RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 21/06/2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CÂMPUS DE DRACENA

João Rodolfo Domingues Mansano
Médico

TOXICIDADE DA IVERMECTINA EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2)

Dracena
Dezembro 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA

João Rodolfo Domingues Mansano
Médico

TOXICIDADE DA IVERMECTINA EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2)

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Unesp, Câmpus de Dracena como parte das exigências obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto

Dracena
Dezembro 2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvida pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação
Campus de Dracena

M286t Mansano, João Rodolfo Domingues.
Toxicidade da ivermectina em células de hepatocarcinoma humano (HepG2). -- Dracena: [s.n.], 2022.
61 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2022.

Orientador: Fábio Erminio Mingatto

1. Avermectinas. 2. Fígado. 3. Citotoxicidade. 4. Mitocondria. I. Título.

Bibliotecário Fábio Sampaio Rosas
CRB 8/6665

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Dracena

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: TOXICIDADE DA IVERMECTINA EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2)

AUTOR: JOÃO RODOLFO DOMINGUES MANSANO
ORIENTADOR: FÁBIO ERMINIO MINGATTO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal, área: Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO (Participaçao Virtual)
Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - FCAT - UNESP - Dracena / FCAT/Dracena - Unesp

Profa. Dra. JAQUELINE DALBELLO BILLER (Participaçao Virtual)
Departamento de Produção Animal - DPA / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - FCAT - UNESP

Profa. Dra. JÉSSICA ANTONINI TROIANO (Participaçao Virtual)
Departamento de Medicina / UNIFADRA - Fundação Dracenense de Educação e Cultura

Dracena, 21 de dezembro de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

João Rodolfo Domingues Mansano, nascido em 13 de Janeiro de 1968, na cidade de Dracena, estado de São Paulo, filho de Delcinha Domingues Iglésias Mansano e João Mansano Thomé. Em Fevereiro de 1987 ingressou no curso de medicina na Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo-SP, curso que concluiu em 1992. No dia 2 de Dezembro de 1992, colou grau recebendo a graduação de Médico. Em Fevereiro de 1993 iniciou Residência Médica em Endoscopia Peroral, concluindo-a em 31 de Janeiro 1996. Recebeu o título de Especialista em Endoscopia Peroral (Endoscopia das Vias Aéreas e Endoscopia das Vias Digestivas Superiores) pela Associação Médica Brasileira e Sociedade de Endoscopia Peroral em 4 de Maio de 1996, homologado pela Associação Médica Brasileira em 7 de Maio de 1999. Também em 4 de Maio de 1996 recebeu o título de Especialista em Endoscopia Digestiva pela Associação Médica Brasileira e Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva, homologado pela Associação Médica Brasileira em 30 de Agosto de 2004. Em Fevereiro de 2019 ingressou como professor de tutoria do curso de Medicina da União das Faculdades de Dracena (UNIFADRA) cargo que ocupa até os dias atuais. Iniciou o curso de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Animal, em nível de mestrado, pela Universidade Estadual Paulista (UNESP) “Júlio de Mesquita Filho” em 1 de Março de 2021 – programa interunidades dos Câmpus de Ilha Solteira e Dracena, realizando estudos na área de “Bioquímica Metabólica e Toxicológica” sob a orientação do Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto. Foi aprovado em sua defesa de tese em 21 de Dezembro de 2022.

DEDICATÓRIA

À minha família que sempre me apoiou durante toda esta etapa. A meus filhos, João Victor Storto Mansano e Eduardo Storto Mansano, por entenderem pelos momentos de ausência e em especial à minha esposa Vanessa Cristina Storto Mansano por suportar os momentos de dificuldade, me encorajar e me confortar.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me permitiu ter saúde e paciência para concluir este desafio. A meus pais, Delcinha Domingues Iglésias Mansano e João Mansano Thomé (“in memoriam”) que me ensinaram a ser um homem íntegro, correto, paciente e trabalhador. À minha família que me incentivou e encorajou para concluir o mestrado.

À Camila Araújo Miranda pelo auxílio imprescindível nas análises e em especial ao Professor Doutor Fábio Erminio Mingatto pela orientação, paciência e dedicação que sempre apresentou durante todo o Mestrado.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT) que disponibilizou seus professores e área física para a realização desta pesquisa.

