
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA- INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**ESTUDO MORFOLÓGICO DO FÍGADO DE
CAMUNDONGOS EXPOSTOS A AÇÃO DO
FIPRONIL (Ingrediente ativo do acaricida
Frontline®).**

Mateus Ferreira



Rio Claro
2010

Mateus Ferreira

**ESTUDO MORFOLÓGICO DO FÍGADO DE
CAMUNDONGOS EXPOSTOS A AÇÃO DO
FIPRONIL (Ingrediente ativo do acaricida Frontline®).**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2010

574.82 Ferreira, Mateus
F383e Estudo morfológico do fígado de camundongos expostos a ação do fipronil (ingrediente ativo do acaricida Frontline®) / Mateus Ferreira. - Rio Claro : [s.n.], 2010
37 f. : il., figs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Maria Izabel Souza Camargo

1. Histologia. 2. Fipronil. 3. Fígado. 4. Camundongos. 5. MET. 6. Ultraestrutura. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Dedico meu TCC a minha
família:

A família de sangue, e a eles
eu agradeço por tudo,
pelo apoio e
pela boa vontade
dedicados.

E a minha família adquirida, a
do mundo, que tanto me
ajudou a crescer e a ser uma
nova pessoa a cada momento.

Agradecimentos

Em primeiro lugar eu gostaria de agradecer e dedicar este TCC a minha orientadora e amiga, Profa. Dra. Maria Izabel. Sempre presente quando necessária, sempre ouvindo as reclamações do dia-a-dia e que estabeleceu em mim a vontade pela pesquisa. Obrigada por ser paciente comigo, mesmo que eu nunca tenha conseguido respeitar os prazos. Muito obrigado por acreditar em mim, mesmo quando eu não parecia tão confiante. Levarei para o resto da vida esta convivência.

À minha família de sangue; Carlão, Ana, Rafaela e Aline, eu gostaria de agradecer pelo mundo. Obrigado pelas oportunidades oferecidas. Obrigado por todo o suporte que vocês me deram, seja ele financeiro, emocional ou físico. Obrigado por acreditar em mim e me fazer crer nas pessoas. Obrigado por mostrar o valor da família e por mais que eu tenha sido negligente em alguns momentos não há como esquecer o lugar de vocês no meu coração e na minha mente.

Ao meu tio Inácio e minha prima Marcilene, pelo apoio e compreensão nas horas mais difíceis. À minha tia Rita, exemplo de pessoa, aos meu padrinhos, Lena e Dito, que me proporcionaram a oportunidade de um grande sonho. Não me esquecerei do que fizeram e retribuirei sempre da melhor maneira possível. Aos demais familiares, que por ventura não citei o nome, agradeço pela estrutura de família que vocês me ofereceram e por tudo aquilo que sou.

Aos amigos de faculdade gostaria de agradecer não só pela condição de companheiros de jornada, mas sim pela amizade construída e pelos momentos complicados que a convivência traz.

Em primeiro lugar, Glenn (Shakira) e Lígia (Branquela), muito obrigado por serem meus tutores no mundo novo que se apresentou quando entrei na faculdade. Vocês são pra mim um tudo e provavelmente não seria nem a metade do que sou hoje se não tivesse conhecido vocês. Glenn, muito obrigado pelas longas conversas, pelos longos discursos, pelo companheirismo, por ser meu exemplo pra muitas coisas, por me mostrar a música, por me fazer pensar biologia e afins. Muito Obrigado. Lí, pra você eu quero um caminhão de rosas, um quilo de abraços apertados e uma tarde de sol com chuva depois de um almoço na Makuta.

À Meirielen, por me mostrar o que é ser canela-em-pó e por tantas outras belezas da vida que antes me passavam despercebidas. A moça que sempre me faz abrir um grande

sorriso sempre que aparece de vestido azul pelas ruas de Rio Claro (provavelmente isso deve acontecer na cidade cinza de São Paulo, mas ela provavelmente está no caminho de revelar as cores de lá também). Mei, um sempre quilo de paçoca com brigadeiro pra você.

Itu (Danilo), muito obrigado pelo seu comportamento de irmão mais velho quase sempre, até hoje isso é importante. O primeiro veterano a me ajudar de verdade, um grande cara e um grande biólogo.

À Giane (que saudade de você) alguém que sempre estava disposta a conversar sobre tudo. Uma incrível pessoa e amiga.

Aos Filhos DuMakuta por serem meus veteranos, por me mostrarem a facul e todas as suas implicações: festas, aulas, churrascos, louças acumuladas na pia e casa sempre suja. Burns (Cássio) e Goiaba (Rafael) muito obrigado pelos bons momentos de convivência e aprendizado.

Aos outros veteranos da turma de 2003, muito obrigado por terem me abrigado nas festas e churrascos da turma.

À Tassi e ao Jaú, muito obrigado por terem me mostrado a CO e o INTERBIO, momentos inesquecíveis.

Ao Sangue (Alexandre) apesar do pouco tempo junto que a gente passou sempre me mostrou a capacidade do ser humano em se superar. É impressionante. Sangue, is us! Weeee. Foi o cara que me faz perguntar hoje em dia: Pra que sentido?

À Maíra, Mangá (Mariana), Corázon (Andrea) e Adriano por terem me acolhido em um momento LOST, muito obrigado pela hospitalidade, muito obrigado pelas broncas, muito obrigado pelos momentos família, pelos cafés e chás da tarde. Pelas intensas risadas e pelos ótimos momentos. Apesar da distância, vocês sempre representarão momentos de convivência exemplar.

Aos amigos da Alpha, grandes pessoas e grandes amigos, cada um com sua devida importância. Lugar de momentos complicados, mas que sempre foram bem vindos. Um obrigado aos velhos, Confirma (Thalles), Fii (Rafael), Momo (Luis), Bill (Renato), Cereja (Paula), Minhoca (Filipe), Latino (Rodrigo) e etc, e aos novos, Exu (Erick) e Dilon (Yuri).

Às minhas atuais companheiras de casa, Gábi e Eli. Duas pessoas fantásticas que encontrei quase ao acaso e que surpreendem a cada dia. Gábi muito obrigado por me ajudar e por sempre estar presente quando eu preciso, mesmo que forem broncas. Você é uma pessoa incrível e grandiosa. Eli... nha, eu agradeço depois!

Ao pessoal que compartilhou os momentos do Centro Acadêmico, um lugar fantástico e de momentos turbulentos. Fii (Rafael), Marina, Annie e Moyra, vocês foram muito importantes e sem vocês eu não teria tido a coragem de seguir adiante.

Em especial um agradecimento a amiga Moyra, por conseguir entender este cabeça-dura e por acreditar em mim, mesmo nos momentos mais difíceis.

Às pessoas que partilharam momentos excelentes da facul: Lanterna (Joana) e Anzol (Bianca). Obrigado pelos cafés e pelas tardes de conversa.

À Patty, minha guia para os projetos de pesquisa, muito obrigado pelas oportunidades e pela ajuda que você me dedicou.

Ao pessoal do departamento de Biologia: Cris, Nega, Neusa, Gerson, Mônica e Lucila. Muito obrigado, os cafés do departamento eram os melhores momentos do dia. Sempre muito bons momentos.

Aos técnicos de laboratório, Gerson, Mônica e Antonio, por terem sido a peça chave para o desenvolvimento das minhas atividades acadêmicas.

Ao grupo PET, que apesar de tudo se mostrou como uma grande escola. Aos petianos companheiros e nosso difícil tutor, Prof. Flávio Henrique Caetano.

Aos professores que influenciaram meu modo de pensar e agir, principalmente a Profa. Doralice, a Profa. Marin, o Prof. Odair, o Prof. Francisco Braga (Chico) e o Prof. Guilherme, principalmente a Profa. Vera Lúcia Scatena, que me inspirou a seguir um objetivo e que sempre se mostrou muito amiga e companheira.

Por último, mas não menos especial, eu gostaria de dedicar uma seção inteira de agradecimentos aos meus colegas, companheiros e amigos de turma. Pessoas com as quais eu passei alguns dos melhores momentos na faculdade e que sem dúvida trouxeram sentido as aulas e trabalhos. Futuros colegas desempregados, companheiros de profissão e quiçá amigos pela vida.

Eli, mocinha cult com quem eu esbarrei e que se mostrou uma grande amiga, tresloucada pelos movimentos alternativos da sociedade, muito desmemoriada mas (quase) sem más-intenções.

Giovana, pessoa de coração grande que não sabe falar NÃO, né?

Monizze, grande Monão, que apesar de parecer bastante nerd no começo, é uma pessoa com uma bexiga bem pequena e um sério problema de narcolepsia. E também causa muito!

Pâmela, rioclarense, de sorriso fácil e de ótima convivência, diz que um dia foi hippie, mas hoje em dia é paty.

