está na redução do desempenho dos animais, que tem sua intensidade relacionada à idade dos animais acometidos, a espécie de helminto envolvida, a intensidade da carga parasitária e o estado fisiológico, imunológico e nutricional do hospedeiro (ROGER, 2008).

Em escala global, o parasitismo gastrintestinal apresenta-se mais preocupante em regiões pobres (PERRY *et al.*, 2002). Em países de clima tropical durante o ano todo e no verão, em países de clima temperado, os parasitas têm causado danos como perda de peso e até a morte (ROGER, 2008), além do retardamento no desenvolvimento dos animais na entrada da idade reprodutiva, da baixa produtividade dos rebanhos (corte e leite) e da queda da resposta imunológica predispondo os animais a outras infecções, elevando os gastos com o manejo (LIMA, 1994).

É importante salientar que a produção animal é sustentada por três pilares: genética, nutrição e sanidade. Em se tratando de sanidade, a preocupação com o elevado parasitismo provocado tanto por endo como ectoparasitos tem a atenção voltada à integração de combates químicos efetivos. Só que o controle eficiente das parasitoses sofre restrição pela escassez de novas moléculas, limitando as opções de produtos no mercado e favorece a resistência dos parasitas frente aos princípios ativos de produtos veterinários comercializados no mundo (FAO, 2004).

O processo de resistência em algumas cepas de parasitas, tais como *Boophilus microplus* (MARTINS, FURLONG, 2001), e algumas espécies de helmintos (BORGES *et al.*, 2004), tem sido desencadeado pelo uso extensivo,

indiscriminado e muitas vezes errôneo de determinados produtos, principalmente as avermectinas.

Na indústria farmacêutica veterinária, os escassos conhecimentos sobre os mecanismos de sobrevivência dos parasitos e o decréscimo de investimentos na inovação de moléculas antiparasitárias diminuem as perspectivas de surgimento de novos grupos químicos eficazes no controle das parasitoses (GEARY, THOMPSON, 2003). Portanto, acredita-se que a associação de princípios ativos seja uma alternativa promissora (COSTA *et al.*, 2004 e NASCIMENTO *et al.*, 2003), já que até o presente momento, o grupo das lactonas macrocíclicas estão disponíveis no mercado e se destacam no controle de helmintos em bovinos no Brasil, seguido dos imidazotiazóis e dos benzimidazóis (CHARLES, FURLONG, 1996).

2.2 IVERMECTINA

As lactonas macrocíclicas, descobertas desde 1975, são compostas das avermectinas e milbemicinas. São consideradas os parasiticidas mais utilizados em diversas espécies animais, apresentando elevada eficácia contra artrópodes e nematódeos (SHOOP, SOLL, 2002). Constituem uma alternativa adequada para o controle das parasitoses, sobretudo pelo maior período de proteção, diminuindo, desta forma, o número de tratamentos (BORGES, 2003).

As propriedades químicas das lactonas macrocíclicas para absorção, transporte e ação sobre uma espécie de endo ou ectoparasitas, diferem em cada espécie de acordo com os órgãos de seleção e por isso as concentrações mínimas letais são diferentes, variando entre 2 e 200 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ de peso animal (SHOOP, MROZIK, FISHER, 1995).

A ivermectina foi à primeira entre as lactonas macrocíclicas a ser comercializada e graças a seu amplo espectro de ação, eficácia e segurança clínica, tornou-se o tratamento de escolha para ovinos, caprinos, suínos, bovinos e equinos (CAMPBELL, BENZ, 1984). Em suas vantagens, destaca a persistência de eficácia antiparasitária e a ampla segurança quanto aos efeitos indesejáveis ou de toxicidade que possam afetar a tolerância física dos animais (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Possuem

alta atividade antiparasitária, aliada a dosagens únicas e baixas, administradas via oral ou injetável (SANGSTER, 1999).

A concentração plasmática da ivermectina, após a ingestão oral do comprimido, é próxima à ingerida e ela atinge a concentração máxima em 4 horas. A meia-vida é de aproximadamente 22 a 28 horas, concentrando-se principalmente no fígado e no tecido adiposo. Para sua eliminação é necessário um prazo de 12 dias, e muitas vezes é excretada nas fezes. Por ser uma droga muito lipossolúvel e de alto peso molecular, normalmente não atravessa a barreira hematocefálica e são encontrados baixos níveis no cérebro (DIAS, 2015).

As avermectinas diferem pelas suas especificidades de indicações e uso, embora todas tenham em comum a ação no controle parasitário dos animais. A abamectina, também conhecida como avermectina B1a, é um produto natural que serve de partida para a produção de um análogo semi-sintético, 22,23 – dihidroavermectin B1 ou ivermectina, cuja estrutura pode ser considerada como um híbrido entre os componentes B1 e B2 (EGERTON *et al.*, 1980). Segundo Campbell *et al.* (1983), citado por Costa e Netto (2012), a ivermectina é constituída por uma mistura de homólogos que não deve conter menos que 80% de seu homólogo B1a (5-O-dimetil-22,23-di-hidroavermectina A1a) ($C_{48}H_{74}O_{14}$) e não mais de 20% de seu homólogo B1b (5-O-dimetil-25-(1-metilpropil)-22,23-di-hidro-25-(1-metil-etil) avermectina A1a) ($C_{47}H_{72}O_{14}$).

As lactonas macrocíclicas são quimicamente relacionadas e naturalmente produzidas a partir do *Streptomyces avermitilis*. Por fermentação são produzidos oito tipos de avermectinas: A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a, e B2b. Os tipos A2a, B1a, e B2a são produzidos em maiores quantidades. O tipo 1 é constituído por compostos que possuem dupla ligação entre os carbonos 22 e 23, os tipo 2 que apresentam 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). Os compostos do grupo “a” possuem um radical metil (CH_3) e o grupo “b” possui um hidrogênio ligado ao carbono 5 (FISHER, MROZIK, 1989).

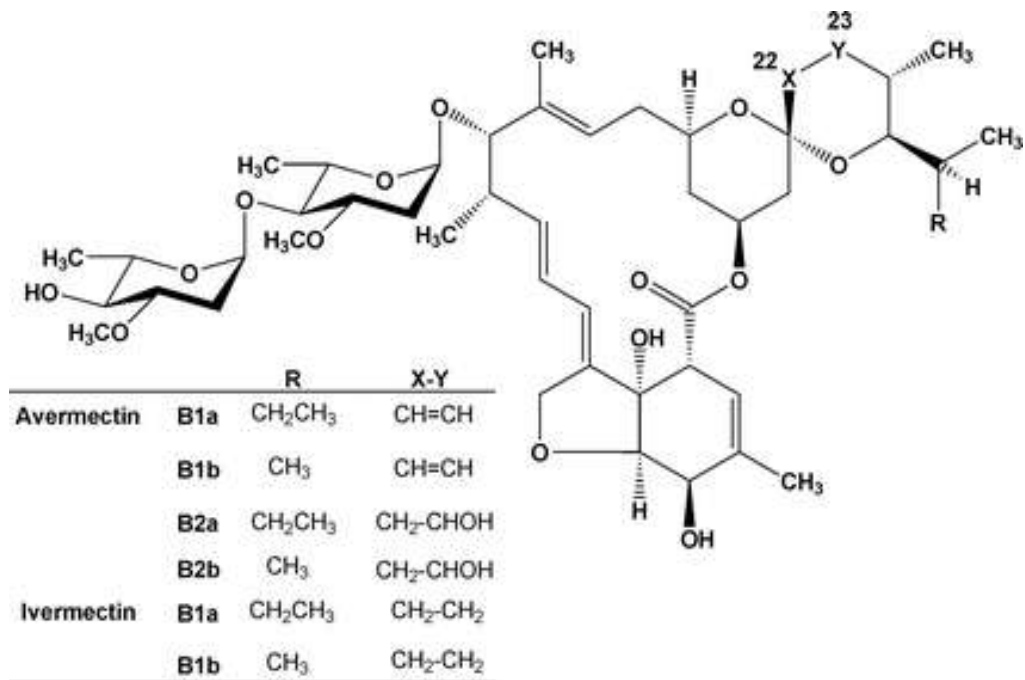


Figura 1. Estruturação química da avermectina (ivermectina).

Fonte: <https://bdtd.unifal-mg.edu.br>. Acesso: 30/07/2015

Devido ao amplo espectro de parasitas e a elevada eficácia, as avermectinas do tipo B1a são as mais importantes e em escalas industriais, a separação dos grupos B1a e B1b é inviável. Dessa forma, os produtos comerciais são uma mistura de 90% do grupo a e 10% do grupo b, sendo a atividade biológica destes dois homólogos quase idêntica (SHOOP, SOLL, 2002).

Avermectinas são agonistas aos neurotransmissores GABA, associados ao canal de cloro (CAMPBELL, BENZ, 1984). Ligam-se nos receptores GABA e afetam o fluxo de íons no canal de cloro, permitindo o influxo de cátions cloro na via celular. O mecanismo de ação das avermectinas no sistema nervoso são semelhantes aos mecanismos de ação dos neurotransmissores GABA, porém, os primeiros ligam-se de maneira irreversível. Em função do influxo de cloro em excesso na porção interna do axônio, os parasitas susceptíveis não conseguem gerar potencial de ação, perdendo a sensibilidade e apresentando episódios de hiperexcitação, paralisia muscular severa, seguida de morte (ALBERT *et al.*, 1986).

Na Figura 2 esta apresentada o esquema do mecanismo de ação das avermectinas, demonstrando a abertura do canal de cloro nas fendas sinápticas.

O mecanismo de ação da ivermectina envolve tanto a potencialização do GABA como a interação com os canais de glutamato-cloro independentes de GABA, resultando em paralisia tônica muscular e eventual morte do parasita. Esses efeitos são decorrentes da interação entre o fármaco e os canais de cloro em células nervosas e musculares dos parasitas por meio do aumento da permeabilidade de sua membrana a esses íons (McKELLER, BENCHAOUI, 1996).