Aos Técnicos dos laboratórios da (FCAT) pelo auxílio nas análises.

“O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

EPÍGRAFE

“O primeiro dever da inteligência é desconfiar dela mesma.” (*Albert Einstein)*.

RESUMO

A ivermectina (IVM) é um antiparasitário semissintético derivado da abamectina, uma das avermectinas naturais. Sua ação ocorre pela grande afinidade aos receptores de glutamato e do ácido gama-aminobutírico, encontrados no sistema nervoso central. O fígado, promove metabolização e excreção da IVM e por isso pode representar risco de toxicidade hepática. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da IVM em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) para elucidar os mecanismos relacionados à sua toxicidade. Foram avaliadas a citotoxicidade (proliferação, viabilidade, atividade metabólica e integridade da membrana celular), a atividade mitocondrial (potencial de membrana mitocondrial e concentração celular de ATP) e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON). As células HepG2 foram tratadas com 6 concentrações de IVM (1; 2,5; 5; 7,5; 10 e 25 µM), com 3 repetições e avaliações após 24 h e 48 h de incubação. A IVM levou à diminuição da proliferação celular iniciando a partir da dose de 1 µM, aumentando progressivamente de maneira dose e tempo dependentes. A atividade metabólica, avaliada pelo teste de MTT também apresentou diminuição dose e tempo dependentes, iniciando a partir da dose de 2,5 µM para os dois tempos analisados. O teste de exclusão do azul de tripan mostrou diminuição da viabilidade celular a partir de 2,5 µM no tempo de 24 h e em todas as dosagens testadas no tempo de 48 h. A IVM afetou a integridade das membranas celulares em todas as dosagens testadas tanto para o tempo de 24 h quanto para 48h. Foi observada também a diminuição do potencial de membrana mitocondrial a partir da dose de 5 µM para o tempo de 24 h enquanto que no tempo de 48 h o efeito ocorreu em todas as dosagens testadas. A concentração de ATP diminuiu a partir da dose de 5 µM para o tempo de 24 h. No tempo de 48 h a diminuição foi mais intensa, iniciando a partir de 1 µM, e tornando-se máxima a partir de 7,5 µM. A IVM estimulou a produção de ERON em todas as dosagens testadas, ultrapassando 50% de aumento a partir da dose de 7,5 µM no tempo de 24 h e 5 µM no tempo de 48 h. Os resultados mostram que a IVM apresenta sinais de citotoxicidade em células HepG2, desencadeados pela diminuição da atividade mitocondrial levando à diminuição da produção de ATP e, consequentemente, diminuindo a atividade metabólica, ocorrendo sincronicamente à elevação de ERON, que desencadeia o estresse oxidativo.

Palavras chave: Avermectinas. Fígado. Citotoxicidade. Mitocondria.

ABSTRACT

Ivermectin (IVM) is a semi-synthetic antiparasitic derived from abamectin, one of the natural avermectins. Its action occurs due to its great affinity to glutamate and gamma-aminobutyric acid receptors, found in the central nervous system. The liver promotes metabolization and excretion of IVM, representing a risk of toxicity to this organ. The aim of this study was to evaluate the effects of IVM on human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells to elucidate the mechanisms related to its toxicity. Cytotoxicity (proliferation, viability, metabolic activity and cell membrane integrity), mitochondrial activity (mitochondrial membrane potential and cellular ATP concentration) and accumulation of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) were evaluated. HepG2 cells were treated with 6 concentrations of IVM (1; 2.5; 5; 7.5; 10 and 25 μM), with 3 repetitions and evaluations after 24 h and 48 h of incubation. IVM led to a decrease in cell proliferation starting at a dose of 1 μM, progressively increasing in a dose and time dependent manner. The metabolic activity, evaluated by the MTT test, also showed a dose and time dependent decrease, starting from a dose of 2.5 μM for the two analyzed times. The trypan blue exclusion test showed a decrease in cell viability from 2.5 μM at 24 h and at all dosages tested at 48 h. IVM affected cell membrane integrity at all dosages tested for both 24h and 48h time. A decrease in the mitochondrial membrane potential was also observed from the dose of 5 μM to the time of 24 h while at the time of 48 h the effect occurred in all dosages tested. The ATP concentration decreased from the 5 μM dose to the 24 h time. In the time of 48 h the decrease was more intense, starting from 1 μM, and becoming maximum from 7.5 μM. The IVM stimulated the production of RONS in all tested dosages, surpassing 50% of increase from the dose of 7.5 μM in the time of 24 h and 5 μM in the time of 48 h. Results show that IVM presents cytotoxicity in HepG2 cells, triggered by a decrease in mitochondrial activity that leads to a decrease in ATP production and, consequently, a decrease in metabolic activity, occurring synchronously with the increase in RONS, that triggers oxidative stress.