Fábio, amigo Iéti, primeiro companheiro de jornada e que no fim parece voltar ao início.

Manu, pelas ótimas tardes com brigadeiro e estudo antes da prova.

Vanelize, pelos momentos de entendimento e pela companhia em aula.

Salmonela (Vanessa), a do sorriso contagiante e de atitude sempre positiva. Exemplo de felicidade e companheirismo, inspira a grandes coisas.

Natália e Juliana, eu agradeço não de maneira especial, mas da maneira mais simples. OBRIGADO, um obrigado simples e conciso, contudo carregado da amizade e dedicação que vocês merecem. Eu espero muito que a gente não se separe na longa jornada adiante. São parte do que sou, mais do que qualquer coisa e apesar da distância que irá se instalar entre a gente, que aquilo que nos fomos e a amizade perdure para sempre. Os cafés da minha vida nunca mais serão os mesmos!

Também gostaria de agradecer as pessoas que me fizeram enfrentar obstáculos, pois estes também foram importantes para a elaboração deste TCC. Em especial a estas pessoas, eu gostaria de agradecer a minha pessoa, pois não existe obstáculo maior do que ultrapassar a si mesmo.

Mãos dadas

Não serei o poeta de um mundo caduco.
Também não cantarei o mundo futuro.
Estou preso à vida e olho meus companheiros
Estão taciturnos mas nutrem grandes esperanças.
Entre eles, considere a enorme realidade.
O presente é tão grande, não nos afastemos.
Não nos afastemos muito, vamos de mãos dadas.

Não serei o cantor de uma mulher, de uma história.
Não direi suspiros ao anoitecer, a paisagem vista na janela.
Não distribuirei entorpecentes ou cartas de suicida.
Não fugirei para ilhas nem serei raptado por serafins.

O tempo é a minha matéria, o tempo presente, os homens presentes,
a vida presente.

(Carlos Drummond de Andrade)

SUMÁRIO

| | PÁGINA |
|---|--------|
| 1. RESUMO..... | 9 |
| 2. INTRODUÇÃO | 10 |
| 3. OBJETIVOS | 13 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 14 |
| 4.1. Obtenção dos Animais..... | 14 |
| 4.2. Substância Química..... | 14 |
| 4.3. Dosagem e Modelo Experimental..... | 14 |
| 4.4. Ultraestrutura..... | 15 |
| 5. RESULTADOS..... | 16 |
| 6. DISCUSSÃO | 27 |
| 7. CONCLUSÃO | 30 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 31 |

1. RESUMO

O fipronil, ingrediente ativo do acaricida Frontiline®, é um derivado fenil-pirazólico e sua eficácia na eliminação de diversas pragas, mesmo em baixas concentrações, já foi demonstrada, porém, sua atuação sobre os organismos não alvos, ainda não foi totalmente esclarecida. Neste sentido, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos de diferentes doses do fipronil sobre o fígado de camundongos. Os resultados mostraram que os animais expostos ao fipronil apresentaram alterações ultraestruturais significativas no tecido e nas células hepáticas com evidente desorganização celular e citoplasmática dos hepatócitos, com aumento do número de organelas, principalmente mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, organelas que, no caso dos indivíduos expostos, foram provavelmente responsáveis pela síntese de enzimas inativadoras do produto tóxico. Houve acúmulo de lipídeos no citoplasma dos hepatócitos (esteatose) além de extensas áreas vacuolizadas, principalmente em regiões próximas ao núcleo. As alterações observadas no núcleo dos hepatócitos sugeriram a ocorrência de processos de morte celular. As células de Kupffer aumentaram em número o que sugerindo aumento de processos fagocitários nos fígados dos animais expostos.

Palavras-chave: Fipronil; fígado; camundongos; ultraestrutura; MET

2. INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de produtos químicos no controle de invertebrados praga, tanto na agricultura, quanto na saúde pública, tem gerado diversos distúrbios, sendo que os impactos ambientais causados, seja no solo ou na água, são de difícil mensuração. Neste sentido, pesquisas tem sido desenvolvidas na intenção de se avaliar os efeitos tóxicos e carcinogênicos destes produtos (FLORES et al., 2004; SHAFER et al., 2005; RUBIN et al., 2007). No entanto, produtos que foram anteriormente utilizados, como os organoclorados e os piretróides, por exemplo, tiveram que ser substituídos por substâncias químicas mais recentes, conhecidas como inseticidas de segunda geração, as quais apresentam maior eficiência e seletividade no controle das pragas (BALANÇA; DE VISSCHER, 1997; TINGLE et al., 2003). Nesta direção o uso destes produtos nos organismos alvo tem comprovado sua eficiência (OLIVEIRA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2009), no entanto, pouco se sabe a respeito dos seus efeitos sobre organismos considerados não-alvo, bem como sobre o meio ambiente (HURLEY et al., 1998; OLIVEIRA, 2010, TANG et al., 2004;).

O fipronil, composto químico sintético, faz parte dessa nova geração de produtos utilizados para combater invertebrados. Ele é um derivado fenil-pirazólico com amplo e conhecido espectro inseticida e acaricida (TINGLE et al., 2003), tendo sido utilizado para o controle de várias pragas domésticas e das lavouras, tais como: formigas, baratas, cupins, gafanhotos e besouros, mostrando excelentes resultados mesmo quando utilizado em baixas concentrações. Este produto tem sido comercializado com a denominação de Icon, Regent, Ascend, Termidor, Goliath, Chipco, Chipco Choice e Adonis, entre outros (COLLINS; CALCOTT, 1998; GUNASEKARA; TROUNG, 2007; MARICONI et al., 1994; MELO-FILHO; VEIGA, 1998; TINGLE et al., 2003).

Devido a eficiência do fipronil no combate a ectoparasitas sua utilização dentro da medicina veterinária vem aumentando em escala global, visto que ao ser administrado topicamente este apresenta excelente ação terapêutica e sua atividade é persistente no combate a pulgas e carrapatos de cães e de gatos domésticos. Comercialmente ele é conhecido como Frontline® e Top Spot® (OLIVEIRA et al., 2008; POSTAL et al., 1995). Além disso, sua utilização tem auxiliado na saúde pública, combatendo os principais vetores de antropozoonoses, como as larvas do mosquito da dengue, *Aedes aegypti* (ALI et al., 1998; PRIDGEON et al., 2008). Porém, a ampla utilização do fipronil tem exposto direta, ou

indiretamente à sua ação não só os organismos alvos, mas também aqueles ditos não alvo, como é o caso das algas, plantas aquáticas, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos, bem como o próprio ser humano (TINGLE et al., 2000; TINGLE et al., 2003).

Um dos fatores que torna a utilização do fipronil mais preocupante é a formação de metabólitos resultado da sua degradação. Como exemplo desse processo tem-se o fipronil-dessulfínil, que apresenta grau de toxicidade, para mamíferos, cerca de 10 vezes superior aquele do próprio fipronil, sendo ainda extremamente mais estável (TERÇARIOL, 2007; TINGLE et al., 2003). O que é também motivo de atenção, é que ele pode apresentar efeitos bioacumulativos, quando a sua aplicação é sistêmica e cíclica, como no caso das aplicações em lavouras e pastos, o que afeta os animais ao longo da cadeia trófica (CONELLY, 2001; GUNASEKARA et al., 2007; TINGLE et al., 2000; USEPA, 1998).

Mahler et al. (2009) estudando os efeitos do fipronil observaram que seus resíduos estavam presentes na poeira dentro e fora de residências de uma cidade do estado do Texas nos EUA, bem como nas residências em que os animais de estimação eram tratados com produtos para o controle de pulgas e de carrapatos e naquelas onde havia sido feito o controle de cupins e formigas. Foi verificado que a quantidade total do fipronil e de seus derivados, fipronil sulfeto e fipronil desulfínil, chegava a valores superiores a 10.000 µg por kg de poeira, apontando assim valores médios de resíduos muito superiores no interior das residências quando comparados aqueles obtidos do lado de fora destas, demonstrando a capacidade de permanência do produto no ambiente.

Nos organismos alvo (invertebrados em geral) o fipronil age interferindo nas sinapses dos neurônios do sistema nervoso, especificamente nos receptores GABA (γ -Amino Butyric Acid), bloqueando os canais de cloro (CONELLY, 2001), com conseqüente inibição do impulso nervoso, o que resulta em atividade neuronal excessiva e que leva o animal, dependendo da dose, a um estado de paralisia severa podendo inclusive chegar a morte (RHÔNE-POULENC, 1995; TINGLE et al., 2000). A seletividade do fipronil é garantida devido à condição deste em se ligar mais eficientemente aos receptores dos insetos do que àqueles dos mamíferos (HAINZL et al., 1998; MATSUDA et al., 2001).