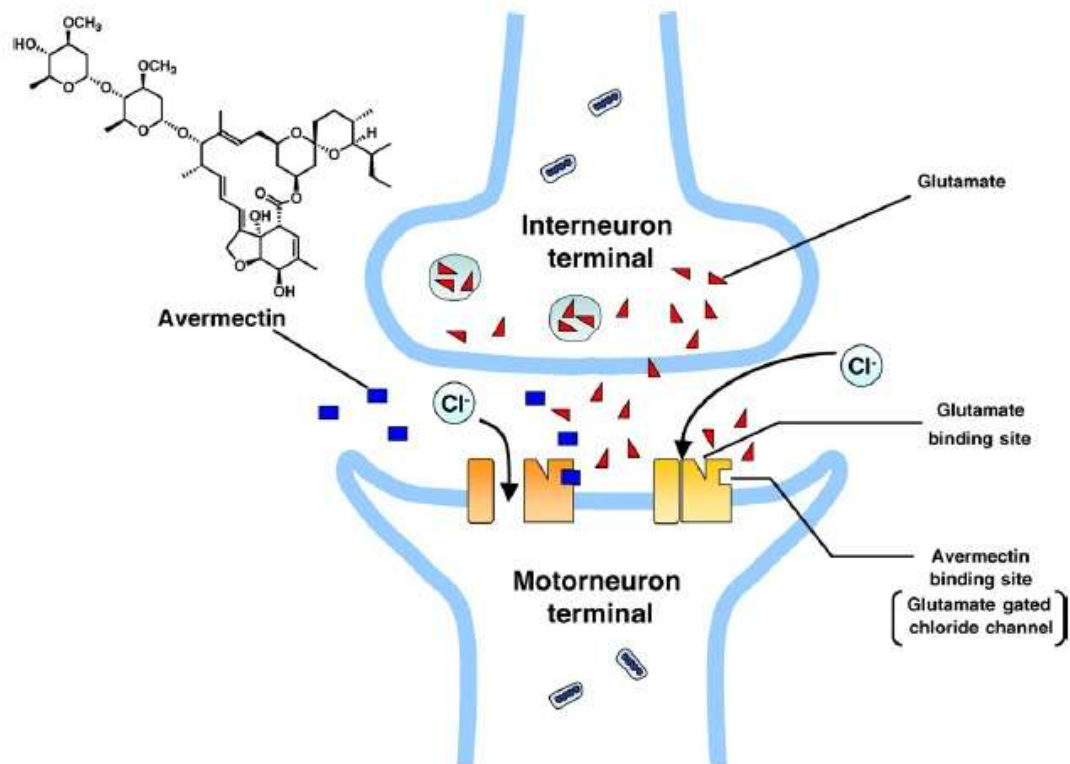


Figura 2. Mecanismo de ação das avermectinas.

Fonte: <http://farmacologiavetusp.wix.com/antiparasitariospets#!avermectinas-e-milbemicinas/c930>. Acesso: 30/07/2015

As avermectinas e as milbemicinas geralmente não causam efeitos tóxicos em mamíferos, pois, por apresentarem alto peso molecular, não atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) e, portanto, não atuam no sistema nervoso central deles (AYRES, ALMEIDA, 1999). A susceptibilidade a fármacos desse grupo pode ser maior em alguns animais como roedores, algumas raças de cães pastores,

coelhos gestantes e bezerras com idade inferior a quatro meses (AYRES, ALMEIDA, 2002; ANDRADE, SANTARÉM, 2002), apesar disso, qualquer espécie pode ser afetada se submetida a doses excessivas suficientes para penetrarem a BHE (ANDRADE, SANTARÉM, 2002).

As avermectinas (ivermectina, abamectina, doramectina e selamectina) e as milbemicinas (milbemicina e moxidectina) são lactonas macrocíclicas, classificadas como endectocidas. São produtos derivados da fermentação de actinomicetos do gênero *Streptomyces*, de ação anti-helmíntica e ectoparasiticida (AYRES, ALMEIDA, 1999). Como ectoparasiticidas, essas substâncias são aprovadas no Brasil somente para uso em suínos, equinos e ruminantes. A concentração do medicamento, o tempo de exposição ao parasita, à via de administração e a espécie animal são fatores que garantem a atividade de um endectocida, assim, estudos farmacológicos mais aprofundados são necessários para análise desses compostos (BORGES, 2003).

As propriedades físico-químicas das lactonas macrocíclicas incluem um alto peso molecular, e elevada lipofilicidade, o que confere características farmacocinéticas de amplo espectro de distribuição nos animais medicados (McKELLER, BENCHAOUI, 1996), tendo pouca solubilidade (0,006 a 0,009 ppm) em soluções aquosas (JACKSON, 1989). Essa característica faz com que após serem absorvidas, independentemente da via de administração, as moléculas sejam distribuídas por todo o corpo do animal bioacumulando, particularmente, no tecido adiposo (COSTA, 2004).

Pelo risco de seus efeitos no sistema nervoso central (CAMPBELL, BENZ, 1984) e por as avermectinas serem fármacos utilizados extensivamente em animais destinados a alimentação humana via direta ou por meio dos seus subprodutos, é de grande importância respeitar o período de carência do medicamento, determinado pelo fabricante de acordo com a espécie animal destinada a abate e/ou produção de leite e monitorar periodicamente seus resíduos em alimentos e derivados.

2.3 MUTAÇÕES INDUZIDAS E CÂNCER

A vulnerabilidade do DNA às mutações causadas pelo ambiente propiciou o crescimento de um número limitado de estudos sobre alterações e lesões induzidas por agentes químicos, físicos e biológicos (MOREIRA *et al.*, 2014). É natural que os seres vivos sofram mutações espontâneas, que podem ser resultado da interação com o ambiente ou de reações celulares, porém, a ocorrência dessas mutações podem ser aumentadas pela exposição a diversos xenobióticos. Agentes mutagênicos são responsáveis pelo incremento de mutações acima do limite tolerável normal (DÜSMAN *et al.*, 2012).

Sabe-se que alguns fatores externos, como agentes químicos, podem de maneira direta ou indireta, interagir com o material genético e favorecer o aumento de mutações, que por sua vez podem se fixar no material genético e atuar de maneira positiva (variabilidade genética) ou de maneira negativa (instabilidade genética e perturbação nas vias bioquímicas). As mutações gênicas mais comuns consistem na substituição de um nucleotídeo por outro, na perda (deleção) de um ou vários nucleotídeos ou inserção (intercalação) de um ou vários nucleotídeos em uma molécula de DNA (GRIFFITHS *et al.*, 2013). Algumas mutações podem resultar em troca na informação codificada pelo gene e levar à síntese de uma proteína diferente da esperada ou à ausência de síntese (HIB, ROBERTIS, 1998).

As mutações também podem afetar genes necessários para a sobrevivência das células ou genes envolvidos no controle do ciclo celular (SANTOS, 2006). No último caso, essa alteração pode levar a um descontrole na proliferação de células, com o conseqüente aparecimento de quadros cancerígenos (HIB, ROBERTIS, 1998).

No organismo, o ciclo de proliferação celular é rigorosamente controlado para que as células constituam comunidades organizadas no entanto, as células cancerígenas não se submetem a esse esquema de cooperação, são células com o DNA alterado que escapam dos mecanismos de controle do ciclo celular (LOPES, OLIVEIRA, PRADO, 2002).

Nesse sentido, duas grandes categorias de genes são destacadas: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (READ, STRACHAN, 2002). Os proto-oncogenes são genes relacionados ao crescimento, diferenciação e proliferação celular (LOPES *et al.*, 2002). Os genes supressores de tumor impõem alguns limites

ao ciclo e ao crescimento celular e suprimem algumas propriedades fenotípicas das células tumorais exercendo uma ação anti-neoplásica (LOURO *et al.*, 2002).

O surgimento de mutações por ação de xenobióticos, potencialmente mutagênicos, apresenta forte relação com o surgimento de neoplasias, visto que uma população de células mutantes, quando não reconhecidas e reparadas, são passíveis de perder o seu reconhecimento celular e seu controle de divisão (RIBEIRO, MARQUES, 2003). A existência de células alteradas significa que estas escaparam dos mecanismos homeostáticos intracelulares, que as levariam à apoptose. Se estes mecanismos não forem capazes de reparar o DNA ou de encaminhar a célula à apoptose, ela resistirá e se fixará na população. À medida que estas células se duplicam, as mutações se acumulam, acarretando a manifestação do tumor (BELTRÃO-BRAGA, TEIXEIRA, CHAMMAS, 2006).

2.4 *Drosophila melanogaster* (DIPTERA, DROSOPHILIDADE): ASPECTOS GERAIS

Sidorov *et al.* (2001) e Eeken *et al.* (2002) foram os pioneiros quanto a utilização da linhagem como ferramenta biológica no rastreamento de carcinógenos químicos. Desde então têm sido utilizado no monitoramento de potenciais xenobióticos naturais e artificiais (ORSOLIN e NEPOMUCENO, 2009; COSTA, OLIVEIRA e NEPOMUCENO, 2011; FREITAS, FREITAS e NEPOMUCENO, 2014).

Organismos modelo tem se tornado ferramenta importante para a investigação científica, para análises de compostos em uso ou a serem utilizados por mamíferos, inclusive o homem, pois fornecem dados biológicos que possibilitam a validação de procedimentos. Dentre esses organismos, destaca-se a espécie *Drosophila melanogaster* (GRAF, SPANÓ *et al.*, 1996).

A genética toxicológica tem voltado suas atenções para a investigação de potenciais agentes mutagênicos e genotóxicos (MACHADO *et al.*, 2013), bem como para padronização de protocolos e testes como ferramentas para a detecção de mutágenos e carcinógenos (ANDRADE, LEHMANN, 2003). Nesse sentido, o uso de um organismo modelo, com características específicas intrínsecas (sensibilidade e resposta) trata se de uma peça importante para a validação de um teste.

A *Drosophila melanogaster*, conhecida popularmente como “mosca das frutas” é um organismo modelo experimental, largamente utilizado em pesquisas científicas, que têm conferido importantes informações sobre biologia

comportamental, genética e bioquímica (GRAF, SPANÓ *et al.*, 1996; FONSECA, PEREIRA, 2004; GRAF, 2006).

Ciclo de vida curto (10 - 12 dias), prole numerosa, fácil manutenção em condições laboratoriais e baixo custo são algumas das vantagens da utilização deste organismo modelo em pesquisas científicas (JENNINGS, 2011). Somado a estas características, com o sequenciamento do genoma de *D. melanogaster*, foi constatada a homologia em 77% dos genes relacionados às doenças humanas (REITER *et al.*, 2001), o que permite, em algumas situações, a extrapolação dos resultados obtidos na mosca para humanos.

Possui quatro pares de cromossomos ($2n = 8$), sendo três pares autossômicos e um par de cromossomos sexuais. Durante a embriogênese é verificada a presença de 10 pares de discos imaginais e discos genitais, que consistem em uma camada de células nas estruturas epidérmicas e que são postas de lado, sendo responsáveis pela diferenciação em tecidos, órgãos e estruturas anatômicas como os apêndices específicos de cada segmento (GRIFFITHS *et al.*, 2013).

O desenvolvimento do padrão corpóreo ocorre em pouco mais de uma semana, em 3 estágios larvais com posterior diferenciação em pupa e em indivíduo adulto (Figura 3). A forma adulta, possui cerca de 2 mm de comprimento (SNUSTAD, SIMMONS, 2006).