Keywords: Avermectins. Liver. Cytotoxicity. Mitochondria.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\psi_m$	Potencial elétrico de membrana mitocondrial
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
CCCP	Carbonilcianeto-m-clorofenilhidrazona
CYP	Citocromo P450
CM-H_2DCFDA	(5,6-clometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceina diacetato, acetil éster)
DHL	Desidrogenase lática
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPM	Erro padrão da média
ERON	Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio
FA	Fosfatase alcalina
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
GAMA-GT	Gama glutamil transferase
GLU	Glutamato
HepG2	Linhagem celular de Hepatocarcinoma Humano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IVM	Ivermectina
MDA	Malondialdeído
MEM	Meio "Minimum Essential Medium"
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
MTT	Corante Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2il) -2,5 difeniltetrazólio
ONU	Organização das Nações Unidas
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
SNC	Sistema Nervoso Central
SRB	Corante sulforodamina B
TMRM	Tetrametilrodamina metil éster
Tris	Tris-(hidroximetil) amino metano
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química das avermectinas naturais. 17

Figura 2 - Estrutura química da Abamectina. 19

Figura 3 - Estrutura química das Avermectinas e da Ivermectina. 20

Figura 4 - Representação esquemática do mecanismo de ação da ivermectina. Receptores de glutamato abrindo os canais de cloro causando hiperpolarização do neurônio. 21

Figura 5 - Biópsia de fígado humano após administração de 300 µg/kg de peso de ivermectina mostrando infiltrado inflamatório intralobular, macrófagos carregados com material ceroide, necrose confluente perivenular e apoptose intralobular. 24

Figura 6 - Biópsia de fígado de ratos machos albinos, 24 horas após a última dosagem (8a semana) de ivermectina (0,4mg/Kg de peso), mostrando áreas focais de necrose, caracterizadas pela perda de detalhes celulares, com núcleos picnocíticos ou ausência de núcleo 26

Figura 7 - Visão microscópica das células HepG2 (utilizando objetiva com aumento 10x) 31

Figura 8 - Imagens representativas da câmara de Neubauer, utilizada para o teste de exclusão do azul de tripan 35

Figura 9 - Diminuição da quantidade de proteína nas células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina 39

Figura 10 - Atividade metabólica das células HepG2, avaliada por meio da capacidade em reduzir o corante MTT, após exposição a diferentes concentrações de ivermectina 41

Figura 11 - Aumento da atividade da LDH (U/L) no meio de cultivo (extracelular) das células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina 43

Figura 12 - Diminuição da viabilidade das células HepG2 verificada pelo teste de exclusão do azul de tripan, após exposição a diferentes concentrações de ivermectina 45

Figura 13 - Potencial de membrana mitocondrial nas células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina 47

Figura 14 - Concentração de ATP nas células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina 49