Nos vertebrados e especificamente nos mamíferos, o fipronil tem efeito tóxico via ingestão, com a DL_{50} para ratos estimada em $97\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. (USEPA, 1998). Ao contrário, sua aplicação tópica, é pouco tóxica (com uma DL_{50} superior a $2000\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ em ratos) devido a baixa penetrabilidade dérmica (CONELLY, 2001; GUNASEKARA et al., 2007; USEPA, 1998; TINGLE et al., 2000).

Entre os vertebrados, em geral, além de sua atuação no sistema nervoso, o fipronil interfere também, na morfologia de outros órgãos, como é o caso do fígado, tireóide e hipófise. Trabalhos anteriores já demonstraram os efeitos do fipronil sobre a tireóide (HURLEY et al., 1998, FERREIRA et al., informação pessoal) e sobre o fígado (OLIVEIRA, 2010) de roedores.

O fígado, devido principalmente a sua localização, é o órgão que sofre os primeiros impactos da ação dos produtos tóxicos ingeridos pelos indivíduos, pois, diferentemente de outros órgãos ele tem sua principal fonte de sangue (75% do total) oriunda da veia porta (ROSS & PAWLINA, 2008), o que, dessa forma, possibilita que todo o sangue da cavidade abdominal, rico em nutrientes absorvidos pelo sistema digestório, seja metabolizado primeiro pelos hepatócitos, antes de seguir para a veia cava inferior e daí para o átrio direito do coração, onde então dar-se-á a distribuição para o resto do corpo.

Estudos de Tang et al. (2004) também demonstraram os efeitos, *in vitro*, do metabolismo do fipronil, por meio da análise de hepatócitos tanto de humanos quanto de ratos. Os autores constataram que a principal via metabólica do produto dar-se-ia por meio da oxidação do grupo tioéter para a formação do fipronil sulfona. Os mesmos autores também verificaram que a enzima responsável pela S-oxidação do fipronil seria uma isoforma do citocromo P450.

Dessa forma, os dados até agora disponíveis na literatura tem mostrado que o fipronil seria um agente causador de alterações não só no sistema nervoso (TINGLE et al., 2003), mas também na tireóide (FERREIRA et al., informação pessoal; HURLEY et al., 1998) e no fígado (OLIVEIRA, 2010) de vertebrados. No entanto, poucos estudos demonstraram até agora os efeitos do fipronil sobre a ultraestrutura das células dos órgãos por ele afetados, pois, apesar de ter sido estabelecida a rota metabólica deste produto (TANG et al., 2004), ainda não foram demonstrados os efeitos morfológicos do fipronil e de seus derivados nas células dos organismos considerados não alvo.

3. Objetivos

Devido a ampla utilização do produto químico fipronil (ingrediente ativo do acaricida Frontline®), na medicina veterinária e na agricultura e a pouca informação disponível na literatura a respeito dos seus efeitos nos organismos não alvo, o presente trabalho teve como objetivo analisar ultraestruturadamente os efeitos do fipronil, sobre os hepatócitos de camundongos expostos a diferentes concentrações da DL_{50} em condições de laboratório.

4. Materiais e Métodos

4.1. Obtenção dos Animais

Para a realização do presente estudo foram utilizados 20 camundongos fêmeas Swiss (*Mus musculus*), com 5-6 semanas de idade, saudáveis e com peso semelhante ($20 \text{ gr} \pm 20\%$), sendo 5 espécimes por grupo de tratamento.

Os espécimes foram obtidos do Biotério de Criação CEMIB/UNICAMP e foram mantidos em condições controladas ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 50% de umidade, com fotoperíodo de 12h) em laboratório, durante 7 dias, para aclimatação, antes da realização do experimento.

Os camundongos foram identificados individualmente e dentro de cada grupo de tratamento. Cada grupo foi mantido em caixas apropriadas de polipropileno identificadas e com água filtrada e ração comercial *ad libitum*.

Para a realização desse estudo, foi utilizado o laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, UNESP, campus de Rio Claro-SP, Brasil.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animal da Fundação Hermínio Ometto –UNIARARAS, SP, Brasil, sob protocolo nº 09/2009.

4.2. Obtenção do Fipronil

O fipronil, composto do grupo químico fenil pirazol, CAS nº: 120068-37-3 e de nome químico (RS)-5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-(trifluoromethylsulfinyl)-1H-pyrazole-3-carbonitrile foi obtido a partir do produto comercial Regent 800 WG, fabricado pela BASF com grau de pureza de 80% (sendo os 20% restantes constituídos de produtos inertes).

4.3. Dosagem do Fipronil e Modelo Experimental

A seleção das concentrações do fipronil para a avaliação das alterações morfo fisiológicas nos camundongos foi baseada na DL_{50} de $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, obtida por Oliveira (2010). A partir da DL_{50} foram estabelecidas três soluções diferentes, duas pela diluição desta, na proporção de 30%, 50%, e a terceira, a própria DL_{50} .

Os camundongos foram divididos em quatro grupos de tratamento: **grupo I** (controle negativo), **grupo II** (30% - 15 mg.kg⁻¹) **grupo III** (50% - 25 mg.kg⁻¹) e **grupo IV** (a própria DL₅₀ - 50 mg.kg⁻¹). A administração do fipronil foi por meio de injeção intraperitoneal, com volume na proporção de 10 mL de fipronil (30%, 50% e 100% da DL₅₀) por quilo de peso corpóreo (0.2 mL). No grupo controle negativo foi administrado apenas o solvente (água destilada) sem adição do acaricida.

4.4. Ultraestrutura

Para realização da ultraestrutura, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. Posteriormente foi feita a dissecação e fragmentos do fígado foram retirados e fixados em glutaraldeído 2.5% por 4 horas, tendo sido na sequência lavados em dois banhos de tampão cacodilato de sódio à 0.1M por 15 minutos cada banho. Todos os fragmentos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em cacodilato de sódio e novamente, banhados em tampão cacodilato de sódio, por 15 minutos.

A seguir, os fragmentos foram passados em álcool 10% durante 15 minutos e, posteriormente, contrastados em acetato de uranila a 2% mais etanol a 10% durante 2 horas. A desidratação foi realizada em série crescente de banhos em acetona 50%, 70%, 90%, 95% e 100%, com duração de 10 minutos cada e acetona pura (100%), dois banhos, com duração de 15 minutos cada. Logo após, o material foi submetido à mistura de acetona e resina na proporção de 1:1 onde permaneceu por 12 horas, e depois, foi transferido para resina Epon Araldite pura sem catalisador.

Finalmente, os fragmentos do fígado foram incluídos em resina Epon Araldite pura com catalisador e colocados em estufa à 60°C por 48 horas.

O material foi então seccionado em ultramicrótomo e as secções ultrafinas foram coletadas em grades de cobre. A seguir, foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo durante 45 e 10 minutos respectivamente.

As grades contendo as secções foram examinadas e fotografadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Philips CM 100.

5. Resultados

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram as alterações ultraestruturais pelas quais passam as diferentes células presentes no fígado de camundongos expostos a diferentes doses de fipronil, composto ativo do acaricida Frontline®.

Na figura 1 observa-se a ultraestrutura destas células, as quais foram obtidas a partir de indivíduos do **grupo I** (controle). Verifica-se a organização do tecido hepático, que apresenta hepatócitos com formato hexagonal (Fig. 1A), com membrana plasmática íntegra (Fig. 1C) e quantidade regular de organelas, estando evidentes as mitocôndrias, com matriz eletrondensa, bem como retículo endoplasmático rugoso (RER) do tipo lamelar (Fig. 1D). O núcleo destas células é arredondado, com cromatina dispersa pela organela estando condensada apenas em alguns pontos, geralmente próximos ao envoltório nuclear (Figs. 1B, 1E-F). No interior do núcleo observa-se um ou mais nucléolos, que apresentam as porções fibrosa e granular distintas (Fig. 1B). As células de Kupffer possuem formato de cunha, núcleo grande em relação ao citoplasma e evidente heterocromatina (Figs. 1H-I). Na figura 1E observa-se a presença de um capilar hepático com hemácia no seu interior.

A figura 2 mostra a ultraestrutura das células do fígado obtidas a partir de indivíduos do **grupo II** (concentração de 15mg.kg^{-1}), e nestas já é possível observar as modificações estruturais causadas pela administração do fipronil (Fig. 2A). Apesar dos hepatócitos apresentarem ainda um formato hexagonal a sua membrana plasmática está irregular e em alguns lugares apresenta reentrâncias, as quais são mais evidentes entre células adjacentes (Fig. 2C). O citoplasma abriga muitas gotas lipídicas (Fig. 2F) distribuídas em meio a áreas vacuolizadas (Figs. 2E-F), principalmente ao redor do núcleo, onde aí estas são mais extensas (Fig. 2G). Quanto a presença de organelas existe agora a maior frequência de peroxissomos (Figs. 2A-B e 2D-E). O núcleo perde a forma original arredondada e passa, na maioria das células hepáticas, a apresentar forma irregular (Figs. 2A e 2F), bem como tamanho menor em relação aqueles observados nos hepatócitos do grupo controle (Fig. 2A). Apresenta também maior quantidade de heterocromatina próxima ao envoltório nuclear, a qual está dispersa no interior do núcleo (Fig. 2B). No nucléolo destas células é possível observar as região granular e fibrosa (Fig. 2H).