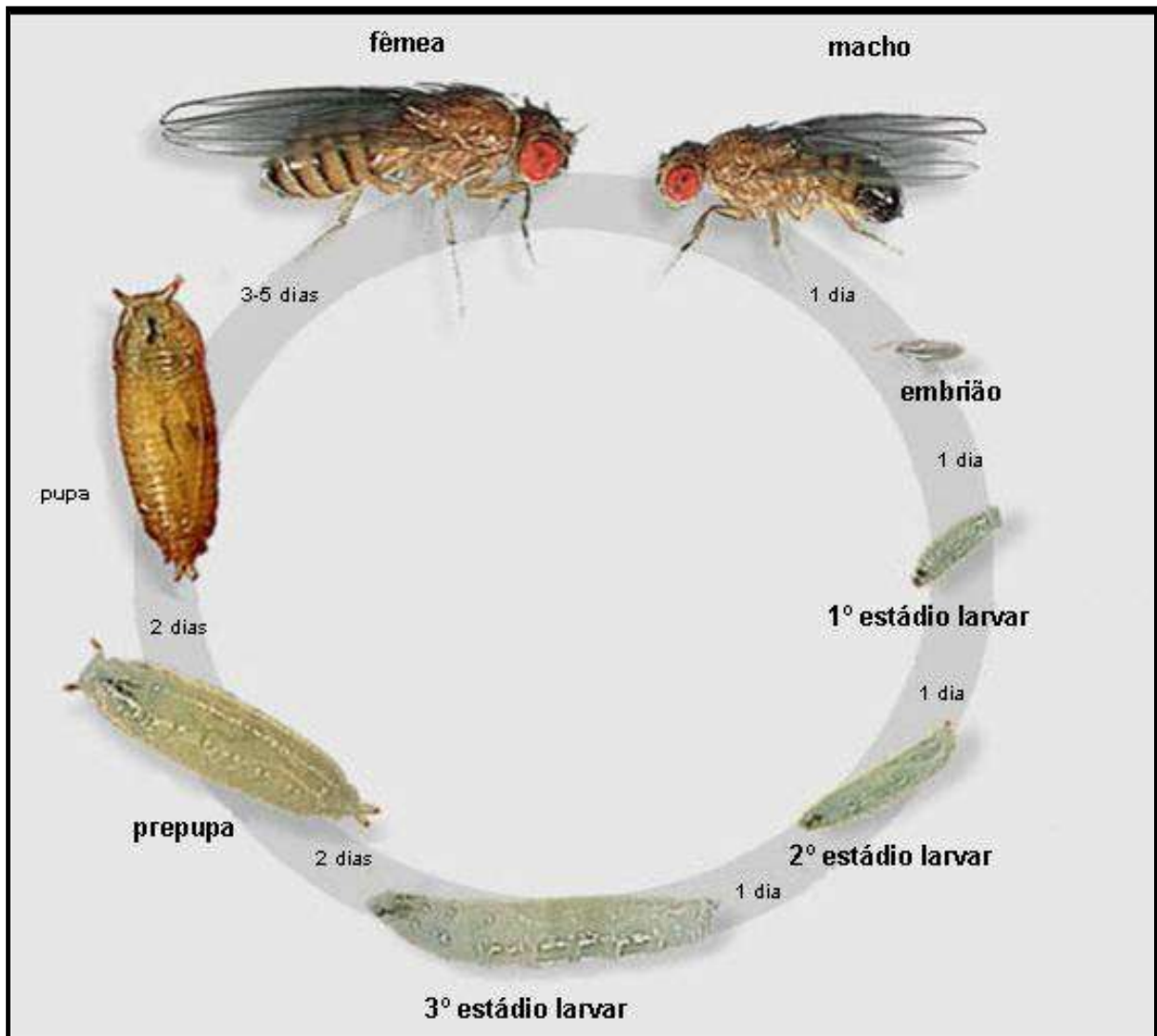


Figura 3. Ciclo de vida da mosca *Drosophila melanogaster*.

Fonte: <http://www.sc.didaxis.pt/hereditariedade/drosophila.html>. Acesso: 27/06/2015

Nesta espécie, ocorre dimorfismo sexual com características notórias (Figura 4), sendo que as fêmeas geralmente são maiores que os machos e apresentam uma alternância típica de listas claras e escuras no abdômen. Nos machos, é observada uma mancha escura na extremidade posterior do abdômen (exceto em indivíduos recém-eclodidos) e pente sexual localizado no primeiro par de pernas superiores.



Figura 4. Dimorfismo sexual da espécie *Drosophila melanogaster*. Pente sexual indicado pela seta. Fonte: Acervo pessoal.

2.5 TESTE DE DETECÇÃO DE TUMOR EPITELIAL EM *Drosophila melanogaster*

A conservação evolutiva de genes supressores de tumor entre *Drosophila* e mamíferos tem estimulado estudos de desenvolvimento de tumores em *Drosophila*, os quais podem contribuir para o entendimento de tumores em seres humanos (POTTER *et al.*, 2000). Além disso, numerosos proto-oncogenes e supressores de tumores de mamíferos são conhecidos e partilham homologia com *Drosophila* (EEKEN *et al.*, 2002). Em *Drosophila* mais de 50 genes foram mapeados e caracterizados como genes supressores de tumor, 08 deles tem função no desenvolvimento embrionário da mosca, 12 no desenvolvimento do cérebro, 19 são expressos nas células dos discos imaginais, 25 no desenvolvimento hematopoiético e 10 nas gônadas adultas (JUSTICE *et al.*, 1995).

O gene *Warts (wts)* foi identificado e caracterizado como um gene supressor de tumor (XU *et al.*, 1995). A deleção desse gene e a expressão do alelo recessivo resulta na formação de clones de células que são consideradas altamente invasivas levando à manifestação de tumor na epiderme da mosca. Esses tumores

apresentam fenótipo semelhante a uma verruga, com aspecto arredondado ou ovalado, com coloração escura (NISHIYAMA *et al.*, 1999).

A caracterização do gene *warts* em *Drosophila melanogaster* foi feito inicialmente por Justice *et al.* (1995). Segundo estes autores, a expressão do alelo recessivo esta diretamente relacionada à formação de células que são altamente invasivas, levando a formação de uma massa tecidual áspera, semelhante a uma verruga de coloração escura, que é visível devido à deformação da cutícula do tegumento do inseto. *Warts* foi caracterizado como um gene supressor de tumor devido a sua relação direta na regulação do ciclo celular e a presença de células com características cancerígenas, quando o gene é mutado.

A família de proteínas quinases governa o ciclo celular, uma vez que atuam nas vias metabólicas para garantir e regular o controle da divisão celular. Basicamente as proteínas quinases são constituídas por duas subunidades, sendo uma subunidade regulatória (ciclina) e outra catalítica (proteína quinases dependente de ciclina – CDK) as quais em conjunto formam um heterodímero. As células somáticas existem pelo menos quatro tipos de ciclinas (A, B, C, D) e no mínimo oito tipos de proteína quinases dependente de ciclina (CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK8) que atuam especificamente em um determinado momento no ciclo celular. O gene *Warts* codifica uma proteína serina/treonina quinase que exerce relevante papel na progressão do ciclo celular na mitose (NISHIYAMA *et al.*, 1999; JUSTICE *et al.*, 1995; IIDA *et al.*, 2004).

De acordo com Eeken *et al.* (2002), as proteínas quinase dependente de ciclina (CDK) e as kinases formam um complexo responsável pelo controle da regulação do ciclo celular em *Drosophila* e participam desse controle diversos genes oncogenes e genes supressores de tumor, sendo um deles o gene *wts* (*warts*). A origem e progressão da massa tumoral envolve uma série de mudanças genéticas na célula, incluindo ativação de oncogêneses e perda ou inativação de genes supressores de tumor (FELZENSWAB, PINTO, 2003).

Testes de mutagenicidade são frequentemente utilizados como indicadores para o câncer, uma vez que medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese. A mutação pode ser o estágio inicial pelo qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação do tumor (RIBEIRO, MARQUES, 2003).

Duas linhagens mutantes são utilizadas no Teste de Detecção de Tumor Epitelial em *Drosophila melanogaster*: linhagem *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e

linhagem *warts* (*wts,3-100*). A linhagem *warts* possui um marcador *wts* no cromossomo 3, que é mantida em hemizigose na presença do balanceador cromossômico *TM3, Sb¹* e possui constituição genética: ST [1] in [1] kni [ri-1] p [p] *wts* [3-17]/*TM3,S B* [1]. 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 clones de células que são consideradas altamente invasivas, acarretando na manifestação de tumor epitelial no corpo e apêndices da mosca. A linhagem *multiple wing hairs* (*mwh/mwh*) é mantida em homozigose recessiva no cromossomo 3, em região mais distal do centrômero e com constituição genética *y, mwh jv* (3-0,3).

Para avaliação do potencial carcinogênico, o Teste de Detecção de Tumor Epitelial faz uso do cruzamento utilizando essas duas linhagens de *Drosophila melanogaster*. O cruzamento (Figura 5) é feito entre machos *mwh* e fêmeas virgens *wts* gerando duas progênes:

- 1- Progênie trans-heterozigoto marcado (*wts* +/+ *mwh*);
- 2- Progênie trans-heterozigoto balanceado (*TM3, sb¹* +/+ *mwh*).

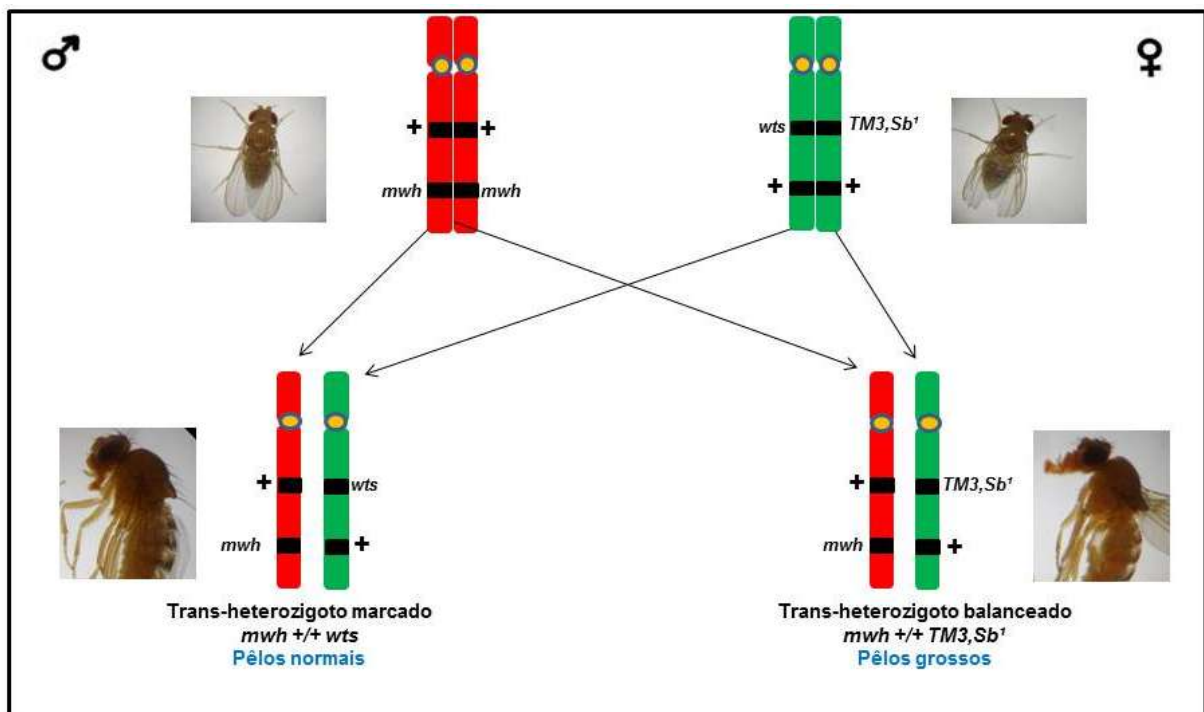


Figura 5. Representação do cruzamento realizado entre a linhagem *multiple wing hairs* (*mwh*) e a linhagem *warts* (*wts*) e seus respectivos descendentes.