Figura 15 - Acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) nas células HepG2 após exposição a diferentes concentrações de ivermectina (1; 2,5; 5; 7,5; 10 e 25 µM) por 24 h (A) e 48 h (B) 51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
2 OBJETIVOS 16
2.1 Objetivo Geral 16
2.2 Objetivos Específicos 16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
3.1 Avermectinas 17
3.2 Ivermectina 19
3.3 Toxicidade da Ivermectina 22
3.4 Fígado e Biotransformação de Xenobióticos 27
3.5 Estresse Oxidativo, Radicais Livres e Sistemas Antioxidantes 28
3.6 Células HepG2 29
4 MATERIAL E MÉTODOS 32
4.1 Reagentes 32
4.2 Cultura das Células HepG2 32
4.3 Ensaios de Citotoxicidade 33
4.3.1 Ensaio de Proliferação Celular 33
4.3.2 Ensaio de Atividade Metabólica Celular 33
4.3.3 Ensaio para Avaliação da Integridade da Membrana Celular 34
4.3.4 Ensaio de Viabilidade Celular pelo Teste de Exclusão do Azul de Tripan 34
4.4 Atividade Mitocondrial 35
4.4.1 Potencial de Membrana Mitocondrial 35
4.4.2 Determinação dos Níveis Celulares de ATP 36
4.5 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERON) 36
4.6 Análise Estatística 37
5. RESULTADOS 38
5.1 Ensaios de Citotoxicidade 38
5.1.1 Efeito da Ivermectina Sobre a Proliferação Celular 38
5.1.2 Efeito da Ivermectina Sobre a Viabilidade das Células HepG2 40
5.1.3 Efeito da Ivermectina Sobre a Integridade da Membrana Celular 42
5.1.4 Ensaio de Viabilidade Celular pelo Teste de Exclusão do Azul de Tripan 44
5.2 Ensaios de Atividade Mitocondrial 46
5.2.1 Efeito da Ivermectina Sobre o Potencial de Membrana Mitocondrial 46
5.2.2 Efeito da Ivermectina na Concentração Celular de ATP 48

5.3 Efeito da Ivermectina Sobre a Produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio 50
6 DISCUSSÃO 52
7 CONCLUSÃO 57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 58

1 INTRODUÇÃO

Com o contínuo crescimento da população mundial as necessidades de alimentos também crescem continuamente. De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), já atingimos 8 bilhões e estima-se que em 2100 a população mundial superará 11 bilhões de pessoas. O Brasil desempenha importante papel sendo um dos principais produtores mundiais de alimentos, dentre eles a proteína animal. Segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) (2022), os principais produtores mundiais de carne bovina são Estados Unidos, Brasil, China e União Europeia, sendo que neste cenário o Brasil é ainda o maior exportador de carne bovina. Na produção de carne de frango, o Brasil é o terceiro maior produtor e o maior exportador segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) (2021).

Na produção animal, para se obter altas taxas de produtividade, se faz necessária a utilização de antiparasitários. O Brasil como grande produtor de proteína animal é, portanto, um grande consumidor de antiparasitários. O Brasil é o terceiro maior consumidor mundial de antiparasitários, em números absolutos, segundo dados da FAO (2020). Dentre os antiparasitários encontramos a ivermectina (IVM) que é um derivado semissintético da Abamectina, uma das avermectinas naturais, que são uma classe de substâncias que contém em sua estrutura química lactonas macrocíclicas. As avermectinas são produzidas a partir do processo de fermentação realizada pela bactéria *Streptomyces avermitilis* que é uma bactéria filamentosa gram positiva pertencente ao grupo *Actinomicetes* (LASOTA; DYBAS, 1991; LAING *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2008).

O mecanismo de ação da IVM ocorre por meio da afinidade pelos receptores de glutamato e do ácido gama-aminobutírico (GABA) causando morte por paralisia de vertebrados e invertebrados. A IVM é considerada droga segura, porém existem casos de toxicidade descritos. Como é lipofílica, pode se acumular em tecidos animais como tecido adiposo, fígado e rins. A biotransformação ocorre no fígado, pela via enzimática do citocromo P450 (CYP) e a excreção ocorre pelas fezes através dos ductos biliares (em torno de 98%) e pelos rins (cerca de 1-2%). Como a IVM passa pelo fígado onde é metabolizada e excretada, além de se acumular, ela representa risco potencial de

toxicidade a este órgão (LAING *et al.*, 2017; BATIHA *et al.*, 2020; RENDIC, 2021; CANGA *et al.*, 2009).

Apesar de ser considerada uma substância bastante segura para mamíferos, há casos de intoxicação relatados. A maioria destes casos refere-se a alterações no Sistema Nervoso Central (SNC) (CANGA *et al.*, 2009), relacionadas à afinidade da IVM pelos receptores glutamato e GABA (LAING *et al.*, 2017; BATIHA *et al.*, 2020). Em muitos desses casos observam-se também alterações nos níveis sorológicos de enzimas hepáticas como as aminotransferases, gama-glutamil transferase (GAMA-GT) e desidrogenase lática (DHL). Além disso foram também relatados casos diretos de toxicidade hepática, com alterações laboratoriais e histológicas.