Ainda nos indivíduos do **grupo II** (15mg.kg^{-1}) pode-se observar um aumento na frequência das células de Kupffer as quais possuem pouco citoplasma repleto de vacúolos e

de RER. Os seus núcleos apresentam maior quantidade de heterocromatina e estão mais irregulares na forma quando comparados aos das células do **grupo I** (Fig. 2H-I).

A figura 3 mostra os efeitos de 50% da DL_{50} (25mg.kg^{-1}) do fipronil sobre as células do fígado dos indivíduos do **grupo III**, onde é possível observar a intensificação dos efeitos iniciais já verificados nos indivíduos do **grupo II** de tratamento. Os hepatócitos perdem a forma original tornando-se irregulares e a membrana plasmática apresenta mais e maiores dobras por toda a extensão celular (Figs. 3A e 3C). Há um nítido aumento da presença de gotas lipídicas (esteatose) as quais agora tem maior tamanho e estão distribuídas por todo o citoplasma (Figs. 3B, 3D-E). A desorganização citoplasmática é evidente devido à extensa vacuolização (Figs. 3A-B e 3F).

Os núcleos dos hepatócitos apresentam contorno irregular com heterocromatina marginalizada, além do aumento do número de complexos poro (Figs. 3B e 3E). Fica clara a presença de grandes nucléolos geralmente posicionados no centro do núcleo (Fig. 3A). Além disso, a região fibrosa dos nucléolos apresenta diferenças na eletrondensidade indicando que seus componentes são mais heterogêneos quando comparados aqueles encontrados no indivíduos do **grupo I** (Fig. 3G-H).

As células de Kupffer aparecem com frequência ainda maior nestes fígados do que naqueles dos indivíduos dos **grupos I e II** e neste grupo de tratamento observa-se o citoplasma destas células repleto de vacúolos autofágicos com diferentes conteúdos e tamanhos (Fig. 3I). Os núcleos das células de Kupffer estão mais irregulares e com heterocromatina distribuída por toda a organela, sendo que em alguns pontos devido as diferenças de eletrondensidade deva ser constituída por elementos diferentes (Fig. 3J).

A figura 4 apresenta os efeitos da própria DL_{50} (concentração de 50mg.kg^{-1}) do fipronil sobre o fígado dos indivíduos do **grupo IV**, células estas que apresentaram as maiores alterações ultraestruturais devido a maior toxicidade do produto. Na figura 4A tem-se uma vista do tecido hepático e nela nota-se a desorganização tanto celular quanto citoplasmática dos hepatócitos com aumento nítido de regiões de RER (Figs. 4C, 4G e 4H), peroxissomos (Fig. 4A), gotas lipídicas (Figs. 4B, 4F e 4N) e de grandes áreas com extensa vacuolização (Figs. 4B, 4G e 4J)

A membrana plasmática das células se apresenta irregular, principalmente notada nas áreas de contato entre duas células adjacentes (Fig. 4D). Os núcleos dos hepatócitos estão muito menores do que os observados no **grupo I** e com grande quantidade de heterocromatina marginal (Figs. 4B, 4E-F). Uma pequena quantidade de núcleos apresenta nucléolo definido e quando este está presente, parece estar associado a heterocromatina marginal, sendo que as

regiões granular e fibrosa não ficam bem definidas, estando distintas apenas por uma leve diferença de eletrondensidade (Figs. 4F-G e 4N).

As células de Kupffer nestes indivíduos (Figs. 4I e 4L) estão em maior número do que o observado no **grupo I** e seus núcleos apresentam diferentes regiões de heterocromatina, evidenciadas por maior ou menor eletrondensidade. Na figura 4M é possível observar um micronúcleo em uma célula de Kupffer.

Figura 1: Ultraestrutura dos diferentes tipos de células encontrados no fígado de camundongos do **grupo I**. (A) Visão geral do tecido hepático, onde as células estão com forma hexagonal e com núcleo arredondado e central. (B) Detalhe de um hepatócito (**h**) onde observa-se mitocôndrias (**m**) e retículo endoplasmático rugoso (**rer**) próximo ao núcleo. (C) Detalhe de dois hepatócitos adjacentes (**seta vazada** indicando as membranas). (D) Mitocôndrias e **rer** no citoplasma do hepatócito. (E) e (F) Detalhe do núcleo (**n**) e do espaço perinuclear. Em (E) observa-se heterocromatina marginal (**seta cheia**) e em (F) heterocromatina marginal e nucléolo (**nu**). (G) Detalhe de capilar hepático (**bv**) com hemácia (**he**) no interior. (H) Detalhe da célula de Kupffer (**Kc**) com núcleo grande e pouco citoplasma. (I) Detalhe do núcleo da célula de Kupffer, com grande quantidade de heterocromatina marginalizada (**seta cheia**).

ec = eucromatina, **pe** = peroxissomo.