As moscas (progênie) são identificadas pelo fenótipo dos pelos no corpo da mosca (Figura 6). Indivíduos pertencentes à progênie “trans-heterozigoto marcado” apresenta fenótipo de pelos longos e finos no corpo enquanto que indivíduos pertencentes à progênie “trans-heterozigoto balanceado” apresenta fenótipo de pêlo curto e espesso, devido à expressão do balanceador *TM3, sb¹*.

No Teste de Detecção de Tumor Epitelial, apenas a progênie “trans-heterozigoto marcado” (*wts +/+mwh*) é analisada.

A perda da heterozigose nas células do disco imaginal das larvas expostas ao composto teste resulta na expressão do gene *Warts* na condição recessiva, com expressão de tumor epitelial na mosca, na fase adulta. Tal evento ocorre, principalmente, por meio de mutações de ponto ou por decorrência de eventos clastogênico e aneugênico. Os tumores (Figura 7) são detectados nos diversos tecidos epiteliais do inseto (cabeça, olhos, corpo, pernas, asas e halteres) (EEKEN *et al.*, 2002).



Figura 6. Fenótipo dos pelos (setas) no corpo da mosca das diferentes progênies. Fonte: Cortesia do Laboratório de Genética/LABGEN da Universidade Federal de Uberlândia.

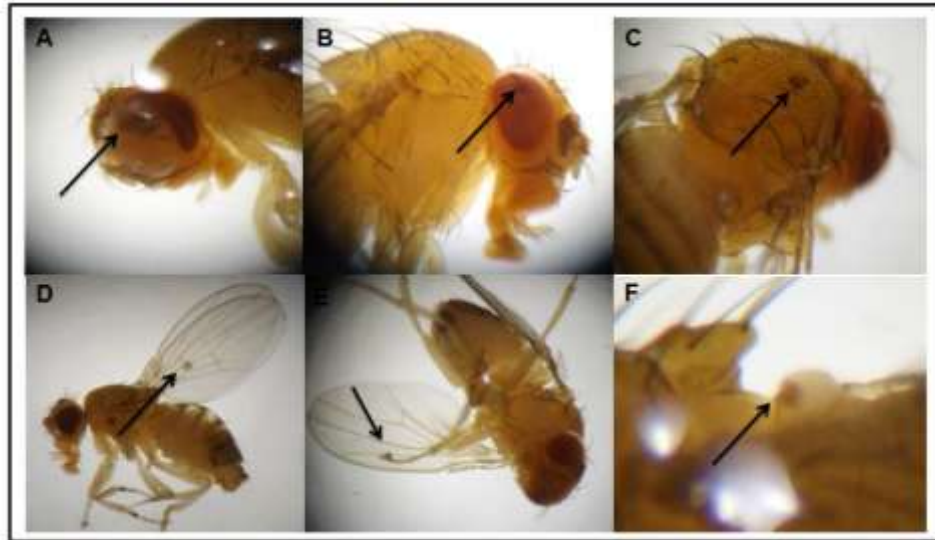


Figura 7. Expressão de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*. Na cabeça (A), no olho (B), no corpo (C), na asa (D), na perna (E) e no halter (F). Fonte: Cortesia do Laboratório de Genética/LABGEN da Universidade Federal de Uberlândia.

O Teste de Detecção de Tumor Epitelial em *D. melanogaster* oferece informações relevantes sobre o perfil carcinogênico e anti-carcinogênico de inúmeras substâncias simples e compostas (FURTADO e NEPOMUCENO, 2012; ORSOLIN e NEPOMUCENO, 2009; COSTA *et al.*, 2011; FREITAS, FREITAS e NEPOMUCENO, 2014; ALVES e NEPOMUCENO, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, pelo Teste de Detecção de Tumor Epitelial em *Drosophila melanogaster*, o potencial carcinogênico de diferentes concentrações de ivermectina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de ivermectina na sobrevivência de *Drosophila melanogaster* da linhagem *warts*.
- Avaliar a frequência de tumor epitelial nos diversos segmentos (olhos, cabeça, asas, corpo, pernas e halteres) de moscas expostas à diferentes concentrações de ivermectina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética da Universidade Federal de Uberlândia (LABGEN/UFU).

4.2 AGENTES QUÍMICOS

Ivermectina Ivomec® (CAS 70288-86-7) utilizada foi da marca Merial, São Paulo. O produto comercializado contém 1% de ivermectina.

Mitomomicina C (CAS 50-07-7) na formulação em pó liofilizado foi fabricado por Kyowa Hakko Kirin Co. Ltda. Shizuoka (Japão), embalado por Bristol-Myers Squibb S.r.l Sermoneta-Latina-Itália e importado por Bristol-Myers Squibb Farmacêutica S.A.

4.3 TESTE DE DETECÇÃO DE TUMOR EPITELIAL EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster* (TESTE WTS)

4.3.1 LINHAGENS DE *Drosophila*, CRUZAMENTO E TRATAMENTO

Duas linhagens mutantes foram usadas nesse teste: Linhagem *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3), fornecidas pelo Dr. Ulrich Graf do *Institute of Toxicology, University of Zurich (Switzerland)* e linhagem *Warts* (*wts*,3-100), fornecida pelo Dr. Júlio César Nepomuceno do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (Brasil). A linhagem *warts* possui um marcador *wts* no cromossomo 3, que é mantida em hemizigose 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 a formação de clones de células que são consideradas altamente invasivas, acarretando na manifestação de tumor epitelial no corpo e apêndices da mosca. A linhagem *multiple wing hairs* é mantida em homozigose recessiva no cromossomo 3 em uma região mais distal do centrômero.

Estas linhagens foram mantidas em estoque, em frascos contendo $\frac{1}{4}$ meio de cultura a base de banana (1230 mL de água; 16,5 g de ágar; 234 g de banana; 37,5 g de fermento biológico e 1,5 g de nipagin em pó) em estufa B.O.D (SOLAB) em ciclos luz/escuro (12h:12h) na temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $65 \pm 5\%$ de umidade relativa.

Foi realizado o cruzamento entre machos *mwh/mwh* e fêmeas virgens da linhagem *wts*, [1] in [1] kni [ri-1] p [p] *wts* [3-17]/TM3,S B [1]. Duas progênies são geradas nesse cruzamento: progênie MH, trans-heterozigoto marcado (*mwh+/+wts*) e progênie BH, trans-heterozigoto balanceado (*mwh+/+TM3, Sb¹*). No Teste de Detecção de Tumor Epitelial, apenas a progênie MH é analisada. A identificação da progênie BH é feita mediante a expressão do balanceador cromossômico TM3, Sb¹, que apresenta fenótipo de pelos curtos e espessos no corpo da mosca, o que difere da progênie MH, com fenótipo de pelos longos e finos no corpo da mosca.

A coleta de ovos do cruzamento *mwh+/+mwh* x *wts+/TM3, Sb¹* ocorreu dentro do período de 8 horas em frascos contendo meio de cultura a base de ágar (4%) e fermento biológico suplementado com sacarose. Após 72 ± 4 horas, larvas de 3^o estágio foram lavadas com água ultrapura MiliQ (Millipore) e coletadas com auxílio de peneira de malha fina. Posteriormente, as larvas foram submetidas a tratamento crônico (48 horas) até completar o processo da metamorfose. As larvas foram colocadas em *vials* (2,5 cm de diâmetro por 8 cm de comprimento) contendo 1,5 g de purê de batatas (Yoki® Alimentos S.A) e 5 mL de solução de ivermectina nas concentrações de 2×10^{-10} , 1×10^{-10} , 5×10^{-11} , $2,5 \times 10^{-11}$ ng/mL. As concentrações de ivermectina usadas nesse trabalho foram baseadas em ensaio prévio de sobrevivência em *Drosophila melanogaster* (Figura 9).

Mitomomicina C (MMC) foi usado como controle positivo na concentração de 0,1 mM. Esta concentração foi baseada em estudos de recombinação mitótica em *Drosophila melanogaster* (TSUDA; TAKEDA, 1987) e ensaios de carcinogênese (ORSOLIN, NEPOMUCENO, 2009; ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2012).

4.3.2 FIXAÇÃO DE MOSCAS E ANÁLISE DE TUMOR EPITELIAL

Para análise de tumor epitelial, adultos eclodidos do cruzamento *mwh+/+mwh* x *wts+/TM3*, *Sb¹* foram fixados em etanol 70% (v/v) e analisados sob lupa estereoscópica (Bel® Photonics) em placa de petri com glicerina.

Moscas expostas cronicamente (48 horas) às concentrações subletais de $2 \cdot 10^{-10}$ ng/ mL, $1 \cdot 10^{-10}$ ng/ mL, $5 \cdot 10^{-11}$ ng/ mL e $2,5 \cdot 10^{-11}$ ng/ mL de ivermectina foram analisadas quanto à presença de tumor epitelial nos diferentes apêndices da mosca (cabeça, olhos, corpo, pernas, asas e halteres). Para cada série testada, 200 indivíduos de ambos os sexos foram analisados. A frequência de moscas com tumor epitelial, bem como a frequência de tumor nos apêndices das moscas foi comparadas com o controle negativo (água ultrapura) (ex: moscas com um tumor – controle negativo x moscas com um tumor - $2 \cdot 10^{-10}$ ng/ mL ivermectina e cabeça - controle negativo x cabeça - $2 \cdot 10^{-10}$ ng/ mL ivermectina).

A análise baseou-se na contagem de tumores de acordo com a descrição de Justice *et al.* (1995). Os resultados foram registrados em um diagrama padrão expressando os números observados em cada parte do corpo das moscas: olhos, cabeça, corpo, asas, pernas e halteres. Para análise de tumor epitelial, os adultos eram identificados pelo fenótipo dos pelos e, apenas a progênie “trans-heterozigo marcado”, foi analisada.

4.3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças estatísticas entre a frequência de tumores epiteliais nas concentrações testadas e os controles (negativo e positivo) foram calculadas usando o teste *U*, não paramétrico, de Mann-Whitney, utilizando o nível de significância $p < 0,005$.

Comparações estatísticas referentes à taxa de sobrevivência foram feitas com o teste Chi-quadrado para razões de amostras independentes.

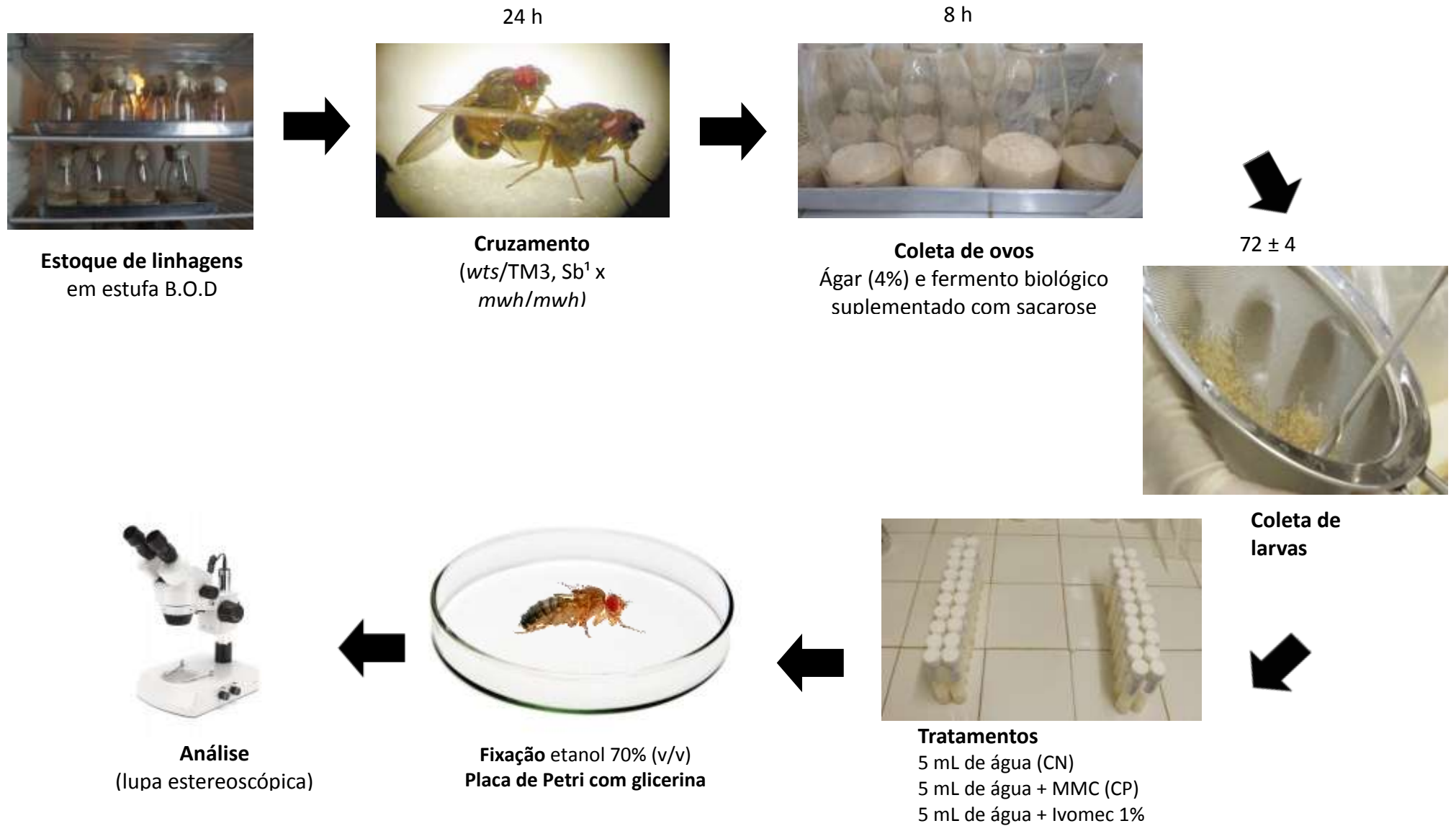


Figura 8: Sequência de procedimentos a serem adotados na metodologia descrita.

5 RESULTADOS

5.1 CONCENTRAÇÕES USADAS NO TESTE DE DETECÇÃO DE TUMOR EPITELIAL

Foi avaliado o efeito carcinogênico da ivermectina administrada cronicamente (48 h) em diferentes concentrações, via exposição tópica e oral, em *D. melanogaster*. As concentrações usadas foram escolhidas a partir de ensaio prévio de sobrevivência. Como apresentado na Figura 9 nenhuma das concentrações testadas afetou significativamente ($P < 0,05$) o processo de pupação das moscas, exceto para a concentração $4 \cdot 10^{-10}$ ng/mL de ivermectina, que interferiu no processo de metamorfose, apresentando efeito tóxico em *D. melanogaster*. Na concentração $7 \cdot 10^{-9}$ ng/mL foi observado dificuldade de locomoção das larvas, 3 h após a administração de ivermectina, sendo ainda observado a não formação de pupas decorrido 48 h de tratamento (dados não mostrados). A concentração recomendada pelo fabricante (200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) foi altamente tóxica, levando à letalidade das larvas 1 h após o tratamento (dados não mostrados).

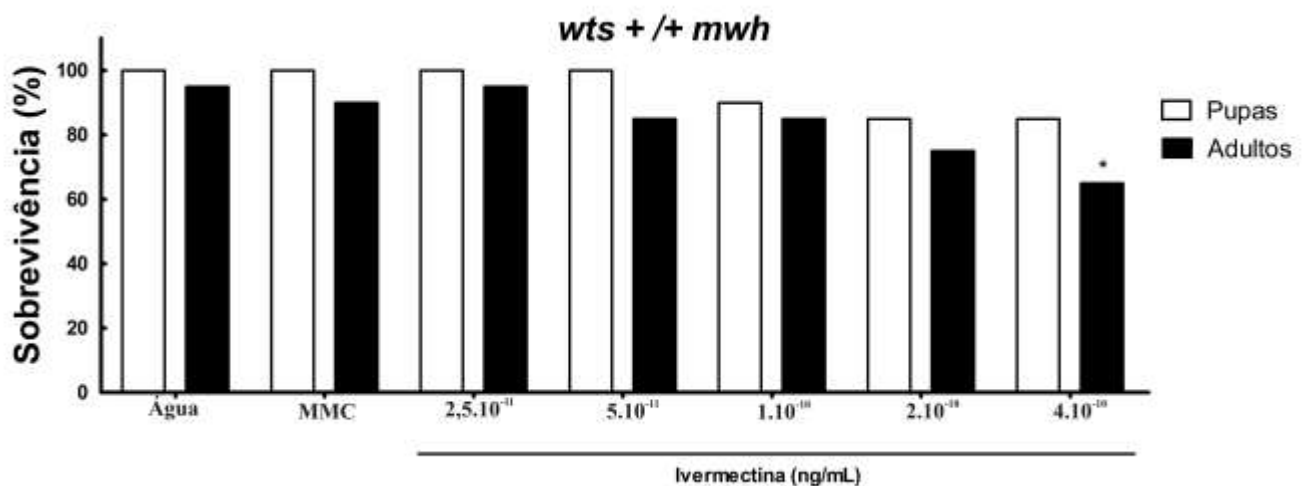


Figura 9: Taxa de sobrevivência da prole resultante do cruzamento *mwh/mwh* x *wts/TM3*, *Sb*¹. Água - Controle negativo; Mitomicina C (MMC) - 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Controle positivo.

* Diferença estatisticamente significativa na sobrevivência de *Drosophila melanogaster* de acordo com o teste do Chi-quadrado para razões de amostras independentes.

5.2 ANÁLISE DE TUMOR

Como apresentado na Tabela 1, das 200 moscas tratadas com ivermectina na concentração 2.10^{-10} ng/mL, 44 apresentaram um único tumor, 28 apresentaram de 2 a 3 tumores, 04 apresentaram de 4 a 5 tumores e 01 apresentou mais de 5 tumores. Foi observado 39 moscas com um único tumor, 19 com 2 a 3 tumores e 02 moscas com 4 a 5 tumores, após exposição crônica a 1.10^{-10} ng/mL de ivermectina. Na concentração 5.10^{-11} foram observadas 41 moscas com 1 tumor e 11 com 2 a 3 tumores. A menor concentração ($2,5.10^{-11}$ ng/mL) de ivermectina avaliada neste trabalho, induziu um único tumor em 43 moscas, 2 a 3 tumores em 11 moscas e 4 a 5 tumores em 01 mosca.

Os resultados da frequência de tumor epitelial nos grupos tratados com ivermectina obtidos nesta análise diferiram do controle negativo na densidade de moscas com 1 tumor e de 2 a 3 tumores. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) na frequência total de moscas com tumor foram observados entre o controle negativo e os grupos tratados com ivermectina.

Tanto o controle negativo (água), quanto o controle positivo (Mitomicina C) responderam ao teste. Moscas expostas a $33 \mu\text{g/mL}$ de Mitomicina C apresentaram alta frequência de tumor epitelial, diferindo estatisticamente ($P < 0,05$) em todas as densidades de tumor analisados. Moscas expostas a MMC apresentaram uma menor frequência de um único tumor, sendo observado maior número de moscas com mais de 5 tumores (Tabela 1).

A distribuição relativa da frequência de tumor epitelial nos apêndices das moscas em função das diferentes séries de ivermectina testadas é apresentada na Tabela 2.

De 70 tumores encontrados nas moscas expostas a $2,5.10^{-11}$ de ivermectina, 4,3% estavam presentes nos olhos; 14,3% na cabeça e nas asas; 44,3% no corpo; 21,4% nas pernas e 1,4% nos halteres. Dos 69 tumores encontrados nas moscas expostas a 5.10^{-11} ng/mL de ivermectina, 2,9% estavam presentes nos olhos; 10,2% na cabeça; 15,9% nas asas; 44,9% no corpo; 23,2% nas pernas e 2,9% nos halteres. Entre 85 tumores encontrados nas moscas expostas a 1.10^{-10} ng/mL, verificamos 7%; 10,6%; 14,1%; 51,8% e 16,5% da frequência de tumor estavam presentes nos olhos, cabeça, asa, corpo e pernas respectivamente. Na concentração 2.10^{-10} ng/mL de ivermectina, foram indentificados 131 tumores, sendo

que destes, 6,1% estavam nos olhos; 5,4% na cabeça; 18,3% nas asas; 47,3% no corpo; 19,1% nas pernas e 3,8% nos halteres (Tabela 3).

Em todas as séries tratadas com ivermectina, o corpo da mosca foi à região com maior número de tumor, mesmo que os resultados não tenham diferido estatisticamente do controle negativo ($P > 0,05$), exceto na maior concentração ($2 \cdot 10^{-10}$ ng/mL). Em ordem, nas pernas e asas as frequências de tumor foram maiores que os demais apêndices (exceto corpo) diferindo estatisticamente ($P < 0,05$) em todas as concentrações testadas. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) na frequência de tumor foi observada nos olhos das moscas, nas doses mais concentradas ($2 \cdot 10^{-10}$ e $1 \cdot 10^{-10}$ ng/mL de ivermectina), na cabeça, na concentração $2,5 \cdot 10^{-11}$ ng/mL e nos halteres, na concentração de $2 \cdot 10^{-10}$ ng/mL quando comparadas ao controle negativo. Na Figura 10 esta apresentada a distribuição de total de tumor epitelial em cada apêndice das moscas tratadas com MMC e ivermectina.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo e como demonstrado na Tabela 1 e 2, a diferença estatística observada entre o controle negativo e os grupos tratados com ivermectina, confirma a atividade carcinogênica do antiparasita de maneira dose dependência.

Tabela 1. Frequência de moscas com tumor epitelial observados em descendentes heterozigotos para o gene supressor de tumor *wts* de *D. melanogaster* tratados com Mitomicina C (MMC) e diferentes concentrações de ivermectina.

Tratamentos	Nº de moscas	Frequência de mosca com tumor (número de moscas com tumor)				Total de indivíduos com tumores
		1 tumor	2-3 tumores	4-5 tumores	+ 5 tumores	
Controle negativo	200	0,013(24)	0,005(02)	0,000(00)	0,000(00)	0,135(025)
MMC 33 µg/mL	200	0,040(08)*	0,125(25)*	0,145(29)*	0,660(132)*	0,970 (194)*
IVE 2.10 ⁻¹⁰ ng/mL	200	0,220 (44)*	0,140(28)*	0,020(04)*	0,005(01)	0,385(077)*
IVE 1.10 ⁻¹⁰ ng/mL	200	0,195(39)*	0,095(19)*	0,010(02)	0,000(00)	0,300 (060)*
IVE 5.10 ⁻¹¹ ng/mL	200	0,205(41)*	0,055(11)*	0,000(00)	0,000(00)	0,260(052)*
IVE 2,5.10 ⁻¹¹ ng/mL	200	0,215(43)*	0,055(11)*	0,005(01)	0,000(00)	0,275(055)*

Diagnóstico estatístico de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância ($P \leq 0,05$).

* Valores considerados diferentes do controle negativo.

MMC, Mitomicina C; IVE, Ivermectina

Tabela 2. Frequência de tumor epitelial observados nos apêndices dos descendentes heterozigotos para o gene supressor de tumor *wts* de *D. melanogaster* tratados com Mitomicina C (MMC) e diferentes concentrações de ivermectina.

Tratamento	Número de indivíduos	Frequência de tumores analisados (total de tumor)						
		olhos	cabeça	asas	corpo	pernas	halteres	Total
Controle negativo	200	0,000 (00)	0,010 (02)	0,005 (01)	0,115 (23)	0,010 (02)	0,000 (00)	0,140 (28)
MMC 33 µg/mL	200	2,000 (400)*	0,605 (121)*	2,245 (449)*	2,885 (577)*	1,020 (204)*	0,200 (40)*	8,995 (1791)*
IVE 2.10 ⁻¹⁰ ng/mL	200	0,040 (08)*	0,035 (07)	0,120 (24)*	0,310 (62)*	0,125 (25)*	0,025 (05)*	0,655 (131)*
IVE 1.10 ⁻¹⁰ ng/mL	200	0,030 (06)*	0,045 (09)	0,060 (12)*	0,220 (44)	0,070 (14)*	0,000 (00)	0,425 (85)*
IVE 5.10 ⁻¹¹ ng/mL	200	0,010 (02)	0,035 (07)	0,055 (11)*	0,155 (31)	0,080 (16)*	0,010 (02)	0,345 (69)*
IVE 2,5.10 ⁻¹¹ ng/mL	200	0,015 (03)	0,050 (10)*	0,050 (10)*	0,155 (31)	0,075 (15)*	0,005 (01)	0,350 (70)*

Diagnóstico estatístico de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância ($P \leq 0,05$).

* Valores considerados diferentes do controle negativo ($P \leq 0,05$).

MMC, Mitomicina C; IVE, Ivermectina.

Tabela 3. Porcentagem de tumor epitelial observados em apêndices de *D. melanogaster* tratados com diferentes concentrações de Ivermectina (IVE)

Tratamentos	% de tumores analisados por apêndices						Total
	olhos	cabeça	asas	corpo	pernas	halteres	
IVE $2 \cdot 10^{-10}$ ng/mL	6,1%	5,4%	18,3%	47,3%	19,1%	3,8%	131
IVE $1 \cdot 10^{-10}$ ng/mL	7%	10,6%	14,1%	51,8%	16,5%	-	85
IVE $5 \cdot 10^{-11}$ ng/mL	2,9%	10,2%	15,9%	44,9%	23,2%	2,9%	69
IVE $2,5 \cdot 10^{-11}$ ng/mL	4,3%	14,3%	14,3%	44,3%	21,4%	1,4%	70

IVE, Ivermectina.

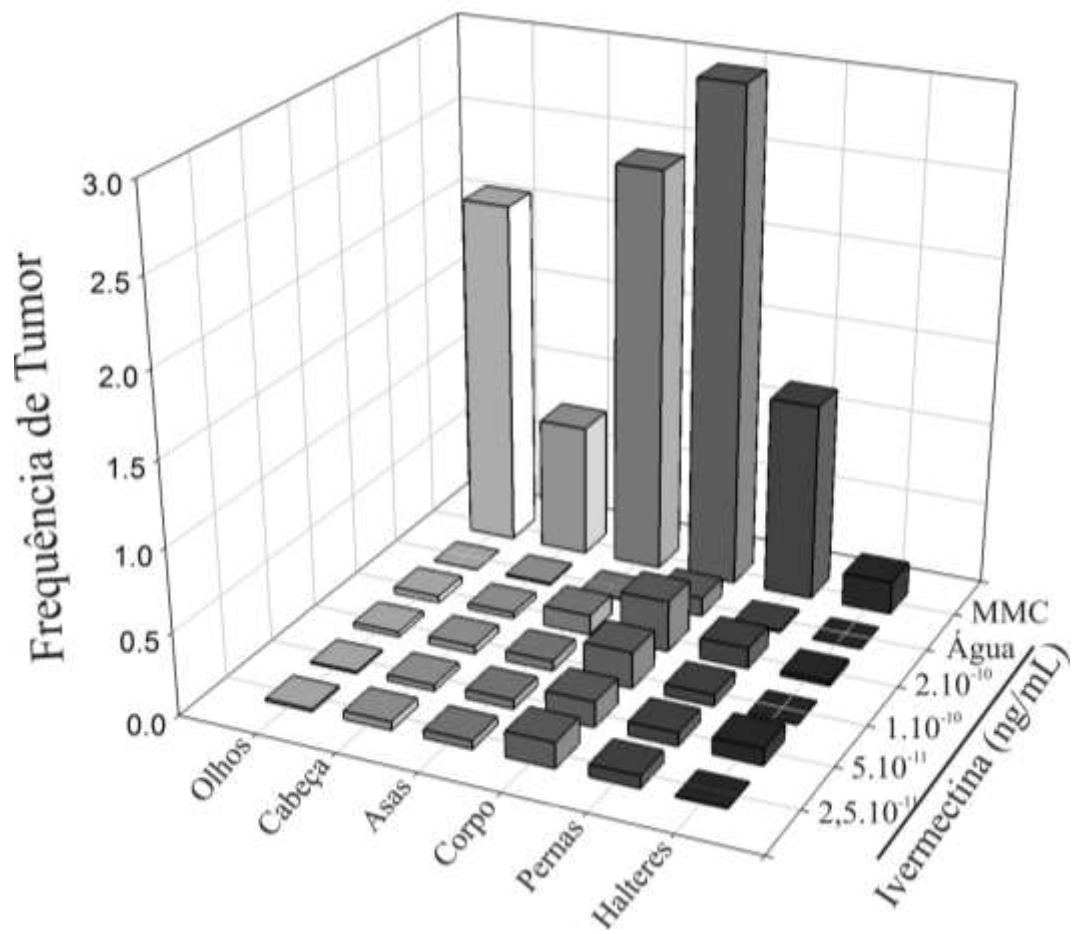


Figura 10: Distribuição de tumor epitelial nos apêndices de *D. melanogaster* tratadas com diferentes concentrações de Ivermectina.

MMC = Mitomicina, 33 µg/mL.

6 DISCUSSÃO

O teste *wts*, fundamenta-se na presença de um gene (*Warts*) que atua como gene supressor de tumor (XU *et al.*, 1995). Durante a diferenciação das células do disco imaginal de *Drosophila*, a perda da heterozigose desse gene resulta na manifestação e proliferação desordenada de células altamente invasivas, resultando na formação de tumor nos diversos apêndices da mosca. A perda da heterozigose pode ser resultante de eventos clastogênicos, aneugênicos ou por mutações de ponto (EEKEN *et al.*, 2002).

No presente estudo moscas tratadas com ivermectina apresentaram alta frequência de tumor epitelial. Como apresentado na Tabela 1, foi possível observar que a maioria das moscas que apresentaram tumor, tiveram de 1 a 3 tumores. A maioria dos tumores observados concentrou principalmente no corpo, nas asas e nas pernas da mosca (Tabela 2). Esta observação pode ser explicada em função da quantidade de células presentes nesses apêndices, visto que a chance da perda da heterozigose do gene *warts* é maior em locais com maior número de células, o que justifica a prevalência de tumores nessas regiões do corpo. Esses dados são corroborados por resultados obtidos em outras pesquisas (ORSOLIN e NEPOMUCENO, 2009; COSTA, OLIVEIRA e NEPOMUCENO, 2011; FREITAS, FREITAS e NEPOMUCENO, 2014).

De acordo com os resultados obtidos neste estudo e como demonstrado na Tabela 1 e 2, a diferença estatística observada entre o controle negativo e os grupos tratados com ivermectina, acusa a atividade carcinogênica do antiparasita de maneira dose dependência.

Estudos utilizando outros sistemas têm demonstrado efeitos negativos proporcionados pela administração de ivermectina (MOLINARI *et al.*, 2009; EL-ASHMAWY *et al.*, 2011; MOLINARI *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2014; SWEIFY, DARWISH, HAFEZ, 2015).

Molinari *et al.* (2009) avaliaram, por meio do ensaio cometa, a capacidade citotóxica e genotóxica *in vitro* de ivermectina e Ivomec® (produto formulado a base de ivermectina) em células de ovário de hamster chinês e verificaram a indução de danos clastogênicos no DNA nas concentrações de 5, 25 e 50 µg/mL, representando as primeiras evidências sobre a capacidade genotóxica *in vitro* do fármaco antiparasitária em células de mamífero. Foi constatado ainda o efeito citotóxico em

doses concentradas (50 - 250 µg/mL), somado a efeitos de atraso na progressão do ciclo celular, redução da atividade mitótica, inibição no crescimento celular e redução da atividade mitocondrial. Quando células de ovário de hamster chinês foram expostas durante 80 min a 50 µg/mL⁻¹ de ivermectina e Ivomec, foi constatado efeito genotóxico de maneira tempo dependente (0-3 h após a exposição), revelado pela frequência de quebras no DNA, pelo ensaio cometa (MOLINARI *et al.*, 2013).

Em células de vegetais, Ivomec induziu anomalias cromossômicas (células anaplásicas), indicado pelo Teste *Allium cepa*, nas doses 10µL, 30µL e 50 µL/un de ivermectina, demonstrando relação dose-dependência (MOREIRA *et al.*, 2014).

El-Ashmawy *et al.* (2011) avaliaram os efeitos de ivermectina e verapamil no desenvolvimento fetal de ratos *wistar* e o efeito genotóxico e mutagênico das moléculas, por meio do teste do micronúcleo. Os resultados revelaram perturbação do desenvolvimento fetal dos ratos tratados com ivermectina e verapamil simultaneamente, com alterações externas, viscerais e esqueléticas. Quando combinados, ivermectina e verapamil demonstraram genotoxicidade nas células embrionárias dos ratos, indicado pela redução do índice mitótico e o aumento de eritrócidos micronucleados. Ivermectina quando administrada individualmente, demonstrou genotoxicidade, revelada por diferentes tipos de aberrações cromossômicas (fragmentos e deleção de cromossomos, formação de cromossomo circular, poliploidia e formação de micronúcleos) em células somáticas e embrionárias dos organismos expostos.

Sweify, Darwish, Hafez (2015) avaliaram o efeito de ivermectina na dose recomendada (200 µg/Kg) sobre a mutagênicidade em *Mus musculus* em 1, 2, 3, 7 e 14 dias de exposição. Nesse estudo foram constatados diversos tipos de alterações cromossômicas (deleção, translocação Robertsoniana, fragmentos acêntricos, quebra cromossômica e cromossomos dicêntricos) tanto em doses únicas quanto em duas doses, em todos os intervalos de exposição. O mesmo foi observado na frequência de micronúcleos, demonstrando efeito mutagênico em todos os intervalos de exposição.

Os resultados obtidos nesses trabalhos corroboram com o presente estudo, demonstrando o potencial mutagênico de ivermectina em doses mais concentradas. A chave para alteração do material genético proporcionado pela molécula permanece obscura. Os dados desta pesquisa, quando confrontados com os demais estudos de literatura, sugerem que o mecanismo de indução de mutação causado

pela ivermectina esteja relacionado a eventos mais agressivos ao material genético, tais como eventos clastogênicos e/ou aneugênicos.

No presente estudo, não foi avaliado diretamente a forma como a ivermectina provoca a perda da heterozigose do gene *warts*. No entanto a exposição a alguns pesticidas é descrita como sendo capaz de aumentar o estresse oxidativo, resultando em morte celular (KI *et al.*, 2012; GILL e DUMKA, 2013; PARK *et al.*, 2015).

Zhu *et al.* (2013) demonstraram que a exposição à avermectina nas concentrações 20, 40 e 60 mg/Kg de dieta, pode resultar no aumento da morte celular com comitente expressão de caspase-3 no fígado dos pássaros expostos. Foram constatados danos em mitocôndrias e condensação da cromatina. A modificação de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase e glutationala peroxidase) foi responsável pelo aumento do estresse oxidativo.

Embora haja poucos trabalhos na literatura sobre a toxicocinética de ivermectina a nível molecular, Sharmeen *et al.* (2010) demonstraram que em células de mamífero (células de leucemia) a morte celular induzida pela ivermectina, pode estar diretamente associada como o aumento do estresse oxidativo, por meio da geração de espécies reativas de oxigênio.

O estresse oxidativo é natural e fundamental nos organismos, estando envolvido na produção de energia, fagocitose, sinalização intracelular, síntese de substâncias biológicas e regulação do crescimento celular (BARRETOS e DAVID, 2006). O aumento acima dos níveis normais pode, no entanto, gerar radicais livres altamente reativos promovendo oxidação de biomoléculas, tais como lipídeos, proteínas e DNA, podendo afetar a função biológica das moléculas oxidadas (MAES *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2012; ABDULLAH, 2015).

Atualmente genética de qualidade dos animais, disponibilidade de alimentos de qualidade nutricional e manejo sanitário estruturado são os alicerces para o desenvolvimento da pecuária. Os dados obtidos no presente estudo, juntamente com os de outros trabalhos demonstram aspectos negativos relacionados à instabilidade genética, o que pode resultar no comprometimento da qualidade genética de células ou população de células individuais dos animais medicados com fármacos à base de ivermectina.

7 CONCLUSÕES

A ivermectina nas concentrações de $2 \cdot 10^{-10}$, $1 \cdot 10^{-10}$, $5 \cdot 10^{-11}$ e $2,5 \cdot 10^{-11}$ ng/mL, em condições experimentais em que foram desenvolvidos os testes e em *Drosophila melanogaster* demonstrou ser carcinogênica. E em todas as séries tratadas com ivermectina, o corpo da mosca foi à região com maior frequência de tumor epitelial.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, A.H.; MOHAMMED, A.S.; RASEDEE, A.; MIRGHANI, M.E.S.; AL-QUBAISI, M.S. Induction of apoptosis and oxidative stress in estrogen receptor-negative breast cancer, MDA-MB231 cells, by ethanolic mango seed extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 1: 3-17, 2015.
- ALBERT, J.; LINGLE, D.H.; MARDER, E.; O'NEIL, M.B. A GABA-activated chloride conductance not blocked by picrotoxin on spiny lobster neuromuscular preparations. **British Journal of Pharmacology**. 87: 771-779, 1986.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Fundamentos da Biologia Celular**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed. 2006.
- ALVES, E.M.; NEPOMUCENO, J.C. Avaliação do efeito anticarcinogênico do látex do avelós (*Euphorbia tirucalli*), por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**, 9(2):125-140, dez. 2012.
- ANDRADE, H.H.R.; LEHMANN, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster*. In: **Mutagênese ambiental** (Eds) RIBEIRO, L.R; SALVADORI, D.M.F.and MARQUES, E.K. (Canoas: Ulbra). 281-307. 2003.
- ANDRADE, S.F.; SANTARÉM V.A. Endoparasiticida e ectoparasiticida. In: ANDRADE, S.F. (ed.) **Manual Terapêutica Veterinária**. 2a ed. Roca, SP. p.469-470. 2002.
- ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: Agra FNP Pesquisas, 2010. 360p.
- AYRES, M.C.C.; ALMEIDA, M.A. Agentes Antinematódeos. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 453-465. 1999.
- AYRES, M.C.C.; ALMEIDA, M.A.O.. Agentes antinematódeos, Agentes antiparasitários. In: SPINOSA H.S.; GÓRNIK S.L.; BERNADI M.M. (ED.) **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p.476-488. 2002.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G; DE PAULA, S. O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: Conceitos, implicações e fatores modulatórios. **Revista Nutrição**. 23: 629-646, 2012.
- BARRETOS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. 1: 113-123, 2006.

- BELTRAO-BRAGA, P. C. B.; TEIXEIRA, V. R.; CHAMMAS, R. Aspectos moleculares da transformação celular: conceitos e implicações, in: WAITZBERG, Dan Linetzky. **Dieta, nutrição e câncer**. São Paulo: Atheneu.6 : 79-87. 2006.
- BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. **Farmacologia e terapêutica veterinária**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.
- BORGES, F.A. **Farmacocinética e atividade endectocida de uma nova formulação contendo avermectinas em bovinos**. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal –SP, 88p., 2003.
- BORGES, F.A.et al. Resistência de *Haemonchus placei*, *Cooperia punctata* e *C. spatulata* à ivermectina em bovinos no estado de Minas Gerais, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA 13. 2004, Ouro Preto, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 13 (1): 249, 2004.
- CAMPBELL, W. C.; BENZ, G. W. Ivermectin: a review of efficacy and safety. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. 7: 1-16, 1984.
- CHARLES, T.P., FURLONG, J. A survey of dairy cattle worm control practices in southeast Brazil. **Parasitologia Veterinária**. 65–73. 1996.
- COOP, R.L.; HOLMES, P.H. Nutrition and parasite interaction. **International Journal of Parasitology**, v. 26, p. 951-962, 1996.
- COSTA, R. M. A.; MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia: ciência e desenvolvimento**, v.3, n.12, 2000.
- COSTA, A.J. Atividade endectocida de uma inovação quimioterápica (ivermectina + abamectina): resultados de 12 avaliações experimentais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 13 (1): 171-177, 2004.
- COSTA, A.J.; OLIVIERA, G.P.; ARANTES, T.P.; BORGES, F.A.; MENDONÇA, R.P.; SANTANA, L.F.; SAKAMOTO, C.A.M. Avaliação comparativa da ação anti-helmíntica e do efeito no desenvolvimento ponderal de bezerros tratados com diferentes avermectinas de longa ação. **A hora veterinária**. 139:31-34, 2004.
- COSTA, W.F.; OLIVEIRA, A.B.; NEPOMUCENO, J.C. Laphacol as an epithelial tumor inhibitor agente in *Drosophila melanogaster* heterozygote for tumor suppressor gene wts. **Genetics and Molecular Research**, 10: 3236-3245, 2011.
- COSTA, F. M.; NETTO, A. D. P. Desenvolvimento e aplicação de métodos para a determinação de ivermectina em medicamentos de uso veterinário. **Química Nova**. 35 (3): 616-622, 2012.
- DIAS, Stéfany. Proibido o uso de ivermectina em gado de corte no Brasil. **Revista Agropecuária**. 2015

- DÜSMAN, Elisângela et al. Principais agentes mutagênicos e carcinogênicos de exposição humana. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**. 7(2): 66-81, mai./ago., 2012.
- EEKEN, J. C. J.; KLINK, I.; VEEN, B. L. V; FERRO, W. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene *wts*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 40: 277-282. 2002.
- EGERTON, J.R.; BIRNBAUM, J.; BLAIR, L.S.; CHABALA, J.C.; CONROY, J.; FISHER, M.H.; MROZIK, H.; OSTLIND, D.A.; WILKINS, C.A.; CAMPBELL, W.C. 22,23-Dihydroavermectin B1, a new broad-spectrum antiparasitic agent. **British Veterinary Journal**. 136. 88-97. 1980.
- EL-ASHMAWY, I. M., EL-NAHAS, A. F., BAYAD, A. E. Teratogenic and cytogenetic effects of ivermectin and its interaction with P-glycoprotein inhibitor. **Research in Veterinary Science**. 90. 116–123. 2011.
- FAO. Module 2.helminths: anthelmintic resistance: diagnosis, management and prevention.**Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants**. FAO:Roma. 78-118, 2004.
- FELZENSZWALB, I.; PINTO, L. F. R. Genética do Câncer Humano. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003.
- FISHER, M.H.; MROZIK, H. Chemistry. In; CAMPBELL, W.C. (ed.) **Ivermectin and abamectin**. Springer – Verlag, Nova Iorque. 1-23, 1989.
- FREITAS, C.R.; FREITAS, N.R.; NEPOMUCENO, J.C. Avaliação do efeito anticarcinogênico da rutina, por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**. 11: 247-257, 2014.
- FONSECA, C.A; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Informa**. 16: 7-8, 2004.
- FURTADO, S.G.; NEPOMUCENO, J.C. Redução de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*, pela enzima metaloprotease isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*, por meio de teste *wts* (Warts). **Perquirere**. 9: 224-240, 2012.
- GEARY, T.G.; THOMPSON, D.P. Development of antiparasitic drugs in the 21st century. **Veterinary Parasitology**, v. 115, p. 167-184, 2003.
- GILL, K.K.; DUMKA, V.K. Antioxidant status in oral subchronic toxicity of fipronil and fluoride co-exposure in buffalo calves. **Toxicology and Industrial Health**. 1-19: 2013.
- GRAF, U. The Actual Situation of SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) in *D.melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**. v.6, n.2, 2006.
- GRAF, U.; SPANÓ, M.A.; GUZMÁN, J. R.; ABRAHAM, S. K.; ANDRADE, H. H. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: an efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure

compounds or complex mixture as well as for studies of antigenotoxicity. **African Newsletter on Occupational Health and Safety**. 6: 9-13, 1996.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S.R.; CARROLL, S.B.; DOEBLEY, J. Introdução à Genética: 10ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2013.

HIB, J.; ROBERTIS, E. M. F. **Bases da biologia celular e molecular**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998.

IIDA, S.I.; HIROTA, T.; MORISAKI, T.; MARUMOTO, T.; HARA, T.; KUNINAKA, S.; HONDA, S.; KOZAI, K.I.; KAWASUJ, M.; PALLAS, D.C.; SAYA, H. Tumor suppressor WARTS ensures genomic integrity by regulating both mitotic progression and G1 tetraploid checkpoint function. **Oncogene**. 23: 5266-5274, 2004.

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

JENNINGS, B. H. *Drosophila* – a versatile model in biology e medicine. **Materials Today**, 14: 190-195, 2011.

JUSTICE, R.W.; ZILIAN, O.; WOODS, D.F.; NOLL, M.; BRYANT, P.J. The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinases and is required for the control of cell shape and proliferation. **Genes & Development**. 9: 534-546, 1995.

KI, Y.; LEE, J.E.; PARK, J.H.; SHIN, I.C.; KOH, H.C. Reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase induce apoptotic death of SH-SY5Y cells in response to Fipronil. **Toxicology Letters**. 211: 18-28, 2012.

KOLBERG, D. I. S.; PRESTA, M. A.; WICKERT, C.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R.; **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 20:1220, 2009.

LEES, K.; MUSGAARD, M.; SUWANMANEE, S.; BUCKINGHAM, S. D.; BIGGIN, P.; SATTELLE, D. Actions of Agonists, Fipronil and Ivermectin on the predominant *In vivo* Splice and edit variant (RDL_{bd}, I/V) of the *Drosophila* GABA receptor expressed in *Xenopus laevis* Oocytes. **Plos One**, v. 9, p. 1-8, 2014.

LIMA, W.S. Verminose dos bovinos de corte no Brasil. **Bom Manejo**, v. 3, p. 5-7, 1994.

LOPES, A. A.; OLIVEIRA, A. M. PRADO, C. B. C. Principais genes que participam da formação de tumores. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, vol.2, n.2, segundo semestre, 2002.

LOURO, I. D; LLERENA Jr., J.C.; MELO, M. S. V.; ASHTON-PROLLA, P.; CNFORTI, N. F. **Genética Molecular do Câncer**. 2.ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

- MACHADO N.M.; LOPES, J.C.; SATURNINO, R.S.; FAGAN, E.B.; NEPOMUCENO, J.C. Lack of Mutagenic effect by multi-walled functionalized carbon nanotubes in the somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food And Chemical Toxicology**. 62: 355-360, 2013.
- MAES, M.; RUCKOACH, P.; CHANG, Y.S.; MAHANONDA, N.; BERK, M. Multiple aberrations in shared inflammatory and oxidative & nitrosative stress (IO&NS) pathways explain the co-association of depression and cardiovascular disorder (CVD), and the increased risk for CVD and due mortality in depressed patients. **Progress in Neuro- Psychopharmacology Biological & Psychiatry**. 35: 769-783, 2011.
- MARTINS, J.R.; FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. **Veterinary Record**. 149 (2): 64, 2001.
- McKELLAR, Q.A.; BENCHAOUI, H. Avermectins and milbemicycins. **Journal Veterinary Pharmacology Therapy**, v.19, p. 331-351, 1996.
- MIGUEL, R.S. Ivomec® : Mocinho? Vilão? Ou outra vítima de mau uso??? **Revista Técnica Anual**, junho 1998.
- MOLINARI, G.; SOLONESKI, S.; REIGOSA, M.A.; LARRAMENDY M.L. In vitro genotoxic and cytotoxic effects of ivermectin and its formulation ivomec on chinese hamster ovary (chok1) cells. **Journal of Hazardous Materials**. 165: 1074-1082, 2009.
- MOLINARI, G.; KUJAWSKI, M.; SCUTO, A.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M.L. DNA damage Kinetics and apoptosis in ivermectin-treated chinese hamster ovary cells, **Journal of Applied Toxicology**. 33: 1260-1267, 2013.
- MOREIRA, T.C.; MOREIRA, M.G.C.; MOREIRA, V.C.; LEOPOLDO, J.R.; AGOSTINHO, L.A. Avaliação da toxicidade e da genotoxicidade da ivermectina e da deltametrina através de bioensaio com *Allium cepa*. **Revista Científica da Faminas**. 9 (1), jan.-abr. 2014.
- NASCIMENTO, A.A.; VASCONCELOS, O.T.; BORGES, F.A.; CHECHI, J.P.; FREDERICO, M.A.; SILVA, G.S.; OLIVEIRA, G.P.; COSTA, A.J. Atividade anti-helmíntica de uma nova formulação de longa ação contendo ivermectina 2,25% + abamectina 1,25%, no tratamento de bovinos naturalmente infectados por nematódeos parasitos. **A Hora Veterinária**, ano 23, edição extra. 5, 33-36, 2003.
- NISHIYAMA, Y.; HIROTA, T.; MORISAKI, T.; HARA, T.; MARUMOTO, T.; IIDA, S.; MAKINO, K.; YAMAMOTO, H.; HIRAOKA, T.; KITAMURA, N.; SAYA, H. A human homolog of *Drosophila warts* tumor suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. **FEBS Letters**, 459, 159-165, 1999.

- OLIVEIRA, G.P.; BUZZULINI, C.; ARANTES, T.P.; FREDERICO, M.A.; SOARES, V.E.; CASTAGNOLLI, K.C.; COSTA, A.J. Avaliação terapêutica da associação ivermectina 2,25% + abamectina 1,25% no tratamento de bovinos naturalmente infestados por larvas de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Díptera: Cuterebridae). **A Hora Veterinária**, ano 23, edição extra, 5, 29-32, 2003.
- ORSOLIN, P.; 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**, 5, 55-69, 2009.
- ORSOLIN, P.; NEPOMUCENO, J.C. **Avaliação do potencial mutagênico, recombinogênico e carcinogênico do Orlistat em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia. 2011.
- 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**, 50, 2598-2604, 2012.
- PARK, J.H.; PARK, Y.S.; LEE, J.B.; PARK, K.H.; PAIK, M.K.; JEONG, M.; KOH, H.C. Meloxicam inhibits Fipronil-induced apoptosis via modulation of the oxidative stress and inflammatory response in SH-SY5Y cells. **Journal of Applied Toxicology**. 1-15: 2015.
- PERRY, B.D., RANDOLPH, T.F., MCDERMOTT, J.J., SONES, K.R., THORNTON, P.K. Investing in Animal Health Research to Alleviate Poverty. **ILRI (International Livestock Research Institute)**, Nairobi, Kenya, 148 pp. 2002.
- POTTER, C.J.; TURENCHALK, G.S and XU, T. *Drosophila* in cancer research, an expanding role; **Trends Genet.** 16. 33-39. 2000.
- READ, A. P.; STRACHAN, T. **Genética molecular humana**. 2 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2002.
- REITER, L. T.; POTOCKI, L.; SAM, C.; GRIBSKOV, M.; BIER, E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. **Genome Research**, 11, 1114-1125, 2001.
- RIBEIRO, L.R., MARQUES, E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F., MARQUES, E.K. (Orgs.). **Mutagênese ambiental**, Canoas: Ulbra, p. 21-28, 2003.

- RODRIGUES, D. C.; STECKELBERG, A.; LOPES, W. D. Z.; SANTANA, L. F.; MENDONÇA, R. P.; SOARES, V. E.; BORGES, F.A.; et al. **Atividade anti-helmíntica da associação ivermectina**. UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil. NFT Alliance. 2012.
- ROGER, P.A. The impact of disease and disease prevention on welfare in sheep. In: Dwyer, C.M. (Ed.), **Animal welfare** volume 6: The Welfare of Sheep. Springer. 2008.
- SANGSTER, N. C. Anthelmintic resistance: past, present and future. **Int. J. Parasitol.** 29: 115-124, 1999.
- SANTOS, R. **Prevenção, diagnóstico precoce e tratamento de câncer**. 2006. Centro avançado de Prevenção do Câncer. Disponível em: <http://www.prevencaodecancer.com.br/002_b.htm>. Acesso em: 20/06/15.
- SIDOROV, R. A. UGNIVENKO, E. G.; KHOVANOVAE, E. M.; BELISTSKY, G. A. Induction of tumor clones in *Drosophila melanogaster* wts/+ heterozygotes with chemical carcinogenesis. **Mutation Research**. 181-191, 2001.
- SILVA, L.M.; NEPOMUCENO, J.C. Efeito modulador da polpa da graviola (*Annona muricata*) sobre a carcinogenicidade da mitomicina C, avaliado por meio do teste para detecção de clones de tumor (*warts*) em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**, 8, 80-94, 2011.
- SIMON, Y.J. **The Toxicology and Biochemistry of Inseticides**. CRC Press, 1-6, 2008.
- SHARMEEN, S.; SKRTIC, M.; SUKHAI, M.A.; HURREN, R.; GRONDA, M.; WANG, X.; FONSECA, S.B.; SUN, H.; WOOD, T.E.; WARD, R.; MINDEN, M.D.; BATEY, R.A.; DATTI, A.; WRANA, J.; KELLEY, S.O.; SCHIMMEN, A.D. The antiparasitic agent ivermectin induces chloride-dependent membrane hyperpolarization and cell death in leukemia cells. **Blood**. 116: 3593-3603, 2010.
- SHOOP, W.L.; MROZIK, H.; FISHER, M.H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Veterinary Parasitology**. 59 (2): 139-156, 1995.
- SHOOP, W.L.; SOLL, M. Chemistry, pharmacology and safety of the macrocyclic lactones. In: VERCRUYSSSE-J; REW-RS (ed.), **Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy**. CAB International, Wallingford, UK. 1-29, 2002.
- SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. Cellular reproduction and model genetic organisms, in: **Principles of genetics**. 4. ed. Wiley. 2: 17-41, 2006.

- SWEIFY, K.M.; DARWISH, I.A.E.M.; HAFEZ, D.D.A.E.M. The cytogenetic potential of ivermectin on bone marrow cells of mice *in vivo*. **Journal of Environmental Science**. 9: 17-29, 2015.
- TSUDA, H.; TAKEDA, N. Effect of tumor promoter TPA on spontaneous and mitomycin C induced mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**. 189: 375-379, 1987.
- VERÍSSIMO, C. J. **Alternativas de controle da verminose em pequenos ruminantes**. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 2008. 127 f. : il.
- VIDOTTO, O. **Estratégias de combate aos principais parasitas que afetam os bovinos**. Anais do Sul- Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil / editores Geraldo Tadeu dos Santos et al. – Maringá : UEM/CCA/DZO – NUPEL. 192-212, 2002. Disponível em: <<http://www.nupel.uem.br/ectoparasitas.pdf>>. Acesso em: 18 mar 2015.
- XU, T.; WANG, W.; ZHANG, S.; STEWART, R. A.; YU, W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. **Development**, 121, 1053-1063, 1995.
- ZHU, W.J.; LI, M.; LIU, C.; QU, J.P.; MIN, Y.H.; XU, S.W.; LI, S. Avermectin induced liver injury in pigeon: Mechanisms of apoptosis and oxidative stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 98: 74-81, 2013.