Existem diversos modelos experimentais celulares, disponíveis para avaliação da toxicidade hepática: fígado isolado perfundido, amostras de fatias de fígado, hepatócitos isolados, culturas primárias de hepatócitos e linhagens celulares hepáticas (GUILLOUZO, 1998). Dentre esses modelos, aqueles com hepatócitos isolados são considerados ideais, porém seu uso é limitado pela baixa disponibilidade, altos custos, vida limitada, qualidade e variabilidade elevada entre as amostras. No entanto, as linhagens celulares apresentam robustez e reprodutibilidade dos estudos. Existem várias linhagens celulares derivadas de fígado humano disponíveis, dentre elas as células HepG2, que são células imortalizadas, derivadas de um carcinoma hepático que mantêm as principais funções metabólicas dos hepatócitos e propiciam o estudo de mecanismos de toxicidade hepática (TOLOSA *et al*, 2013; CHOI *et al.*, 2014).

Devido à grande utilização da IVM, seja no tratamento de parasitoses em animais e humanos, além de sua utilização como droga antineoplásica (JUAREZ; SCHCOLNIK-CABRERA; DUEÑAS-GONZALES, 2018), ou em casos de infecções virais (dentre elas a COVID-19), aliado à possibilidade de toxicidade hepática, ainda pouco estudada, encontramos a justificava para a realização desta pesquisa.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto, que a ivermectina é tóxica às células HepG2 induzindo o colapso do potencial de membrana mitocondrial, que leva à diminuição da produção de ATP, além do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que podem levar ao estresse oxidativo. A toxicidade aumenta com aumento da dose e com o tempo de exposição indicando que sua utilização deve ser criteriosa. Sugerimos estudos futuros para avaliar substâncias antioxidantes que apresentem potencial efeito protetor contra a ação da ivermectina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTMAN, D. G. Construction of age-related reference centiles using absolute residuals. **Statistics in medicine**, Oxford, v. 12, n. 10, p. 917-924, 1993.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O. D.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios **Revista de Nutrição**, [*s.l.*], v. 23, n. 4, p. 629-643, ago. 2010.

BATIHA, G. E. S.; ALQAHTANI, A.; ILESANMI, O. B.; SAATI, A.A.; EL-MLEEH, A.; HETTA, H.F.; BESHBISHY, A.M. Avermectin derivatives, pharmacokinetics, therapeutic and toxic dosages, mechanism of action, and their biological effects. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 13, n. 8, p. 196-232, 2020.

CANGA, A. G.; PRIETO, A. M. S.; LIÉBANA, M. J. D.; MARTÍNEZ, N. F.; VEGA, M. S.; VIEITEZ, J. J. G. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. **The Veterinary Journal**, London, v. 179, n. 1, p. 25-37, 2009.

CARVALHO, W. L. D.; MAIOLI, M. A.; MENDES, L. C. N.; ROZZA, D. B.; INGATTO, F. E. Mecanismos da intoxicação do fígado de rato causada pelo gossipol. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 339-344, 2013.

CHERNYAK, B. V.; IZYMOV, D. S.; LYAMZAEV, K. G.; PASHKOVSKAYA, A. A.; PLETJUSHKINA, O.Y.; ANTONENKO, Y. N.; SAKHAROV, D. V.; WIRTZ, K. W. A.; SKULACHEV, V. P. Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1757, p. 525-534, 2006.

CHOI, J. M.; OH, S. J.; LEE, S. Y.; IM, J. H.; OH, J. M.; RYU, C. S.; KWAK, H. C.; LEE, J.Y.; KANG, K. W.; KIM, S. K. HepG2 cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics. **Archives Of Pharmacal Research**, Seoul, v. 38, n. 5, p. 691-704, 2014.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid Colorimetric Assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reability. **Immunol. Methods**, [*s.l.*], v. 22, p. 271-277, 1986.

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. 2021. Disponível em:
https://www.fao.org/brasil/pt/. Acesso em: 13 fev. 2023.

GABALLH, M.; EL-MASHAD, A. B.; AMIN, A.; DARWEISH, M. Pathological studies on effects of ivermectin on male and female rabbits. **Banha Veterinary Medical Journal**, Alcherqah, v. 32, n. 1, p. 104-112, 2017.

GERENUTTI, M.; SPINOSA, H. S. Avermectinas: revisão do uso e da ação sobre o SNC. **Biotemas**, Florianopolis, v. 10, n. 2, p. 7-27, 1997.