Barras de Escala: A=10 μm
B, C, E, H, I=1 μm
D=0,5 μm
F, G=2 μm

1

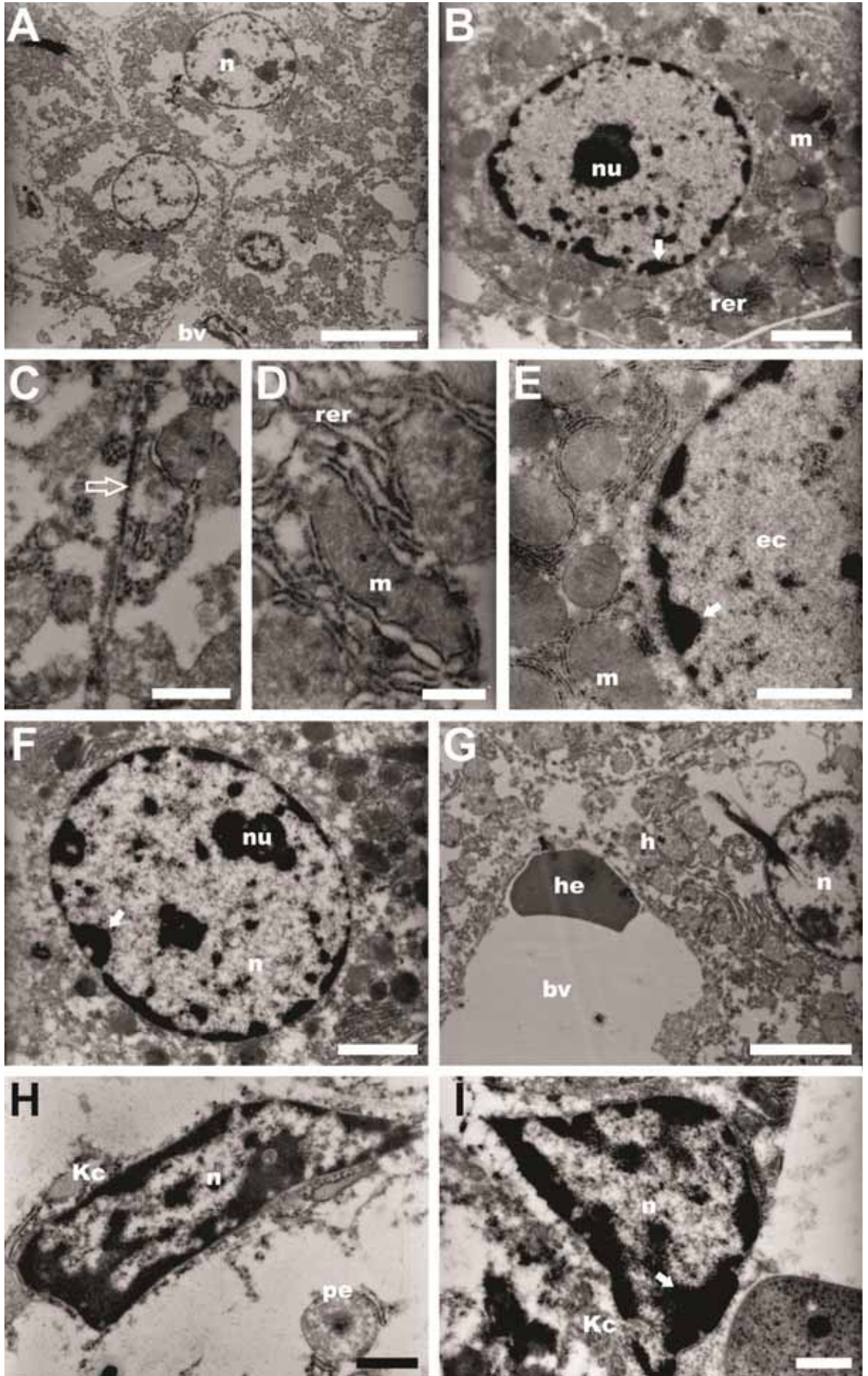


Figura 2: Ultraestrutura dos diferentes tipos de células encontrados no fígado de camundongos do **grupo II** (15mg.kg^{-1}). (A) Visão geral do tecido hepático onde observa-se hepatócitos e célula de Kupffer (**Kc**). (B) Detalhe do hepatócito, com peroxissomos (**pe**) e núcleo (**n**) irregular. (C) Detalhe de dobras da membrana plasmática (**mp**) entre dois hepatócitos adjacentes (**seta**). (D) Detalhe de mitocôndrias (**m**), retículo endoplasmático rugoso (**rer**) e peroxissomo (**pe**) no citoplasma do hepatócito. (E) e (F) Detalhe do núcleo (**n**) e do espaço perinuclear. Em (E) observa-se um núcleo com heterocromatina marginal (**seta**) e nucléolo (**nu**) bem evidente e em (F) núcleo irregular (**n**) com heterocromatina marginal (**seta**) e gotas lipídicas (**li**) no citoplasma perinuclear. (G) Detalhe de vacuolização (**v**) no espaço perinuclear. (H) Detalhe de nucléolo de hepatócito, onde a região fibrosa (**nuf**) está envolta pela região granular (**nug**). (I) Detalhe da célula de Kupffer (**Kc**), com gota de lipídeo (**li**) no citoplasma e núcleo (**n**) com heterocromatina. (J) Detalhe do núcleo da célula de Kupffer (**Kc**) com aspecto mais irregular e maior quantidade de heterocromatina.

bv = vaso sanguíneo

Barras de Escala: A=10 μm
B, D, E, F, G=2 μm
C, H=0,5 μm
I=1 μm

2

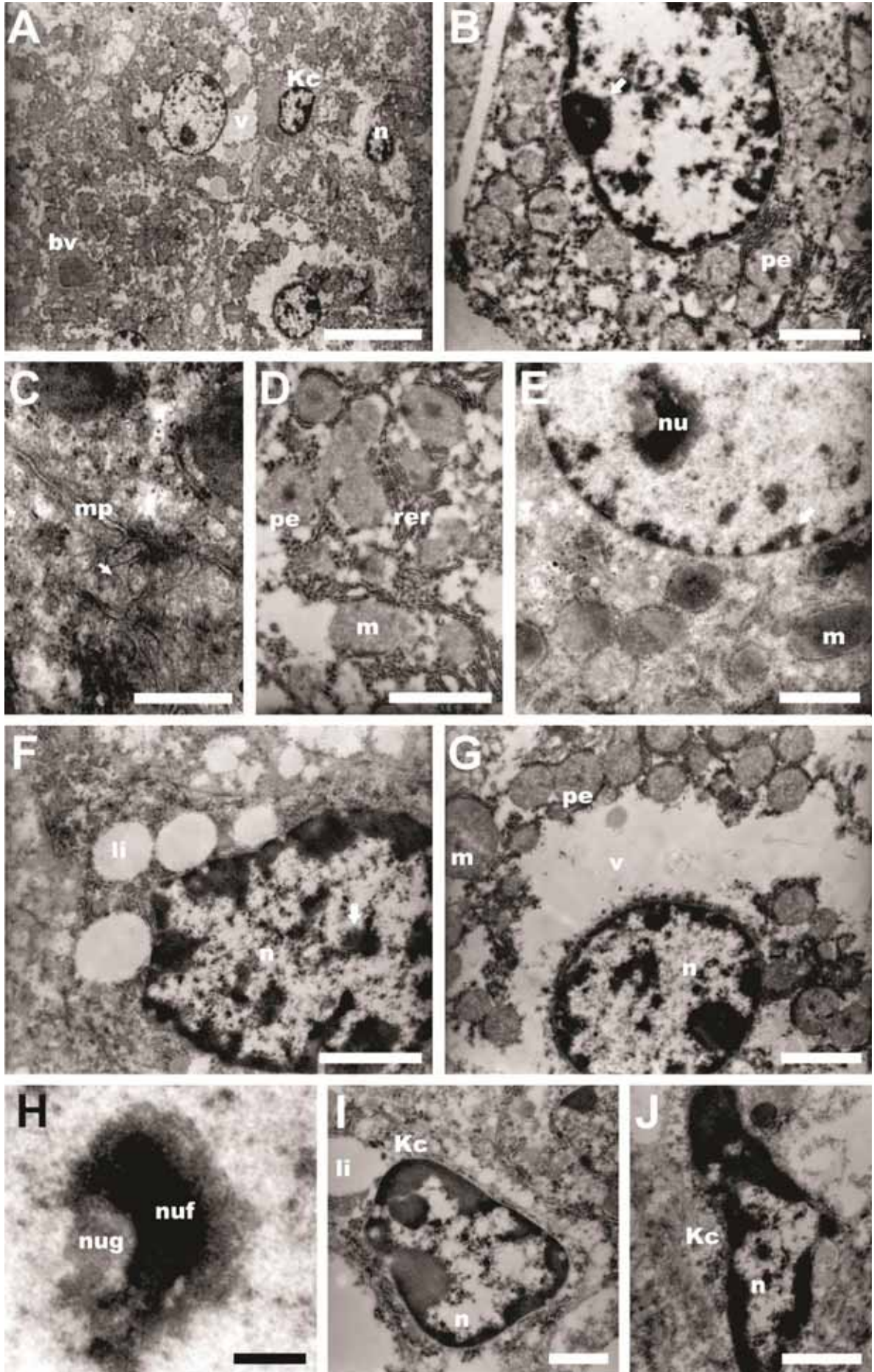


Figura 3: Ultraestrutura dos diferentes tipos de células encontrados no fígado de indivíduos do **grupo III** (25mg.kg^{-1}). (A) Visão geral do tecido hepático, com hepatócitos menores e de forma irregular. (B) Detalhe do hepatócito, com presença de gotas lipídicas (**li**) e áreas vacuolizadas (**v**) ao redor do núcleo (**n**). (C) Detalhe entre dois hepatócitos adjacentes, a seta indica as membranas. (D) Detalhe do citoplasma de hepatócito com gota lipídica (**li**) e área vacuolizada (**v**). (E) Detalhe do núcleo, com heterocromatina marginal (**seta cheia**) e complexo-poro (**seta vazada**), e citoplasma perinuclear, com gotas lipídicas. (F) Detalhe hepatócito e célula de Kupffer (**Kc**). (G) Detalhe do núcleo (**n**) de hepatócito, com nucléolo (**nu**) evidente e grande quantidade de heterocromatina marginal e dispersa (**seta**). (H) Detalhe do nucléolo de hepatócito, onde as regiões, fibrosa e granular, não estão distintas. (I) Detalhe da célula de Kupffer (**Kc**), com vacúolos autofágicos (**v**) no seu citoplasma. (J) Detalhe do núcleo (**n**) da célula de Kupffer com forma irregular e presença de diferentes regiões de heterocromatina.

bv = vaso sanguíneo

Barras de Escala: **A**=10 μm
 B=5 μm
 C, H, J=1 μm
 D=0,5 μm
 E, F, G, I=2 μm

3

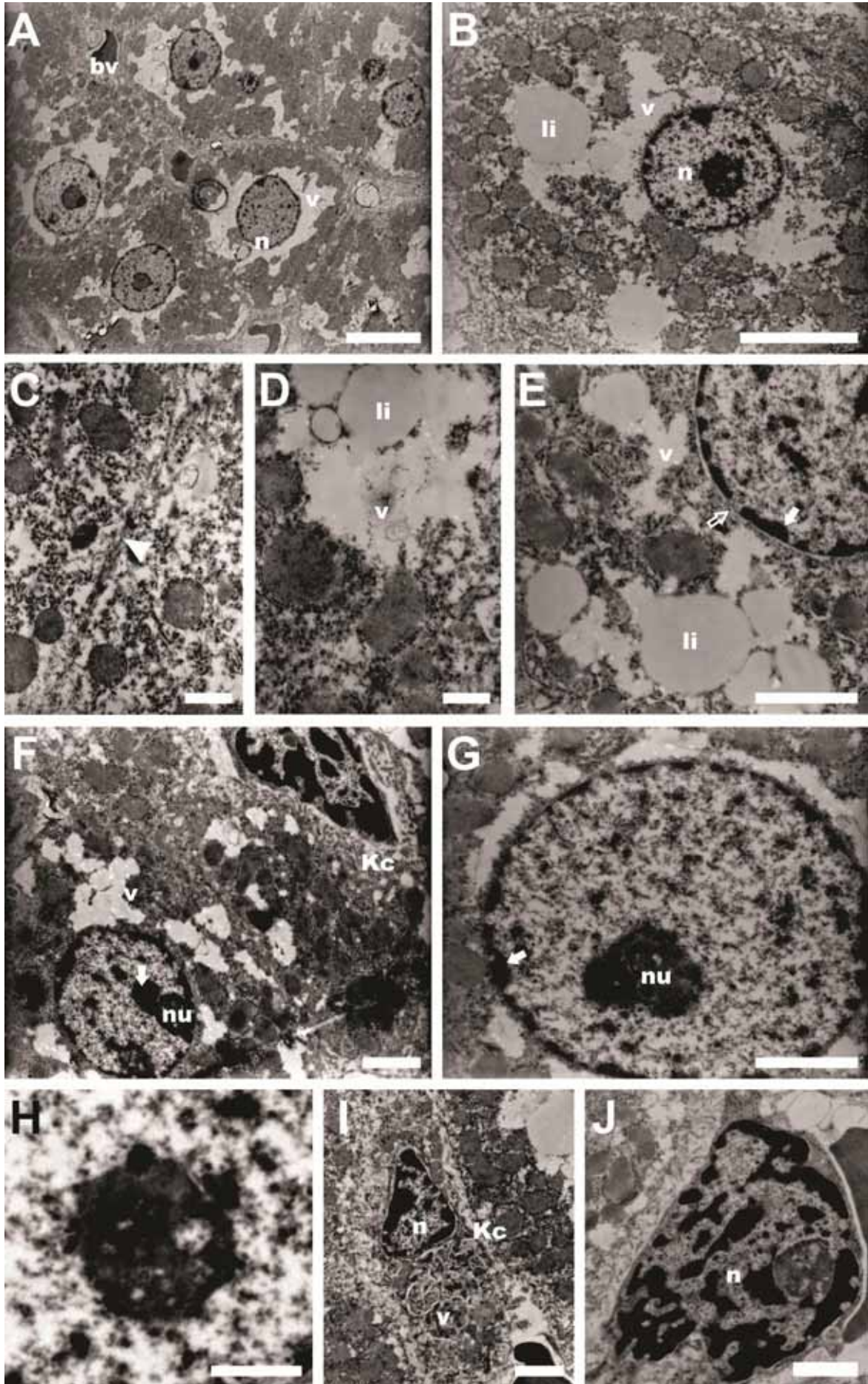
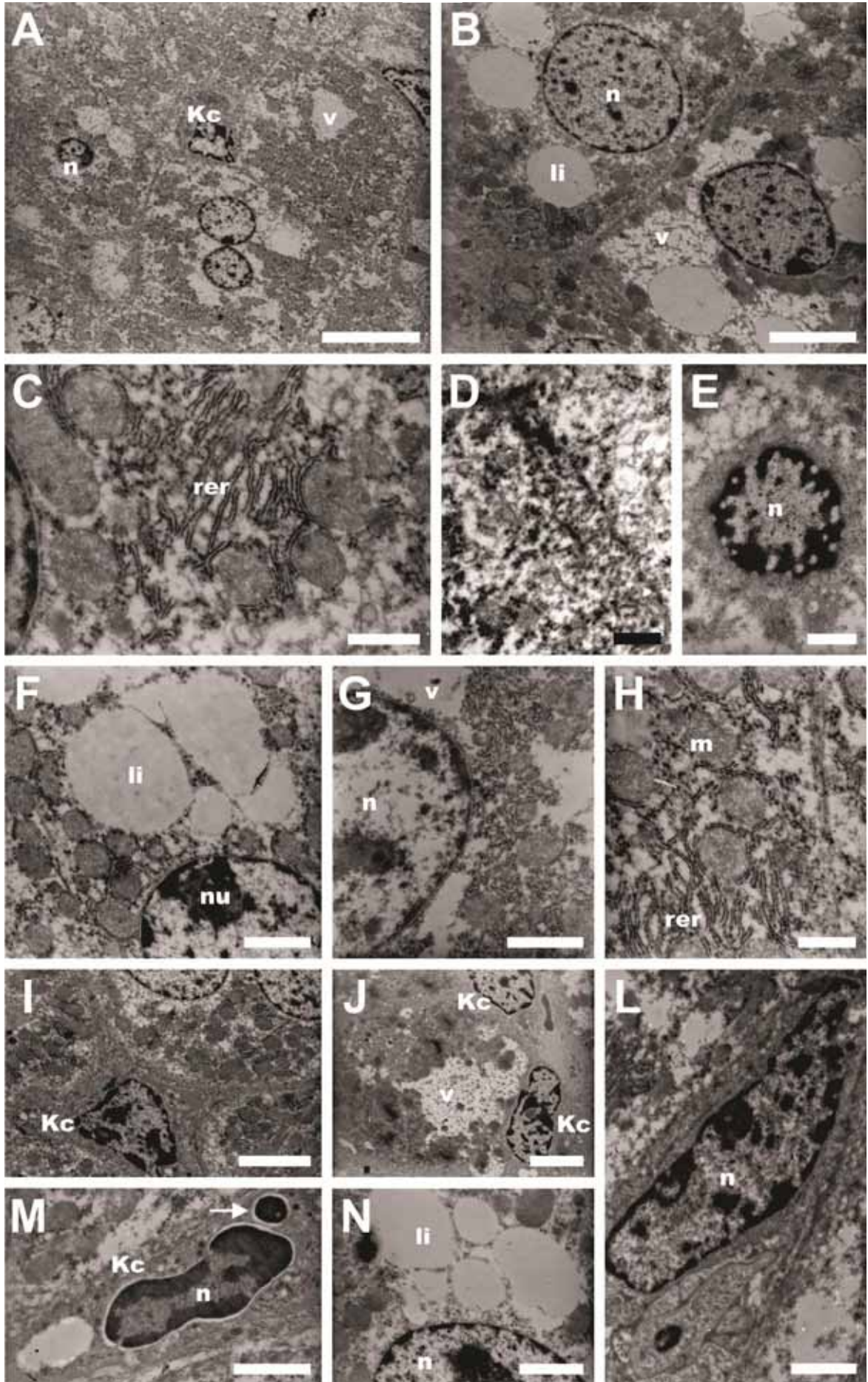


Figura 4: Ultraestrutura dos diferentes tipos de células encontrados no fígado de indivíduos do **grupo IV** (50mg.kg^{-1}). (A) Visão geral do tecido, com hepatócitos com núcleos (**n**) menores e presença de áreas vacuolizadas (**v**). (B) Detalhe de hepatócitos adjacentes, com presença de gotas lipídicas (**li**) e áreas vacuolizadas (**v**) ao redor do núcleo (**n**). (C) Detalhe de retículo endoplasmático rugoso (**rer**) e mitocôndrias (**m**) no citoplasma de hepatócito. (D) Detalhe de entre dois hepatócitos adjacentes, com a presença de membrana irregular e com muitas dobras (**cabeça de seta**). (E) Núcleo picnótico (**n**). (F) Detalhe do citoplasma de hepatócito com grandes gotas lipídicas. (G) Detalhe do núcleo, com forma irregular e heterocromatina dispersa, e citoplasma perinuclear de hepatócito, com áreas vacuolizadas. (H) Detalhe de **rer** e mitocôndrias (**m**). (I) Detalhe de célula de Kupffer (**Kc**) e hepatócitos. (J) Detalhe do citoplasma vacuolizado de hepatócito e duas células de Kupffer (**Kc**) adjacentes. (L) Detalhe do núcleo de célula de Kupffer com forma irregular. (M) Detalhe da célula de Kupffer, onde observa-se núcleo de micronúcleo (**seta**). (N) Detalhe de gotas lipídicas no citoplasma perinuclear do hepatócito.

bv = vaso sanguíneo

Barras de Escala: A=10 μm
B, I, J=5 μm
C, D, E, G=1 μm
F, H, L, M, N=2 μm

4



6. Discussão

O fígado apresenta características singulares no seu suprimento sanguíneo, visto que cerca de 75% do total de sangue que irriga o órgão tem origem venosa, através da veia porta (ROSS & PAWLINA, 2008), e apresenta papel fundamental na absorção, metabolização e inativação de diversos compostos presentes no sangue, incluindo aqueles tóxicos (GONZALES; CRESPO; BRUSKE, 1993). Assim, os hepatócitos podem ser considerados os primeiros alvos da ação destes produtos presentes no sangue, o que torna a análise do fígado uma importante fonte de informação nos estudos de toxicologia (BRAUNBECK, 1998).

A utilização de técnicas de histopatologia e de ultraestrutura na verificação de alterações causadas pela ação de produtos tóxicos tem se mostrado muito eficaz (OLIVEIRA et al., 2008, RAMAIAH; RIVERA; ARTEEL, 2004; STRAUB et al., 2007) e uma importante ferramenta na avaliação dos danos causados por esses produtos nos sistemas dos organismos estudados.