GONZÁLEZ-PONCE, H.; RINCÓN-SÁNCHEZ, A.; JARAMILLO-JUÁREZ, F.; MOSHAGE, H. Natural Dietary Pigments: potential mediators against hepatic

damage induced by over-the-counter non-steroidal anti-inflammatory and analgesic drugs. **Nutrients**, Basel, v. 10, n. 2, p. 117-216, 2018.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. D. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUILLOUZO, A. Liver cell models in vitro toxicology. **Environmental Health Perspectives**, [*s.l.*], v. 106, n. 2, p. 511-532, 1998.

HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RAVELO-PÉREZ, L. M.; HERNÁNDEZ-SUÁREZ, E. M.; CARNERO, A.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Analysis of abamectin residues in avocados by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, [*s.l.*], v. 1165, n. 1-2, p. 52-57, 2007.

IMBERTI, R., NIEMINEN, A.-L., HERMAN, B., LEMASTERS, J.J. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporine A and trifluoperazine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Rockville, v.265, p.392-400, 1993.

JIA, Y.; HAN, B.; WANG, R. Ivermectin induces mitophagy in H9c2 cells via activation of the PINK1/Parkin pathway. **Food Science and Technology**, San Jose, v. 42, p. 1-8, 2022.

JUAREZ, M.; SCHCOLNIK-CABRERA, A.; DUEÑAS-GONZALEZ, A. The multitargeted drug ivermectin: from an antiparasitic agent to a repositioned cancer drug. **American Journal of Cancer Research**, Madison, v. 8, n. 2, p. 317-331, 2018.

KONGMANAS, K.; PUNYADEE, N.; WASUWORAWONG, K.; SONGJAENG, A.; PROMMOOL, T.; PEWKLIANG, Y.; MANOCHEEWA, S.; THIEMMECA, S.; PUTTIKHUNT, C.; AVIRUTNAN, P. Immortalized stem cell-derived hepatocytelike cells: an alternative model for studying dengue pathogenesis and therapy. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, p. 1-32, 2020.

LAING, R.; GILLAN, V.; DEVANEY, E. Ivermectin – Old Drug, New Tricks? **Trends In Parasitology**, Cambridge, v. 33, n. 6, p. 463-472, 2017.

LASOTA, J. A.; DYBAS, R. A. Avermectins, a novel class of compounds: implications for use in arthropod pest control. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, p. 91-117. 1991.

LEE, J. Y.; LIM, W.; HAM, J.; KIM, J.; YOU, S. SONG, G. Ivermectin induces apoptosis of porcine trophectoderm and uterine luminal epithelial cells through loss of mitochondrial membrane potential, mitochondrial calcium ion overload, and reactive oxygen species generation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 159, p. 144-153, 2019.

LI, M.; CHEN, Z.; LIN, X.; ZHANG, X.; SONG, Y.; WEN, Y.; LI, J. Engineering of avermectin biosynthetic genes to improve production of ivermectin in *Streptomyces avermitilis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 18, n. 20, p. 5359-5363, 2008.

LI, S.; TAN, H. Y.; WANG, N.; ZHANG, Z. J.; LAO, L.; WONG, C. W.; FENG, Y. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, n. 11, p. 26087-26124, 2 nov. 2015.

MAIOLI, M. A.; MEDEIROS, H. C.D. de; GUELFI, M.; TRINCA, V.; PEREIRA, F. T.V.; MINGATTO, F. E. The role of mitochondria and biotransformation in abamectin-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. **Toxicology In Vitro**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 570-579, 2013.

MASARONE, M.; ROSATO, V.; DALLIO, M.; GRAVINA, A. G.; AGLITTI, A.; LOGUERCIO, C.; FEDERICO, A.; PERSICO, M. Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, London, v. 2018, p. 1-14, 11 jun. 2018.

OGUEJI, E. I.; NWANI, C.; MBAH, C.; IHEANACHO, S.; NWEKE, F. Oxidative stress, biochemical, lipid peroxidation, and antioxidant responses in Clarias gariepinus exposed to acute concentrations of Ivermectin. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 27, n. 14, p. 16806-16815, 5 2020.

ONU – ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. Disponível em: https://news.un.org/pt/story/2022/11/1805342. Acesso em: 13 fev. 2023.

PARK, H.; SONG, G.; LIM, W. Ivermectin-induced programmed cell death and disruption of mitochondrial membrane potential in bovine mammary gland epithelial cells. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 163, p. 84-93, 2020.

QURESHI, S. Biochemical Toxicity of Ivermectin in Wistar Albino Rats. **American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences**, Dubai, v. 1, n. 5, p. 15-19, 2013.

RABAB, R. E.; AZIZA, A.; AHLAM, F. H.; ABDEL, F. A. Toxicological and pathological studies of Ivermectin on male albino rats. **Journal of American Science**, Dubai, v. 11, n. 3, p. 73-83, 2015.

RENDIC, S. P. Metabolism and interactions of Ivermectin with human cytochrome P450 enzymes and drug transporters, possible adverse and toxic effects. **Archives of Toxicology**, Heidelberg, v. 95, n. 5, p. 1535-1546, 2021.

SAQIB, M.; ABBAS, G.; MUGHAL, M. N. Successful management of ivermectin-induced blindness in an African lion (*Panthera leo*) by intravenous administration of a lipid emulsion. **BMC Veterinary Research**, London, v. 11, n. 1, 2015.

SKEHAN, P., SORENG, R., SCUDEIRO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BOKESCH, H., KENEY, S., BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Nat. Cancer Inst**., [*S.l.*], v. 82, p. 1107-1112, 1990.

SPARSA, A.; BONNETBLANC, J. M.; PEYROT, I.; LOUSTAUD-RATTI, V.; VIDAL, E.; BÉDANE, C. Effets secondaires de l'ivermectine utilisée dans le traitement de la gale. **Annales de Dermatologie et de Vénéréologie**, [*S.l.*], v. 133, n. 10, p. 784-787, 2006.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, Hoboken, v. 111, p. A3.B1-A3B3, 2015

TOLOSA, L.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; PÉREZ-CATALDO, G.; CASTELL, J. V.; DONATO, M. T. HepG2 cells simultaneously expressing five P450 enzymes for the screening of hepatotoxicity: identification of bioactivable drugs and the potential mechanism of toxicity involved. **Archives of Toxicology**, Heidelberg, v. 87, n. 6, p. 1115-1127, 9 fev. 2013.

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Disponível em:https://apps.fas.usda.gov/psdonline/reporthandler.ashx?reportId=2738&templateId=23&format=html&fileName=Beef%20and%20Veal%20Production%20-%20Selected%20Countries%20Summary. Acesso em: 14 fev. 2023.

VEIT, O.; BECK, B.; STEUERWALD, M.; HATZ, C. First case of ivermectin-induced severe hepatitis. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 100, n. 8, p. 795-797, 2006.

ZANOLI, J. C. C.; MAIOLI, M. A.; MEDEIROS, H.C.D.; MINGATTO, F. E. Abamectin affects the bioenergetics of liver mitochondria: a potential mechanism of hepatotoxicity. **Toxicology In Vitro**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 51-56, 2012.

ZHANG, P.; NI, H.; ZHANG, Y.; XU, W.; GAO, J.; CHENG, J.; TAO, L. Ivermectin confers its cytotoxic effects by inducing AMPK/mTOR-mediated autophagy and DNA damage. **Chemosphere**, Oxford, v. 259, p. 127448-127457, 2020.

ZHANG, Y.; SUN, T.; LI, M.; LIN, Y.; LIU, Y.; TANG, S.; DAI, C. Ivermectin-Induced Apoptotic Cell Death in Human SH-SY5Y Cells Involves the Activation of Oxidative Stress and Mitochondrial Pathway and Akt/m TOR-Pathway-Mediated Autophagy. **Antioxidants**, Basel, v. 11, n. 5, p. 908-926, 2022.

ZHANG, Y.; WU, J.; XU, W.; GAO, J.; CAO, H.; YANG, M.; WANG, B.; HAO, Y.; TAO, L. Cytotoxic effects of Avermectin on human HepG2 cells in vitro bioassays. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 220, p. 1127-1137, jan. 2017.

ZHOU, S.; WU, H.; NING, W.; WU, X.; XUM X.; MA, Y.; LI, X.; HU, J.; WANG, C.; WANG, J. Ivermectin has New Application in Inhibiting Colorectal Cancer Cell Growth. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 12, 2021.