Os resultados apresentados no presente trabalho demonstraram claramente os efeitos tóxicos do fipronil (ingrediente ativo do acaricida Frontline®) sobre o fígado de camundongos a ele expostos, **grupos II, III e IV**, nas concentrações a 15mg.kg^{-1} , 25mg.kg^{-1} e 50mg.kg^{-1} , respectivamente, onde foi possível observar um acúmulo de danos hepáticos à medida que houve o aumento da concentração do produto químico.

Nos grupos onde os camundongos foram expostos, a primeira reação celular observada foi a mudança na forma e no tamanho dos hepatócitos. Oliveira (2010) em estudos anteriores já havia demonstrado a ocorrência de hipertrofia do tecido hepático, utilizando-se da aplicação de técnicas histológicas, em camundongos tratados com fipronil. O presente estudo demonstrou que essa hipertrofia dar-se-ia em grande parte pelo aumento no número de organelas citoplasmáticas, tais como mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (RER), as quais provavelmente estariam envolvidas com a degradação do produto tóxico, principalmente o RER, que estaria particularmente aumentando sua capacidade de sintetizar enzimas, isoformas do citocromo P450, em especial a isoforma CYP3A4, com a função de inativar o produto tóxico, através da S-oxidação. A mesma informação também foi obtida por Tang et al. (2004), ao realizarem estudos *in vitro* com o fipronil, utilizando microssomas de fígado de ratos e de humanos, com diferentes isoformas do citocromo P450, além das interações com a testosterona e o diazepam, substratos do citocromo P450. Outros autores como Das et al. (2006), registraram, *in vitro*, que o fipronil induziria a formação de isoformas

do citocromo P450 (principalmente a isoforma CYP3A4), em hepatócitos humanos quando estes eram expostos ao produto.

Verificou-se no presente estudo que a ação do produto químico atingiu também os núcleos dos hepatócitos dos indivíduos expostos, traduzida, principalmente, na modificação da forma e na composição e distribuição da cromatina. Foi possível observar que o produto agiu principalmente levando a um aumento na condensação e marginalização da cromatina, sinais esses considerados indicativos da ocorrência de processos de morte celular. Gül et al. (2004), em estudos com peixes expostos a poluentes presentes na água, e McGregor et al. (2003), estudando os danos causados pela overdose de paracetamol em humanos, encontraram os mesmos resultados de sinalização de morte celular nos hepatócitos destes indivíduos.

Outra evidência marcante aqui observada, via alterações causadas pela ação do produto tóxico nos fígados dos indivíduos expostos foi o acúmulo de gotas lipídicas (esteatose) no citoplasma dos hepatócitos. A esteatose, em muitos casos, é uma alteração considerada ser o sintoma inicial de algum trauma fisiológico que o organismo sofreu, sendo este um estado que pode ser reversível, caso a injúria não permaneça. Contrariamente, se os danos continuarem a ocorrer eles podem levar a condições patológicas, tais como inflamação crônica do tecido com infiltração de tecido conjuntivo, estado este que pode se agravar até a instalação da fibrose, cirrose e do carcinoma hepático (TRAUSER; ARRESE; WAGNER, 2010) levando inclusive o indivíduo a óbito.

As causas da esteatose, no entanto, são variadas e podem ocorrer ou por motivos isolados ou pela combinação de vários fatores. Contudo, no presente estudo, os efeitos de acúmulo de lipídeos nos hepatócitos dos indivíduos dos grupos de tratamento levaram à desorganização citoplasmática o que provocou alterações estruturais e fisiológicas no órgão, visto que no metabolismo celular, toda a atividade de síntese enzimática parece ter sido concentrada na tentativa de produzir enzimas com a finalidade de metabolizar as moléculas do fipronil e com isso conseguir eliminá-las do sistema. Purohit, Rapaka e Shurtleff (2010) encontraram resultado semelhante estudando receptores de canabinóides (*cannabinoid 1 receptor* - CB1, e *cannabinoid 2 receptor* - CB2) e a relação destes receptores com agentes considerados fatores da formação de esteatose, como o etanol e a dieta rica em gordura. Estes autores observaram que uma vez ativado o CB1 por estes agentes haveria um aumento da síntese de ácidos graxos e uma diminuição da oxidação destes, resultando em acúmulo de lipídeos no fígado. Nai et al. (2010) também observaram a formação de esteatose em fígados de ratos expostos a vapores de metilmetacrilato.

Além da ocorrência da esteatose, outra alteração visível aqui observada, principalmente, nos fígados dos indivíduos do **grupo III**, expostos a 100% da DL₅₀ (50mg.kg⁻¹), foi o aumento do número de células de Kupffer, macrófagos residentes do tecido hepático com diversas funções, que incluem a fagocitose de eritrócitos danificados ou velhos, digestão da hemoglobina, produção de bilirrubina e secreção de enzimas necessárias para a digestão intracelular (processos imunológicos). Dessa forma, o aumento observado no número de células de Kupffer já era esperado, uma vez que estas células estariam respondendo a ação do produto tóxico na tentativa de preservar o tecido hepático, eliminando as áreas com danos.

Neyrinck et al. (2009) estudando o papel das células de Kupffer no metabolismo de glicose e a sensibilidade a insulina em ratos observaram que em indivíduos tratados com dieta rica em gorduras e com as células de Kupffer inibidas através da administração de cloreto de gadolínio (GdCl₃), não se observaram deposição e acúmulo de lipídeos (esteatose) nos hepatócitos, demonstrando que de alguma forma as células de Kupffer participariam do processo desta deposição, muito embora ainda não se tenha clareza sobre como esse processo dar-se-ia.

Outro importante ponto a ser considerado neste trabalho seria a caracterização dos efeitos sistêmicos que o fipronil provocou, visto que em trabalhos recentes desenvolvidos pelos pesquisadores do BCSTM (Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology – UNESP – Rio Claro, SP), mostram a ocorrência de alterações histológicas também na tireóide extraída de camundongos expostos a esse mesmo produto. Leghait et al. (2009), estudando as disfunções da tireóide em ratos, observaram que elas poderiam estar associadas a depuração plasmática dos hormônios produzidos por essas glândulas, bem como a um aumento da atividade da enzima citocromo P450

Assim sendo o presente trabalho demonstrou que se tornaria ainda interessante avaliar os efeitos do fipronil sobre outros órgãos de vertebrados, tais como a hipófise e o rim, o que possibilitaria avaliar de que maneira esse produto tóxico, amplamente utilizado, interferiria no eixo de controle Hipófise-Tireóide, bem como que modificações causaria sobre as células responsáveis pela eliminação deste.

7. Conclusão

Assim por meio das informações obtidas no presente estudo concluiu-se que:

1. O fipronil (ingrediente ativo do acaricida Frontline®) causou alterações no fígado observadas ultraestruturalmente nos hepatócitos de todos os indivíduos dos grupos de tratamento.
2. As alterações ultraestruturais dos hepatócitos expostos a ação do fipronil foi proporcional ao aumento da concentração do produto.
3. O aumento das organelas citoplasmáticas dos hepatócitos, principalmente mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso deu-se também devido a atuação destas na síntese de enzimas responsáveis pela inativação do fipronil e retirada do mesmo do sistema.
4. A esteatose observada nos hepatócitos aumentou proporcionalmente ao aumento da dose do produto tóxico.
5. O fipronil induziu, de maneira indireta, a morte celular, observada através da vacuolização de porções do citoplasma e condensação da cromatina nuclear.
6. O aumento do número de células de Kupffer deu-se na tentativa do organismo em preservar o tecido dos danos causados pelo produto tóxico eliminando áreas afetadas.

8. Referências Bibliográficas

- ALBINATI, A.C.L.; MOREIRA, E.L.T.; ALBINATI, R.C.B. Toxicidade aguda do herbicida Roundup para Piaçu (*Leporinus macrocephalus*). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v.61, n.3. p. 621-627. 2009.
- ALI, A.; NAVAR, J.K.; GU, W.D. Toxicity of a phenyl pyrazole insecticide, fipronil, to mosquito and chironomid midge larvae in the laboratory. *Journal of American Mosquito Control Association*. v.14, n.2, p.216-218. 1998.
- BALANÇA, G.; de VISSCHER, M.N. Effects of very low doses of fipronil on grasshoppers and non-target insects following field trials for grasshopper control. *Crop Protection*. v.16, n.6, p.553-564. 1997.
- BRAUMBECK, T. Cytological alterations in fish hepatocytes following *in vivo* and *in vitro* sublethal exposure to xenobiotics – structural biomarkers of environmental contamination. IN: _____; HINTON, D.E.; STREIT, B. (ED.), *Fish Ecotoxicology*. Birkhäuser: Berlin, p. 61-140.1998.
- COLLINS, H.L.; CALLCOTT, A.M.A. Fipronil: An ultra-low-dose bait toxicant for control of red imported fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *The Florida Entomologist*, v. 81, n. 3, p. 407-415, 1998.
- CONNELLY, P. Environmental fate of fipronil. Dec, 2001 Disponível em: <<http://www.pw.ucr.edu/textfiles/fipronil.pdf>>. Acesso em: 02/10/2010.
- DAS, P.C.; CAO, Y. CHERRINGTON, N.; HODGSON, E.; ROSE, R.L. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chemico-Biological International*. v.164, p. 200-214. 2006.
- FLORES, A.V.; RIBEIRO, J.N.; NEVES, A.A.; DE QUEIROZ, E.L.R. Organoclorados: um problema de saúde pública. *Ambiente & Sociedade*. v.8, n.2, p. 111-125. 2004
- Gonzalez, G., Crespo, S., Bruske, J., 1993. Histo-cytological study of the liver of the cabrilla sea bass, *Serranus cabrilla* (Teleostei, Serranidae), an available model for marine fish experimental studies. *Jour. of Fish Biol.* 43, 363-373.
- GÜL, S.; KURUTAS, E.; YILDIZ, E.; SAHAN, A.; DORAN, F. Pollution correlated modifications of liver antioxidant system and histopathology of fish. (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake. *Environmental International*. v.30, p.605-609. 2004

GUNASEKARA, A.S.; TRUONG, T.; GOH, K.S.; SPURLOCK, F.; TJEERDEMA, R.S. Environmental fate and toxicology of fipronil. *Journal of Pesticide Science*. Japan, v. 32, n. 3, p. 198-199. feb, 2007.

HAINZL, D.; COLE, L.M.; CASIDA, J.E. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chemical Research in Toxicology*. v. 11, n. 12, p. 1529-1535. 1998.

HURLEY, P.M.; HILL, R.N.; WHITING, R.J. Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environmental Health Perspectives*, v. 106, n. 8, p. 437-445, aug, 1998..

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Santos, 1983, p. 48-81.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

MAHLER, B.J.; VAN METRE, P.C.; WILSON, J.T.; MUSGROVE, M.; ZAUGG, S.D.; BURKHARDT, M.R. Fipronil and its degradates in indoor and outdoor dust. *Environmental Science Technology*, v.43, p.5665-5670. 2009.

MARICONI, F.A.M.; GALAN, V.B.; ROCHA, M.T.; MAULE, R.F.; PASSOS, H.R.; SILVA, R.A.A. Ensaio de combate ao cupim de monte *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae). *Scientia Agricola*. v. 51, n. 3, p. 505-508. 1994.

MATSUDA, K.; BUCKINGHAM, S.D.; KLEIER, D.; RAUH, J.J.; GRAUSO, M.; SATTELLE, D.B. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacology Science*. v. 22, n. 11, p. 573-580. 2001.

MCGREGOR, A.H.; MORE, L.J; SIMPSON, K.J.; HARRISON, D.J. Liver-death and regeneration in paracetamol toxicity. *Human & Experimental Toxicology*. v. 22, p.221-227. 2003.

MELO-FILHO, R.M.; VEIGA, A.F.S.L. Eficiência do fipronil no controle do cupim de montículo, *Nasutitermes sp.* (Isoptera: Termitidae) em cana-de-açúcar. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Londrina, v. 27, n. 01, p. 149-152. mar, 1998.

NAI, G.A.; PARIZI, J.L.S.; BATALHA, C.F.; LOPES, C.C.B; RIZZO, M.F. FALCONE, C.E.; BERTÃO, J.M. Toxicidade pulmonar e hepática aos vapores do metil metacrilato: um estudo experimental em ratos. *Revista Brasileira de Toxicologia*. v. 20, n.1 e 2, p. 47-53. 2007.

NEYRINCK, A.M.; CANI, P.D.; DEWULF, E.M.; DE BAKER, F.; BINDELS, L.B. Critical role of Kupffer cells in the management of diet induce diabetes and obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 385, p. 351-356. 2009.

OLIVEIRA, P.R. Avaliação dos efeitos do fipronil (ingrediente ativo do Frontline®) nos ovários de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) e no sangue periférico de roedores. 2010. 173f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 2010

OLIVEIRA, P.R.; BECHARA, G.H.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. *Food and Chemical Toxicology*. v. 46, p. 2459-2466. 2008

OLIVEIRA, P.R.; BECHARA, G.H.; MORALES, M.A.M.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the thick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells. *Food and Chemical Toxicology*. v.47, p. 1255-1267. 2009.

PEARSE, A.G.E. Histochemistry theoretical and applied. Livingstone: Churchill, 1985. p.123-214

PEDRO, J. Detecção da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, do inseticida fipronil no organismo teste *Allium cepa*. 2008. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2008.

PEREIRA, C.P.M.; OLIVEIRA, P.R.; FURQUIM, K.C.S.; BECHARA, G.H.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Effects os fipronil (active ingredient of Frontline®) on salivary gland cells of *Rhipicephalus sanguineus* females (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae) *Veterinary Parasitology*. v.166, p. 124-130. 2009.

POSTAL, J.M.R.; JEANIN, P.C.; CONSALVI, P.J. Field efficacy of a mechanical pump spray formulation containing 0,25% fipronil in the treatment and control of flea infestations and associated dermatological signs in dogs and cats. *Veterinary Dermatology*. Harrisburg, v. 6, p. 153-158, 1995

PRIDGEON, J.W.; PEREIRA, R.M.; BECNEL, J.J.; ALLAN, S.A.; CLARK, G.G.; LINTHICUM, K.J. Susceptibility of *Aedes aegyptis*, *Culex quinquefasciatus* Say, and *Anopheles quadrimaculatus* Say to 19 pesticides with different modes of action. *Journal of Medical Entomology*. v. 45, n. 1, p. 82-87. 2008.

PUROHIT, V.; RAPAKA, R.; SHURTLEFF. Role of Cannabinoids in the development of fatty liver (steatosis). *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*. v.12, n.2, p. 233-238. 2010.

RAMAIAH, S.K.; RIVERA, C.; ARTEEL. Early-phase alcoholic liver disease: an update on animal models, pathology and pathogenesis. *International Journal of Toxicology*. v. 23, p. 217-231. 2004.

RHÔNE-POULENC. Atelier International Fipronil/lutte antiacridienne. Lyon: Rhône-Poulenc Agrochimie, 1995.

ROSS, M.H.; PAWLINA, W. Histologia: Em correlação com biologia celular e molecular. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 908p.

RUBIN, C.S.; HOLMES, A.K.; BELSON, M.G.; JONES, R.L.; FLANDERS, W.D.; KIESZAK, S.M.; OSTERLOH, J.; LUBER, G.E.; BLOUNT, B.C.; BARR, D.B.; STEINBERG, K.K.; SATTEN, G.A.; MCGEEHIN, M.A.; TODD, R.L. Investigating childhood leukemia in Churchill County, Nevada. *Environmental Health Perspectives*. v.115, n.1, p. 151-157. 2007.

SHAFER, T.J.; MEYER, D.A.; CROFTON, K.M. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: Critical review and future research needs. *Environmental Health Perspectives*. v.113, n.2, p. 123-136. 2005.

STRAUB, A.C.; STOLZ, D.B.; VIN, H.; ROSS, M.A.; SOUCY, N.V.; KLEI, L.R.; BARCHOWSKY, A. Low level arsenic promotes progressive inflammatory angiogenesis and liver blood vessel remodeling in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v.222, p.327-336. 2007.

TANG, J.; USMANI, K.A.; HODGSON, E.; ROSE, R.L. In vitro metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam. *Chemico-Biological Interactions*, v.147, p.319-329. 2004.

TERÇARIOL, P.R.G. Avaliação neurocomportamental de ratos expostos agudamente ao fipronil – Influência de Diazepam e Flumazenil. 2007. 78f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, 2007.

TINGLE, C.C.; ROTHER, J.A.; DEWHURST, C.F.; LAUER, S.; KING, W.J. Health and environmental effects of fipronil. Nov, 2000. Disponível em: < <http://www.pan-uk.org/Publications/Briefing/fipronil.pdf>>. Acesso em: 02/10/2010.

TINGLE, C.C.; ROTHER, J.A.; DEWHURS, C.F.; LAUER, S. KING, W.J. Fipronil: Environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. v. 176, p. 1-66, 2003.

TRAUSER, M. ARRESE, M. WAGNER, M. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1801, p.299-310. 2010.

USA Environmental Protection Agency. Fipronil; Pesticide Tolerance. *Federal Register*., v. 63, n. 137, p. 38483-38495, jul, 1998. Disponível em: <<http://www.epa.gov/EPA-PEST/1998/July/Day-17/p18987.htm>>. Acesso em: 02/10/2010.

Rio Claro, 17 de dezembro de 2010.

Aluno:

Mateus Ferreira

Orientadora:

Profª. Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias