



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



João Leandro Chaguri

Efeitos da exposição ao pesticida fipronil nas alterações
pressóricas em ratos acordados

Botucatu

2016



Efeitos da exposição ao pesticida fipronil nas alterações pressóricas em ratos acordados

Aluno: João Leandro Chaguri

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Francisco Godinho

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, Unesp, para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Biotecnologia.

Botucatu

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Chaguri, João Leandro.

Efeitos da exposição ao pesticida fipronil nas alterações pressóricas em ratos acordados / João Leandro Chaguri. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Carlos Alan Candido Dias Junior

Coorientador: Antonio Francisco Godinho

Capes: 21007004

1. Pesticidas - Efeito fisiológico. 2. Exposição a praguicidas. 3. Biomarcadores farmacológicos. 4. Toxicidade - Testes. 5. Pressão arterial - Regulação. 6. Hipertensão. 7. Pressão Sanguínea.

Palavras-chave: Biomarcadores; Fipronil; Praquicida; Toxicidade cardiovascular.

Quanto ao resto, sabemos que em todas as coisas Deus intervém para o bem daqueles que o amam; daqueles que são chamados segundo o seu desígnio.

(Romanos 8,28)

Dedico este trabalho ao grande amor de minha vida, minha esposa Alba, que tem sido a grande companheira e incentivadora nesta jornada e às minhas filhas-princesas Giovanna Maria e Maria Clara.

Agradecimentos

A **Deus** que, em sua Infinita Bondade, providenciou todas as coisas para que este trabalho fosse feito. Sem o Senhor eu nada seria.

Aos meus orientadores **Carlos Alan Candido Dias Junior** e **Antonio Francisco Godinho**, que sempre acreditaram em minha capacidade e foram incentivadores deste processo. Obrigado pela paciência e pela amizade. Aprendi e aprendo muito com vocês.

Aos companheiros de pós-graduação **Fábio Anselmo, Victor Hugo Gonçalves Rizzi, Regina Aparecida do Nascimento, Daniel França Horta e José Sérgio Possomato Vieira**, pela ajuda e pela amizade. Caminhar com vocês fez este percurso tornar-se menos pesado.

Ao **Hélio Kushima** pela ajuda nas análises realizadas.

Aos amigos e companheiros do **CEATOX, Alaor Aparecido Almeida, Antonio Francisco Godinho, Fábio Iachel da Silva, Josie Michelle Juvencio, Julliano da Silva Otoni, Rita de Cássia Ferrari, Sarah Setznagl e Valéria Cristina Sandrim**, pelo apoio e compreensão.

Aos amigos, professores, funcionários e alunos da **Faculdade Sudoeste Paulista – FSP**. Com vocês tenho aprendido cada vez mais a arte de ensinar.

Aos alunos de Iniciação Científica **Kaio Henrique Luizetti, Bruna Bengosi Lopes, Fernando Gamaliel Theodoro da Silva, Taina Mazetto, Caique Faria, Faber Machado**. A colaboração de vocês neste processo jamais será esquecida.

Aos meus irmãos do **Grupo de Oração Oásis e da Renovação Carismática Católica**. Suas orações e a convivência em comunidade me sustentam.

Ao amigo-irmão **Wedson Maria Costa Junior**. Amizade que surgiu de uma forma inesperada e tem sido uma grande escola para mim.

Aos meus pais, **Jairo Chaguri Filho e Santina Aparecida Caprioli Chaguri**, e meu irmão **Rodrigo Chaguri** que há muito tempo ajudaram a dar o pontapé inicial nesta jornada. Vocês foram e são fundamentais.

A minha esposa **Alba Nascimento de Oliveira Chaguri** e minhas princesas **Giovanna Maria de Oliveira Chaguri e Maria Clara de Oliveira Chaguri**, que souberam entender as ausências e todo o estresse vividos nestes tempos. Vocês são e sempre serão o porto para onde volto e renovo minhas forças, onde posso ser eu mesmo, amando e sendo amado. Amo vocês!!!

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do fipronil	11
Figura 2 – Vias de Degradação do Fipronil no meio ambiente	15
Figura 3 – Pressão arterial aumentada após exposição ao fipronil	26
Tabela 1 – Classificação Toxicológica dos Agrotóxicos	13

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIQUIM - Associação Brasileira da Indústria Química
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEATOX - Centro de Assistência Toxicológica
CL₅₀ - Concentração Letal média
CYP - Citocromo P450
DDT - Diclorodifeniltricloroetano
DL₅₀ - Dose Letal Mediana
EPA - Agência de Proteção Ambiental
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
GABA - Gamma-AminoButyric Acid ou Ácido Gama Aminobutírico
INCA - Instituto Nacional do Câncer
SNC - Sistema Nervoso Central
T_{1/2} - tempo de Meia Vida
T4 - Tiroxina
TSH - Hormônio Estimulante da Tireóide

RESUMO

O fipronil é um inseticida fenilpirazol amplamente utilizado na Medicina Veterinária, na agricultura e domesticamente para o controle de pragas. O mecanismo responsável pela sua ação tóxica consiste na inibição seletiva dos receptores do ácido gama amino butírico GABA associado a canais de cloreto. Estudos recentes mostram que fipronil afeta organismos não-alvo, incluindo populações de espécies ambiental e, potencialmente, os seres humanos. O presente estudo verificou se a exposição a fipronil afeta a pressão arterial sistólica e biomarcadores relacionados. Assim, fipronil foi administrado oralmente a ratos (30 mg / kg / dia) durante 15 dias (grupo Fipronil) ou solução fisiológica (grupo controle). Fipronil aumentou significativamente a pressão arterial sistólica (158 ± 13 mmHg), em relação ao grupo controle (127 ± 3 mmHg). Significativamente, níveis mais elevados de fipronil no plasma foram observados no grupo Fipronil ($0,46 \pm 0,09 \mu\text{g} / \text{mL}$ contra $0,17 \pm 0,11 \mu\text{g} / \text{mL}$ no grupo de controle). O grupo exposto ao Fipronil apresentou ganho de peso menor em comparação com o grupo controle. Enquanto o fipronil resultou num aumento das concentrações de endotelina-1, a redução da capacidade antioxidante e níveis menores de metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) e Nitrito/Nitrato em relação ao grupo controle, não foram observadas alterações em marcadores séricos renal e hepáticos. Portanto, este estudo sugere que o fipronil provoca hipertensão e a endotelina-1 desempenha um papel importante. Além disso, estes resultados sugerem que as reduções de tanto a MMP-2 e NO podem contribuir com a elevação da pressão sanguínea sistólica observada com fipronil.

Palavras-chave: fipronil, toxicidade cardiovascular, praguicida, biomarcadores.

SUMÁRIO

PRÓLOGO

<u>INTRODUÇÃO</u>	10
Fipronil	11
Toxicocinética	14
Mecanismo de Toxicidade	17
Ecotoxicidade	18
Neurotoxicidade	20
Carcinogênese	22
Genotoxicidade e Mutagenicidade	23
Toxicidade Reprodutiva	23
Hepatotoxicidade	24
Efeitos cardiovasculares	25
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	28
<u>MANUSCRITO REFERENTE À DISSERTAÇÃO</u>	42
Artigo publicado pelo <i>Environmental Toxicology and Pharmacology</i>	

PRÓLOGO

Esta dissertação será apresentada na forma de uma introdução consistindo em uma revisão sobre o Fipronil e seus aspectos toxicológicos, seguida pelo manuscrito referente a dissertação, publicado em março de 2016 *Environmental Toxicology and Pharmacology* conforme normas desta revista.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos há uma crescente preocupação de que os praguicidas e outras substâncias químicas podem modificar a função endócrina normal de seres humanos e animais selvagens. Praguicidas hormonalmente ativos (também conhecido como desreguladores endócrinos) podem causar uma variedade de efeitos adversos, incluindo os riscos de desenvolvimento, reprodutivos e comportamentais. Sabe-se que a exposição de roedores e outros mamíferos, incluindo seres humanos, aos praguicidas pode gerar efeitos de toxicidade (TERÇARIOL; GODINHO, 2011).

Os praguicidas estão entre os mais importantes fatores de risco para a saúde dos trabalhadores rurais e para o meio ambiente. Utilizados em grande escala por vários setores produtivos e mais intensamente pelo setor agropecuário, tratamentos de madeiras para construção, indústria moveleira, armazenamento de grãos e sementes, combate às endemias e epidemias. Enfim, as utilidades desses produtos excedem em muito o que comumente se conhece (SILVA et al., 2006).

Começou-se a discutir os impactos ambientais e à saúde devido ao uso indiscriminado de praguicidas na década de 1960, o que culminou na proibição do uso do diclorodifeniltricloroetano (DDT) nos EUA pela Agência de Proteção Ambiental (EPA). (MURRAY; TAYLOR, 2000). Foi criado em 1986 o Código Internacional de Conduta para Distribuição e Uso de Agrotóxicos, estabelecendo-se padrões de conduta para o comércio e uso seguro e eficiente dos agrotóxicos, mas a fiscalização e vigilância do comércio destes produtos ainda são ineficientes (ABREU; ALONZO, 2014).

Em 2013, a Associação Brasileira da Indústria Química (Abiquim) divulgou um aumento de 10,3% nas vendas de agrotóxicos no Brasil, atingindo movimentação de US\$ 9,4 bilhões em 2012, ante US\$ 8,5 bilhões em 2011 (ABIQUIM, 2013). Nos últimos 12 anos, o mercado brasileiro de agrotóxicos cresceu 190%, tornando o País, desde 2008, o maior consumidor dessas substâncias no mundo (CARNEIRO et al. 2012; RIGOTTO et al. 2012; ANVISA, 2009). O recorde de consumo de agrotóxicos e o contexto atual químico-dependente de produção de alimentos são reflexos da "modernização do campo" adotada pelo governo brasileiro, a partir da década de 1960, que modificou as práticas agrícolas no País (JACOBSON et al., 2009).

O Instituto Nacional do Câncer (Inca), em abril de 2015, divulgou documento no qual afirma que o Brasil tem um consumo médio mensal de 5,2 quilos de veneno agrícola por habitante. Este instituto se posicionou contra as atuais práticas de uso de

praguicidas e ressaltou os riscos da exposição crônica, gerando infertilidade, impotência, abortos, malformações, neurotoxicidade, desregulação hormonal, efeitos sobre o sistema imunológico e câncer (INCA, 2015)

Os problemas relacionados com o uso de praguicidas têm levado a uma crescente inquietação por parte dos órgãos responsáveis que atuam com o objetivo de se obter boas práticas de utilização destas substâncias. Principalmente porque os países que mais utilizam estes compostos nas culturas agrícolas dispõem de recursos humanos pouco treinados, pouca ou nenhuma infra-estrutura para fiscalização ou formação adequada e populações altamente suscetíveis com elevadas taxas de analfabetismo e precárias condições de saúde (WESSELING et al., 2005).

FIPRONIL

O Fipronil ($C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$, cujo nome químico é 5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil) fenil]-4-[(trifluorometil) sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitrila – Figura 1) (CONNELLY, 2001) é um pesticida derivado quimicamente da família do fenilpirazol, considerado de segunda geração, altamente ativo e de amplo espectro (WILDE et al., 2001), sendo descoberto por Rhone Poulenc Agro em 1987, introduzido no mercado em 1993 e registrado como um pesticida nos Estados Unidos da América em 1996 (CONNELLY, 2001; GUNASEKARA et al., 2007). O fipronil foi o primeiro inseticida deste grupo utilizado para o controle de pragas (IKEDA et al., 2001).

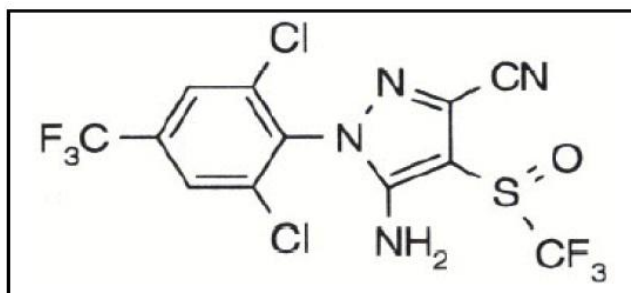


Fig. 1 – Fórmula estrutural do fipronil

Fonte: TINGLE et al., 2003

É um desregulador do sistema nervoso similar em toxicidade para organoclorados clássicos, tais como dieldrin e endosulfan, mas com cerca de 500 vezes maior toxicidade seletiva para insetos e baixa toxicidade para mamíferos (GRANT et al., 1998; RATRA; CASSIDA, 2001).

Comercialmente pode ser encontrado com vários nomes como: Icon[®], Regent[®], Ascend[®], Chipco[®], Adonis[®], Frontline[®].

É classificado toxicologicamente como moderadamente tóxico para ratos e camundongos (HAINZL; CASIDA, 1996). A DL₅₀ oral para ratos é 97mg/kg, sendo considerado tóxico para os mamíferos através da ingestão. É levemente tóxico por via dérmica para ratos, com uma DL₅₀ maior que 2000mg/kg (CONNELLY, 2001).

O fipronil, em sua forma pura, é um pó branco, com massa molar de 437 g mol⁻¹ (TINGLE et al., 2003; AMARAL, 2012) com odor de bolor (TINGLE et al., 2003). Apresenta ponto de fusão de 195,5 a 203°C, sua solubilidade de 0,0024 g L⁻¹ em água no pH 5,0 e 0,0022 g L⁻¹ no pH 9,0, sendo altamente solúvel em solventes orgânicos (545,9 g L⁻¹ em acetona) (AMARAL, 2012).

O fipronil é conhecido em mais de 70 países e utilizado em mais de 100 diferentes tipos de culturas para o controle de pestes (ZHAO; SALGADO, 2010; AMARAL, 2012). Foi introduzido na Europa e nos Estados Unidos em meados de 1990 (LI; AKK, 2008) e autorizado para comercialização na França em 1994 (BICHON et al., 2008), porém, por causa de sua possível implicação na mortalidade de abelhas, desde 2004, a sua utilização como produto fitossanitário foi suspensa neste país (OLIVEIRA, 2010). Nos Estados Unidos, o fipronil não é registrado para uso na agricultura no estado da Califórnia (GUNASEKARA et al., 2007). Também teve seu uso proibido nos demais países da Europa pelo alto grau de toxicidade, comprovado pelos problemas sérios registrados em organismos expostos (OLIVEIRA, 2010). No entanto, em alguns países não europeus, continua a ser um dos ectoparasiticidas mais utilizados para animais de estimação na medicina veterinária (LACROIX et al., 2010; ZHAO; SALGADO, 2010).

Em medicina veterinária o fipronil tem sido amplamente utilizado para o controle de pulgas, carrapatos e piolhos mastigadores de bovinos, cães e gatos. Em agricultura este agente é usado como inseticida, formicida e cupinicida em culturas de algodão, arroz, batata, cevada, feijão, soja, milho, cana-de-açúcar, trigo e pastagens (HAINZL; CASIDA, 1996; MOHAMED et al., 2004; SZEGEDI et al., 2005; WILDE et al., 20001). É eficaz para o controle de cupins e gafanhotos, tanto na fase de larva como em estágio adulto (CONNELLY, 2001), bem como insetos resistentes aos inseticidas: piretróides, organofosforados, e carbamato (CONNELLY, 2001; GUNASEKARA et al., 2007).

Segundo monografia publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o fipronil pode também ser utilizado como produto domissanitário no controle de

formigas em apresentações de isca granulada ou pó seco, para produtos de venda livre para jardinagem amadora. Pode ser utilizado também como preservante de madeira (ANVISA, 2012).

Na agricultura pode ser empregado em aplicação no solo nas culturas de batata, cana-de-açúcar e milho. Aplicação foliar nas culturas do algodão, arroz, eucalipto e soja. Aplicação em sementes de algodão, amendoim, arroz, cevada, feijão, milho, pastagens, sorgo, soja e trigo. Aplicação foliar em mudas de eucalipto. Aplicação no controle de formigas e cupins, e aplicação na água de irrigação para o arroz irrigado (ANVISA, 2012).

No Brasil o fipronil está na categoria de classificação toxicológica classe II - altamente tóxico (Tabela 1) (ANVISA, 2012).

TABELA 1. Classificação toxicológica dos agrotóxicos

Classe Toxicológica	Toxicidade
I	Extremamente tóxico
II	Altamente tóxico
III	Mediamente tóxico
IV	Pouco tóxico

Fonte: BRAIBANTE e ZAPPE, 2012.

O fipronil é frequentemente apresentado como isca de inseto, spray para pets e como produtos granulados para gramados, incluindo também líquidos, pós e grânulos e microgrânulos dispersíveis em água (TINGLE et al., 2003)

Estudos crônicos com alimentação incluindo fipronil para ratos mostraram que ocorrem: ansiedade, diminuição do ganho de peso, diminuição do consumo alimentar e da eficiência na conversão alimentar, diminuição dos valores hematológicos, alterações de parâmetros sanguíneos (colesterol, cálcio e proteína), alterações dos hormônios da tireóide, alterações na bioquímica da urina, alterações grosseiras à necropsia, aumento do peso do fígado e tireoide e efeitos renais (U.S. EPA, 1996).

Além deste efeito, o fipronil também provoca efeitos de toxicidade reprodutiva (U.S.EPA, 1996), hepatotoxicidade (SOUSA et al., 1997), alterações comportamentais (TERÇARIOL; GODINHO, 2011) e desregulação endócrina (U.S.EPA, 1998).

Foi publicado um caso clínico descrevendo os sintomas induzidos por fipronil em pacientes, relatando dor de cabeça, náuseas, vertigem e fraqueza (CHODOROWSKI

e ANAND, 2004). Este relato indica que inseticidas de 2º geração também podem provocar graves efeitos em humanos em casos de exposição prolongada. Embora várias investigações recentes tentem esclarecer a toxicidade neuronal de fipronil em mamíferos, há poucos dados acerca de efeitos fisiológicos detalhados (FUNG et al., 2003).

Um dos grandes problemas observados é a ocorrência de risco de exposição ocupacional para seres humanos quando o fipronil é utilizado, por exemplo, pelo operador de pulverização. Fipronil é pouco penetrante em pele humana e quando ocorre é improvável ser maior que 1% - 3% da dose aplicada. Apesar disso, neste tipo de ocupação, podem ser observados sintomas como reações oculares, respiratória, gastrointestinal e outras reações sistêmicas, rapidamente reversíveis. (TINGLE et al., 2003).

TOXICOCINÉTICA

Segundo dados da literatura corrente fipronil pode sofrer transformações metabólicas e degradações abióticas a vários produtos fundamentais (Figura 2) gerando MB 46513 (fipronil desulfínil) por fotólise, MB 45950 (fipronil sulfeto) por redução, MB 46136 (fipronil sulfona) por oxidação e RPA 200766 (fipronil amido) por hidrólise (PEI et al., 2004).

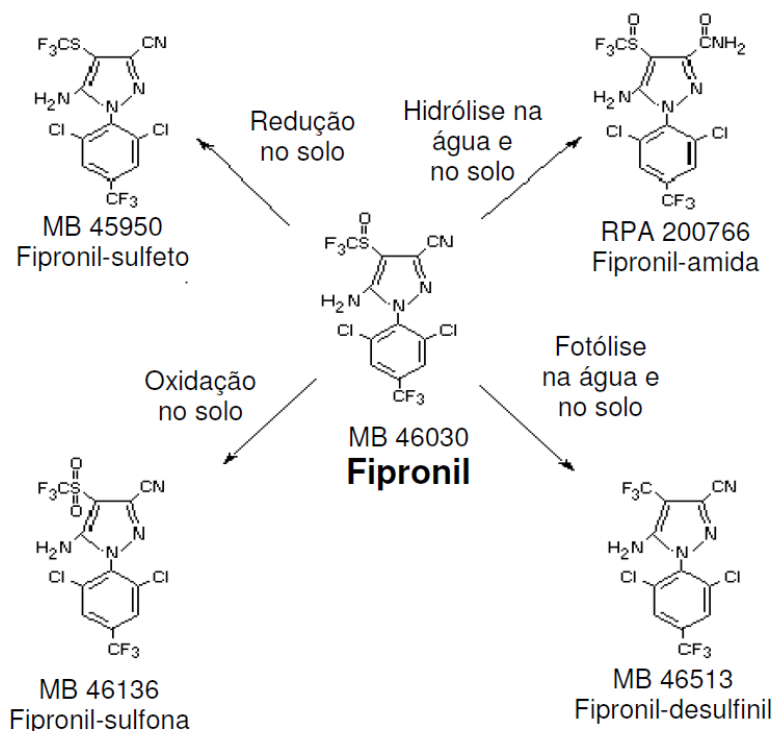


Fig. 2 – Vias de Degradação do Fipronil no meio ambiente

Fonte: PEI et al., 2004

Segundo TINGLE et al. (2003) o principal metabólito, fipronil-desulfinil (MB 46513), é extremamente estável e é mais tóxico que o composto de origem sendo aproximadamente 10 vezes mais tóxico para mamíferos, em testes de laboratório, que o produto original

A degradação é lenta no solo argiloso, com uma meia vida de 34 dias (BOBE et al., 1997).

Nos organismos vivos, tanto o metabólito fipronil-sulfona quanto o produto de degradação fipronil-desulfinil, foram relatados como sendo mais tóxicos para insetos, mamíferos, peixes e pássaros que o próprio composto original (DAS et al., 2006).

Em estudo com ratos, após administração por via oral, fipronil foi rapidamente metabolizado e o pico plasmático foi alcançado 5,5 horas após o tratamento; a meia-vida de eliminação foi de 183 horas em machos e 245 horas em fêmeas. O fipronil se distribuiu por todos os tecidos, com maior predomínio no tecido adiposo (MARTINS, 2009). Estudos metabólicos mostraram que havia um potencial maior de bioacumulação do produto MB-46513 (fipronil-desulfinil), em tecidos gordurosos (U.S.EPA, 1998).

Em carne bovina, outro estudo mostrou resultados semelhantes confirmando a lenta depuração do fipronil na gordura, resultando em uma acumulação leve sob constante condição de pasto. Segundo estes autores, a meia vida do fipronil na gordura da carne é em torno de 18 dias (TINGLE et al., 2003).

Um estudo com o tratamento por via tópica em cães e gatos detectou fipronil concentrado em glândulas sebáceas, camadas epiteliais que rodeiam os pelos 2 meses após o tratamento, sugerindo a difusão passiva do fipronil no pelo e pele (JACKSON et al., 2009)

Relativamente, pouco se sabe sobre a capacidade do fipronil ser metabolizado em vertebrados. Estudos in vivo de mamíferos indicam que a via metabólica principal para o fipronil envolve a formação oxidativa do metabólito sulfona (DAS et al., 2006; CID, 2012). Estudos com microsomas hepáticos humanos e isoformas do citocromo P450 (CYP) recombinantes demonstraram que a formação da sulfona é quase exclusivamente o resultado da atividade do CYP3A4. Embora limitado, o metabolismo por CYP2C19 também foi relatado. O metabólito sulfona, assim como produtos da fotodegradação, o fipronil-dessulfinil, foram relatados como sendo mais tóxicos para insetos, mamíferos, peixes e aves do que o próprio composto original (DAS et al., 2006; CID, 2012). TANG et al. (2004), em seus estudos, concluíram que, o CYP3A4 é a

principal enzima responsável pelo metabolismo do fipronil. Também constataram que a principal via metabólica ocorre por meio da oxidação do grupo tio éter para a formação do fipronil-sulfona e a enzima responsável pela oxidação é uma isoforma do citocromo P450. In vitro, fipronil aumenta atividades de CYP1A1 e 3A4 em hepatócitos humanos. Em contraste, nenhum efeito claro de fipronil foi evidenciado nas atividades de microsomas de ratos e coelhos tratados com fipronil (1,2 e 5 mg/kg/d por 4 e 14 dias) (LEGHAIT et al., 2009). Fipronil é metabolizado, principalmente, em sulfona (CABONI et al., 2003; SILVA, 2008; MARTINS, 2009; LACROIX et al., 2010), sulfeto, dessulfinil (CABONI et al., 2003; MARTINS, 2009) e amida por hidrólise (SILVA, 2008; MARTINS, 2009). Outro metabólito da transformação do fipronil resulta em ácido sulfônico, mas em menor grau (GAUTHIER et al., 2008). A via predominante do metabolismo do fipronil é a oxidação, em sulfona correspondente. Esta reação, principalmente catalisada pelo citocromo P450 isoforma CYP3A4, pode ser considerada como uma via de bioativação uma vez que o metabólito é a sulfona (CRAVEDI et al., 2013). A sulfona tem seis vezes mais afinidade do que o composto original para bloquear os receptores GABA no cérebro e vinte vezes maior potência em bloquear os canais de cloreto ativados pelo GABA em mamíferos (JACKSON et al., 2009; CID, 2012; CRAVEDI et al., 2013) do que nos insetos (JACKSON et al., 2009), em comparação com o fipronil inalterado. Fipronil-sulfona também é suspeito de ser mais tóxico do que o fipronil em diferentes espécies. Além disso, o fipronil-sulfona persiste no sangue por muito mais tempo que o próprio fipronil (CRAVEDI et al., 2013). Fipronil-dessulfinil, o primeiro metabólito ambiental (fotodegradação) do fipronil, é 9 a 10 vezes mais ativo sobre os canais de cloro de mamíferos do que o composto original, reduzindo a seletividade entre os insetos e humanos quando expostos para este metabólito (JACKSON et al., 2009). Fipronil-dessulfinil apresenta um nível de toxicidade para mamíferos 10 vezes superior ao fipronil, além de ser extremamente mais estável (FERREIRA, 2010; FERREIRA et al., 2011; FERREIRA et al., 2012). O fipronil é lentamente metabolizado e excretado em ratos (CRAVEDI et al., 2013).

A concentração máxima do fipronil no sangue ocorre de 4 a 6 horas após sua ingestão e começa a declinar lentamente, sendo seu processo de eliminação lento (AMARAL, 2012). O tempo de meia vida ($T_{1/2}$) longo do fipronil no sangue, de 150 a 245 horas em alguns casos, pode ser atribuído a liberação lenta de resíduos de gordura e pode sugerir potencial de bioacumulação de produtos metabólicos do fipronil (TINGLE et al., 2003; CID, 2012), pois, devido a intensa recirculação êntero-hepática, possui

elevado tempo de meia-vida, tornando-se assim, um fator de acréscimo de sua toxicidade (SILVA, 2008). Em uma pesquisa com ratos, o fipronil apresentou tempo de meia-vida em sangue total, após administração oral na dose de 4 mg/Kg, de 6,2 a 8,3 dias (JACKSON et al., 2009; CID, 2012).

A excreção do fipronil e de seus metabólitos é realizada principalmente através das fezes e em menor quantidade através da urina (AMARAL, 2012). Em ratos, a excreção do fipronil ocorre 75 % pelas fezes e 25 % pela urina (TINGLE et al., 2003; JACKSON et al., 2009; UDO, 2012) tanto para machos, quanto para fêmeas (TINGLE et al., 2003).

MECANISMOS DE TOXICIDADE

Fipronil é uma molécula extremamente ativa e um potente desregulador do Sistema Nervoso Central (SNC) dos insetos e dos mamíferos. O mecanismo responsável pela sua ação tóxica consiste na inibição seletiva dos receptores do ácido gama-amino butírico (GABA) associado a canais de cloreto (GARSSADI et al., 1994; ZHAO et al., 2004; GROSMAN et al., 2006). A molécula de fipronil inibe de forma não-competitiva o receptor do GABA, fixando-se na porção internalizada deste receptor ionotrópico, inibindo o influxo celular dos íons cloro, anulando assim o efeito neuro-regulador do GABA (SARTOR; SANTARÉM, 2006) e resultando em atividade neural excessiva; o aumento da atividade neural causa paralisia e, conseqüentemente, a morte do organismo exposto (MANRIQUE, 2009; ZHAO et al. 2004).

Matsuda et al. (2001) observaram que fipronil possui maior afinidade por receptores-transmissores de insetos que de mamíferos que resulta em menor toxicidade em relação a outros inseticidas.

Esta seletividade deve-se à elevada capacidade do fipronil de bloquear a isoforma dos canais de Cl⁻ do receptor GABA de insetos (HAINZL; CASIDA, 1996). Apesar disso, o fipronil pode ligar-se aos receptores GABA_A e GABA_C de mamíferos (IKEDA et al., 2001; RATRA et al., 2002).

Embora o canal iônico de GABA seja importante na transmissão nervosa tanto em vertebrados quanto em invertebrados (GRANT et al., 1990) e fipronil se ligue aos receptores GABA dos vertebrados, esta ligação é menos firme que aquela nos invertebrados, o que teoricamente proporciona a seletividade do fipronil (RHÔNE-POULENC, 1995; GRANT et al., 1998).

O principal mecanismo de ação da toxicidade de fipronil em humanos, se expostos, ocorre pelo mesmo princípio de ação tóxica observado em insetos, ou seja, inibição no receptor GABA (HAINZL; CASIDA, 1996; OZOE et al., 2000; TANG et al., 2004), fazendo bloqueio não competitivo dos canais de cloro dos neurônios no SNC.

Há três rotas principais de intoxicação por fipronil: oral, dérmica e inalação (JENNINGS et al., 2002; FUNG et al., 2003). No primeiro caso, o fipronil parece não representar um agente tóxico grave para os mamíferos; no entanto, qualquer espécie pode ser afetada se a dose for maior do que a recomendada pelos fabricantes. De acordo com relatos na literatura, há casos de intoxicação devido à exposição acidental ou uso incorreto do composto (CHODOROWSKI; ANAND, 2004; LEE et al., 2010). Um caso de intoxicação aguda após a ingestão de uma dose alta de fipronil causou morte humana (MOHAMED et al., 2004).

O mecanismo de ação do fipronil é muito semelhante ao de outros grupos de inseticidas, como os piretróides e o grupo dos ciclodienos dos organoclorados: aldrin, endrin, dieldrin. Estes compostos químicos também agem no receptor GABA na transmissão nervosa, mas há diferenças nos sítios de ligação entre classes inseticidas (TINGLE et al., 2003).

ECOTOXICIDADE

A utilização deste inseticida em grandes quantidades pode gerar resíduos no ambiente, principalmente nos recursos hídricos próximos às áreas nas quais foi utilizado. De acordo com Manrique et al. (2013), não existem informações suficientes sobre os impactos que este inseticida e os demais agrotóxicos utilizados podem causar nos sistemas aquáticos.

No ar o fipronil tem pressão de vapor relativamente baixa, segundo a lei de Henry's (constante), e não se volatiliza rapidamente. Em aplicações por aspersão é provável que não se encontre vapores presentes no ar (BCPC, 1997; U. S. EPA, 1996).

No solo, o valor médio do coeficiente de adsorção do fipronil à matéria orgânica do solo (Koc) é 803, que confere ao composto de baixa a moderada adsorção por área de superfície (MEDE RHÔNE-POULENC AGRICULTURAL LIMITED, 1997; DPR, 2001).

A molécula tem baixa capacidade de dispersão na terra, mas isto não resulta em baixo potencial para a contaminação das águas subterrâneas (USEPA, 1996; BURR, 1997).

Em estudo comparativo da adsorção do fipronil, em dois tipos de solo no mediterrâneo, foi constatado que a adsorção estava diretamente relacionada com a quantidade de matéria orgânica presente no solo (BOBÉ et al., 1997).

No ambiente aquático a solubilidade determinada para o fipronil foi de 2,0 a 2,4 mg.L-1 (USEPA, 1996; KIDD e JAMES, 1991; AYLIFFE, 1998). O fipronil foi adsorvido rapidamente em sedimento com areia contendo 8% de matéria orgânica e pH 5,8 (FEUNG e YENNE, 1997). A vida média do fipronil em condições aquáticas aeróbias é de aproximadamente 14,5 dias. Nesta condição, a maior quantidade de metabólito formado é de sulfito, que correspondeu a 74% do resíduo total depois de 30 dias (FEUNG e YENNE, 1997).

Connelly (2001) descreveu a transformação do fipronil no meio aquático, onde gera o desulfenil, subproduto com ação neurotóxica semelhante à molécula original do fipronil, que mantém a ação tóxica aos organismos expostos.

Em estudos metabólicos observa-se que há um potencial de bioacumulação do desulfenil em tecidos gordurosos (DEMCHECK; SKROBIALOWSKI, 2003; CONNELLY, 2001).

Em estudos de campo e de laboratório em diferentes tipos de solo, sob diversas condições ambientais, foram estabelecidas as rotas de degradação do fipronil em água e em solo. O composto pode ser metabolizado via redução ao sulfeto, via oxidação a sulfona, e via hidrólise à amida. Em presença de luz solar, o fipronil é fotodegradado e forma o desulfenil fipronil (FENET et al., 2001).

Os testes ecotoxicológicos podem ser utilizados como instrumento de predição (ESPÍNDOLA et al., 2003), antecipação e diagnóstico de possíveis impactos ecológicos causados pelos compostos tóxicos (CALOW, 1993), bem como para classificação,

A ecotoxicidade aguda do fipronil foi avaliada para alguns organismos não-alvos. CHANDLER et al. (2004) estimaram a Concentração Letal média (CL₅₀);96h de fipronil para o copépode *Amphiascus tenuiremis* em 0,0068 mg.L-1 e determinaram a sobrevivência de 90% expostos a 0,22 mg.L-1; 94 % de inibição da reprodução com 0,42 mg.L-1 e atraso no tempo de expulsão dos ovos pelas fêmeas.

Para o microcrustáceo *Daphnia pulex*, a CL₅₀;96h estimada foi de 0,016 mg.L-1 (STARK et al., 2005). A CL₅₀; 96h calculada para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) foi de 0,248 mg.L-1 (USEPA, 1996).

Scott et al. (2008) determinaram o efeito do fipronil nos córregos usados para irrigação da cultura de arroz, por meio da avaliação da comunidade macroinvertebrada.

Verificaram que a persistência, após seis meses de uma única aplicação de 0,005 mg.L⁻¹ diminuiu a população dos macroinvertebrados aquáticos estudados.

Fipronil é altamente tóxico para abelhas (DL₅₀ de 0,004 µg/abelha), lagartos (DL₅₀ para *Acanthodactylus dumerili* [Lacertidae] é de 30 µg/g peso corporal) e galináceos (DL₅₀ de 11,3 mg/Kg para codornizes do Norte) (TINGLE et al., 2003).

A utilização incorreta do fipronil causa sérias preocupações, pois no Brasil existem áreas totais sendo pulverizadas, não havendo a menor preocupação com possíveis contaminações e prejuízos aos ecossistemas. Há registros sobre redução do número de abelhas em várias partes do país. A sua utilização deve ser mais bem pesquisada com o objetivo de determinar os reais riscos apresentados ao ambiente (AMARAL, 2012).

Jennings et al. (2002) encontraram grandes quantidades de fipronil em cães tratados com fipronil, mesmo após 24h de aplicação, indicando riscos para a saúde humana se a exposição é repetida.

NEUROTOXICIDADE

Segundo LARINI (1999) neurotoxicidade é a capacidade que um composto químico tem de provocar efeitos adversos no sistema nervoso central, no sistema nervoso periférico e órgãos do sentido, podendo ser reversíveis (quando ocorrem mudanças funcionais temporárias) e irreversíveis (mudanças estruturais com lesão ou degeneração de componentes estruturais do sistema nervoso).

Alterações do comportamento em animais expostos a um determinado agente químico podem servir como indicativo de que a substância provoca neurotoxicidade. Comportamento tem sido utilizado como um bioindicador de função (WORMLEY et al., 2004) para estudar efeitos tóxicos de agentes químicos, como o fipronil, por exemplo.

Cães mostraram sinais clínicos de neurotoxicidade crônica e exames neurológicos anormais (U.S.EPA, 1996).

Na avaliação da neurotoxicidade subcrônica ao fipronil (TINGLE et al., 2003), ratos mostraram um aumento na incidência de anúria, aumento na incidência da resposta ao beliscão da cauda em machos, aumento na incidência da resposta exagerada a um estalido, em machos e fêmeas, e aumento na força de agarrar dos membros anteriores, na idade de 13 semanas, em fêmeas.

Um estudo crônico da ação do fipronil por via oral em cães da raça Beagle, com dose de 10 mg/Kg/dia, foi reportado perda de apetite, postura curvada, inatividade, convulsão, tremores no corpo e balançar de cabeça. Nesta dose também houve a morte da metade do número de animais expostos. Os estudos hematológicos e de urinálise não mostraram alterações (CID, 2012).

Estudos utilizando metabólitos do fipronil também foram realizados. Ratos foram alimentados com fipronil-dessulfenil nas doses 0, 0.5, 2.0, e 10 ppm por dois anos (0, 0.025, 0.098 e 0.050 mg/Kg/d para machos e 0, 0.032, 0.130, e 0.550 mg/Kg/d para fêmeas). A dose inicial de 10 ppm foi reduzida para 6 ppm nas fêmeas, após 26 semanas, devido ao aumento da mortalidade. Machos e fêmeas apresentaram aumento da incidência de agressividade e irritabilidade ao toque, na maior dose testada. Fêmeas também apresentaram aumento da salivação na dose de 10 e 6 ppm, e convulsões, nas doses de 2, 6 e 10 ppm. Além disso, machos na dose de 10 ppm e fêmeas nas doses 2, 6 e 10 ppm, desenvolveram sinais clínicos de toxicidade, sem evidência de carcinogenicidade. Nenhum efeito foi observado em doses abaixo de 0.5 ppm (0.025 mg/Kg/d) (JACKSON et al., 2009).

Uma pesquisa foi realizada em ratos machos e fêmeas para a avaliação aguda da neurotoxicidade do fipronil, utilizando doses entre 0,5 e 50 mg/Kg. Foi possível observar, na maior dose testada, morte em até dois dias após o tratamento. Na necropsia, notou-se hemorragia cerebral difusa. Sete horas após o tratamento, os animais apresentaram sinais de depressão (diminuição do número de levantamentos, diminuição dos reflexos e diminuição da temperatura corporal) e de estimulação do sistema nervoso central (tremores, convulsões tônico-clônicas, mioclonias) (MARTINS, 2009).

No estudo de TERÇARIOL e GODINHO (2011) demonstrou-se que ratos expostos agudamente ao fipronil têm alterações comportamentais importantes pois foi observado aumento dos comportamentos de congelamento, limpeza e levantar sugerindo que o fipronil aumenta a emocionalidade e a atividade exploratória dos animais sem modificar sua atividade locomotora.

CARCINOGENESE

Fipronil é um dos vários praguicidas conhecidos que induzem câncer na tireóide de ratos, provavelmente como o resultado de sua habilidade de acentuar o metabolismo hepático e a excreção dos hormônios da tireóide. É possível que a indução de enzimas microsossomais e a sua capacidade de melhorar o metabolismo hepático dos hormônios

tireoidianos e excreção inclusive aumento do peso do fígado e hipertrofia hepatocelular, possa ter um papel no desenvolvimento do tumor (HURLEY et al., 1998; DAS et al., 2006; TINGLE et al., 2003; MARTINS, 2009).).

De acordo com a classificação pela U.S.EPA de carcinogênicos químicos, o fipronil foi classificado como pertencente ao grupo C (possível carcinogênico humano), baseado no aumento nos tumores de células foliculares da tireóide em ambos os sexos de ratos. Há 2 mecanismos básicos pelo qual substâncias químicas podem induzir neoplasia em glândula tireoideana em roedores, um devido a um efeito carcinogênico direto na própria tireóide e o outro no qual uma variedade de mecanismos que funcionam como desreguladores da tireóide, induzem neoplasia da glândula tireoideana, secundária ao desequilíbrio hormonal Como explicado anteriormente, fipronil parece agir por meio de mecanismo secundário (U.S.EPA 1998).

Em estudo de LEGHAIT et al. (2009), demonstrou-se que ratos tratados com fipronil (3mg/kg/dia por via oral durante 14 dias) apresentaram diminuição da concentração plasmática de Tiroxina (T4) por aumento da depuração (provavelmente pelo aumento da atividade das enzimas hepáticas) e aumento da concentração plasmática de Hormônio Estimulante da Tireóide (TSH). Corroborando com estas observações para fipronil, estudos mostram que a exposição prolongada de células da tireóide para valores elevados de TSH predispõem ao desenvolvimento de tumores de tireóide em ratos (HURLEY et al., 1998; WILLIAMS, 1995; HOOD et al., 1999).

Tingle et al. (2003) afirmaram que, devido a importantes diferenças na fisiologia da glândula tireóide entre roedores e humanos, isto poderia indicar que o rato não seria um bom modelo para mecanismos carcinogênicos da tireóide em humanos.

Uma associação entre a concentração de TSH elevado e câncer de tireóide foi recentemente relatada em seres humanos (BOELAERT, 2009). Porém em um estudo recente realizado em condições de exposição ocupacional ao fipronil em uma fábrica de produção de medicamentos veterinários, não demonstrou que a exposição crônica a fipronil foi associada a um aumento da incidência de testes TSH anormais. As concentrações de fipronil sulfona foram correlacionados negativamente com concentrações de TSH nos trabalhadores expostos ao fipronil, levantando a possibilidade de que o fipronil tem um efeito inibidor central sobre a secreção de TSH em seres humanos (HERIN et al., 2011). Estes dados juntos sugerem uma ação desreguladora endócrina do praguicida.

GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE:

Vários estudos têm demonstrado que os praguicidas podem ter efeitos genotóxicos em organismos direta ou indiretamente expostos (incluindo seres humanos) (BORZSONYI et al., 1984, DULOT et al., 1985 e NEHÉZ et al., 1988) e, por conseguinte, a avaliação da genotoxicidade de praguicidas é atualmente de grande importância.

Em estudo realizado por OLIVEIRA et al. (2012B), o ensaio cometa revelou que o fipronil para as doses de 15mg/kg e 25mg/kg não induzem danos no DNA em camundongos. Por outro lado, efeitos genotóxicos significativos foram observados no tratamento com 50mg/kg de fipronil. Camundongos tratados com esta dose exibiram uma frequência média mais elevada de células danificadas e índice de genotoxicidade com a maioria dos cometas classificados como classe 1. Com base nestes resultados, esta concentração de fipronil pode induzir danos no DNA de organismos expostos, os quais podem ou não serem reparados.

TOXICIDADE REPRODUTIVA

Os agroquímicos orgânicos como o fipronil, podem ocasionar prejuízos ao desenvolvimento embrionário, provocando aborto ou deficiências na formação do feto, alterações fisiológicas como alterações na modulação do sistema endócrino de animais silvestres e do ser humano, além de alterações comportamentais (VOGEL; HAGLER, 1996; POHL et al., 1998). Um dos possíveis mecanismos de ação para esse efeito é a interferência com a síntese de esteróides, mais precisamente com a enzima CYP 19 aromatase, que catalisa a conversão de andrógenos em estrógenos, sendo responsável pelo balanço homeostático entre o que tradicionalmente são considerados hormônios femininos e masculinos (SIMPSON; DAVIS, 2001).

Em estudo de TINGLE et al. (2003) sobre toxicidade reprodutiva em ratos, observou-se que fipronil está associado com efeitos reprodutivos, baseados nos efeitos sobre a tireóide, fígado e glândula pituitária, sinais clínicos de toxicidade, diminuição do tamanho da ninhada, diminuição do peso corporal, diminuição na porcentagem de acasalamento, redução do índice de fertilidade, redução na sobrevivência pós-implantação e sobrevivência pós-natal da prole e retardo no desenvolvimento físico.

Estudos de OHI et al. (2004) demonstraram que os efeitos adversos do fipronil sobre o aparelho reprodutor de ratas estão relacionados às alterações provocadas no sistema endócrino dos animais. Estes agentes ativos hormonais (desreguladores

endócrinos) podem causar uma variedade de efeitos adversos à saúde incluindo alterações do desenvolvimento comportamental e riscos reprodutivos; também resulta em alterações dos níveis de progesterona e estradiol, na duração do ciclo estral e taxa de gestação de fêmeas de ratos Wistar. Os níveis de desequilíbrio hormonal podem impedir o transporte dos espermatozoides, e conseqüentemente passagem do óvulo fertilizado para dentro do útero. Neste estudo observou-se prolongamento do ciclo estral (dias) após uma única administração tópica de 70 mg/kg quando comparado com o controle. Também reduziu o índice de gravidez (67%) no grupo da dose mais elevada (280mg/kg). Os níveis de progesterona e estradiol no plasma, obtidos em diferentes períodos após o tratamento com fipronil, foram significativamente diferentes depois de 96 h de tratamento, quando comparados com os controles, demonstrando que o fipronil pode alterar o funcionamento normal do sistema endócrino e causar efeitos reprodutivos adversos em ratas fêmeas, o que também contribui para engrandecer a sugestão de um efeito desregulador endócrino pelo praguicida.

HEPATOTOXICIDADE:

Das et al., (2006) observaram que o fipronil promove indução enzimática hepática (CYP1A1, CYP3A4, CYP2B6 e CYP3A5) de forma dose dependente, porém, doses muito altas podem fazer retornar o nível do citocromo a níveis normais. Fipronil sulfona induziu efeitos citotóxicos a doses baixas, e a possibilidade de que estes efeitos citotóxicos fossem devido a apoptose foi indicada por indução tempo e dose dependente, da atividade da enzima caspase – 3/7 em células HepG2 e hepatócitos humanos (DAS et al., 2006).

Um estudo realizado por Silva (2008) avaliou os efeitos da exposição prolongada de ratos ao inseticida; foram observados hepatócitos edemaciados e aumento do peso do fígado em animais tratados com uma dose oral de 10 mg kg⁻¹, o que corresponde a um décimo do valor da DL50 estabelecida para ratos (TINGLE et al., 2003). Além disso, os fígados de ratos analisados após a exposição a diferentes doses de fipronil (15, 25 e 50 mg kg⁻¹) revelaram alterações citológicas, morfológicas e histoquímicas nos hepatócitos com processos autofágicos, esteatose e morte celular por necrose (OLIVEIRA et al., 2012A)

Uma vez no sangue, o fipronil e os seus metabólitos são amplamente distribuídos, em particular nos tecidos adiposos, além de ter um elevado nível de recirculação entero-hepática (HAINZL; CASIDA, 1996; MOHAMED et al., 2004). A

formação do metabólito sulfona, que é derivado de uma reação de oxidação do grupo tioéter, corresponde à principal via de metabolismo hepático do composto (CABONI et al., 2003; TANG et al., 2004). De acordo com Leghait et al. (2009), esta oxidação é catalisada por enzimas do citocromo P450. Tanto o fipronil como seu metabólito sulfona podem induzir a morte celular em células HepG2 e em hepatócitos humanos (DAS et al., 2006).

Os mecanismos hepatotóxicos do fipronil não são conhecidos. Em mitocôndria isoladas de fígado de rato Vidau et al. (2011) demonstraram que o fipronil exerce efeito desacoplador. Em outro estudo, o fipronil se mostrou inibidor da cadeia de transporte de elétrons, mais especificamente no complexo I, de forma dose dependente a partir da concentração de 5 μ M (PALMA et al., 2013).

EFEITOS CARDIOVASCULARES

Recentemente, realizamos um estudo piloto para avaliarmos os possíveis efeitos nocivos do fipronil e verificamos que a aplicação diária de fipronil por via tópica (durante três dias) resultou em possíveis ações deletérias caracterizadas por níveis pressóricos elevados comparados aos animais não expostos ao fipronil (controle) (Figura 3).

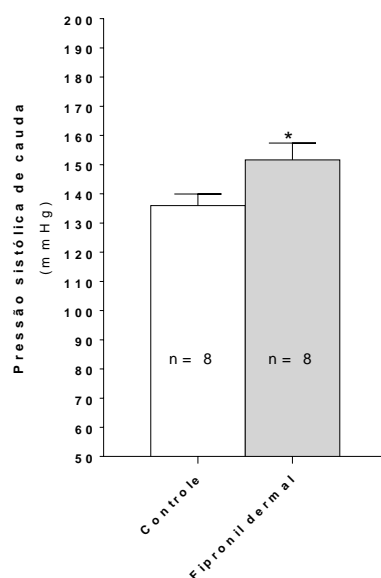


Fig. 3 – Pressão arterial aumentada após exposição ao fipronil (estudo piloto no laboratório do CEATOX)

Curiosamente, alguns casos de intoxicação humana por fipronil deram entrada em nosso Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX), os quais apresentaram sintomas tipicamente associados com o bloqueio dos receptores da função GABAérgica (tais como náusea, dor de cabeça e convulsões) e, surpreendentemente, alguns deles também apresentaram elevação da pressão arterial.

No entanto, nenhum estudo anterior havia examinado os efeitos da exposição ao fipronil sobre a pressão arterial sistólica, e conforme o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo para elucidar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento muito precoce da hipertensão induzida pelo fipronil em ratos.

Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar, ao menos em parte, as alterações cardiovasculares causadas por alguns praguicidas. Neste contexto, incluem-se:

1 - a formação aumentada de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzidas pelo fipronil (KI et al., 2012);

2 - a redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) (CASARES, MANTIONE, 2006);

3 - o aumento da reatividade vascular aos vasoconstritores endotelina, catecolaminas e angiotensina. (MONTICIELO et al., 2008)

Sabe-se que o estresse oxidativo ativa as metaloproteinases (JACOB-FERREIRA; SCHULZ, 2013) e a associação entre atividade aumentada de metaloproteinases (especialmente a MMP-2) na hipertensão pode ser confirmado por estudos recentes sugerindo que a MMP-2 participe da patogênese da hipertensão em animais (CASTRO et al., 2011; WALTER et al., 2008) assim como em humanos hipertensos (AHMED et al., 2006; YASMIN et al., 2005). Os aumentos dos níveis de MMP-2 foram associados às significativas alterações funcionais bem como na remodelação vascular secundária a hipertensão em ratos. (CASTRO et al., 2012; GUIMARAES et al., 2011). O mecanismo preciso e pelo qual a atividade aumentada da MMP-2 correlaciona-se com o aumento da pressão sanguínea ainda não está esclarecido, no entanto, a MMP-2 pode aumentar a contratilidade vascular ao clivar peptídeos envolvidos no controle do tônus vascular, promovendo a degradação de peptídeos vasodilatadores, tais como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (FERNANDEZ-PATRON et al., 2000) e adrenomedulina (MARTINEZ et al., 2004), bem como a formação de peptídeos vasoconstritores, a endotelina-1 (FERNANDEZ-PATRON et al., 1999).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, P. H. B.; ALONZO, H. G. A. Trabalho rural e riscos à saúde: uma revisão sobre o "uso seguro" de agrotóxicos no Brasil. **Ciênc. Saúde Colet.**, vol.19, n.10, p. 4197-4208, 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Reavaliação de agrotóxicos: 10 anos de proteção a população. 2009.** Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/020409.htm>>. Acesso em: 19 de outubro de 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Monografia Fipronil.** 2012. Disponível em: <http://portalanvisa.gov.br/wps/wcm/connect/5aaff4804e0bf80a9b70bbc09d49251b/F43+%E2%80%93Fipronil.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 20 de Outubro de 2015.

AHMED, S. H., L. L. CLARK, et al. Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. **Circulation**, v.113, n.17, p.2089-96. 2006.

AMARAL, R.B. **Investigação do comportamento eletroquímico do inseticida fipronil e desenvolvimento de metodologia eletroanalítica.** São Carlos, 2012. 124f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Associação Brasileira da Indústria Química (ABIQUIM). **A indústria química brasileira** [internet]. 2013. Disponível em: <http://www.abiquim.org.br/pdf/indQuimica/AIndustriaQuimica-SobreSetor.pdf>. Acessado em 19/10/2015.

AYLIFFE, J. M. **[14C]-fipronil Degradation and Retention in Two Water/Sediment Systems.** Sacramento, Rhône- Poulenc Agricultural Data Package ID No. 177754. DPR No.52062-282, 1998.

BCPC. The British Crop Protection Council. **The Pesticide Manual: A world compendium: fipronil**. 11th ed. Ed. Tomlin, 1997, p.545-546.

BICHON, E.; RICHARD, C.A.; BIZEC, B.L. Development and validation of a method for fipronil residue determination in ovine plasm using 96-well plate solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**. 1201, p. 91-99, 2008.

BOBE, A.; COSTE, C. M.; COOPER, J. F. Factors influencing the adsorption of fipronil on soils. **J. Agr. Food. Chem.**, v. 45, p. 4861-4865, 1997.

BOELAERT, K. The association between serum TSH concentration and thyroid câncer. **Endocr. Relat. Cancer** v. 16 p. 1065-1072, 2009.

BORZSONYI, M.; TOROK, G.; PINTER, A.; SURJAN, A. Risco carcinogénico agricultura relacionada. **Modelos, etiologia e mecanismo de promoção de tumor**, vol. 56 IARC Sci. Publ. p. 465-486, 1984.

BRAIBANTE, M.E.F.; ZAPPE, J.A. **A química dos agrotóxicos**. Química Nova na Escola. v. 34, n. 1, p. 10-15, 2012.

BURR, C. M. [14c]-M&B 15950: Adsorption/desorption to and from four soils and one sediment. **Data Package** ID n. 169043. DPR n. 5202-241, 1997.

CABONI, P.; SAMMELSON, R. E.; CASIDA, J. E. Phenylpyrazole insecticide photochemistry, metabolism, and GABAergic action: ethiprole compared with fipronil. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 7055-7061, 2003.

CALOW, P. **Handbook of ecotoxicology**. Oxford: Blackwell Sciences. 1993, v.1, p.478.

CARNEIRO, F.F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO L. G. S.; RIZOLLO, A.; MULLER, N. M.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.;

MELLO M. S. C. Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde 1ª Parte. Rio de Janeiro: **Abrasco**; 2012.

CASARES FM, MANTIONE K. Pesticides may be altering constitutive nitric oxide release, thereby compromising health. **Med. Sci. Monit.**, v.12, n.10, p.235-240, 2006.

CASTRO, M. M., E. RIZZI, et al. Doxycycline ameliorates 2K-1C hypertension-induced vascular dysfunction in rats by attenuating oxidative stress and improving nitric oxide bioavailability. **Nitric Oxide**, v.26, n.3, p.162-8. 2012.

CASTRO, M. M., J. E. TANUS-SANTOS, et al. Matrix metalloproteinases: targets for doxycycline to prevent the vascular alterations of hypertension. **Pharmacol. Res.**, v.64, n.6, p.567-72. 2011.

CHANDLER, G. T.; CARY L. T.; VOLZ C. D.; WALSE S. S.; FERRY I. J.; KLOSTERHAUS I.S. Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: a rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.23, n.1, p.117–124, 2004.

CHODOROWSKI, Z.; ANAND, J. S. Accidental dermal and inhalation exposure with fipronil – a case report. **J. Toxicol.**, v.42 (2), p.189-190, 2004.

CID, Y.P. **Curva de concentração plasmática do fipronil por via subcutânea em bovinos e eficácia contra o carrapato Rhipicephalus (Boophilus) microplus, um importante ectoparasito na pecuária brasileira e Argentina.** Seropédica, Rio de Janeiro, 2012. 85f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2012.

CONNELLY, P. Environmental Fate of Fipronil. **Calif. Environ. Protec. Ag.** California, EUA, 2001.

CRAVEDI, J.P.; DELOUS, G.; ZALKO, D.; VIGUIÉ, C.; DEBRAUWER, L. Disposition of Fipronil in Rats. **Chemosphere**. v. 93, p. 2276-2283, 2013

DAS, P.C.; CAO, Y.; CHERRINGTON, N.; HODGSON, E.; ROSE, R.L. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. **Chem-Biol. Interac.**, v.164, p.200-214, 2006.

DEMCHECK, D. K.; SKROBIALOWSKI, S. C. **Fipronil and degradation products in the rice-producing areas of the Mermentau River Basin, Louisiana, februaryseptember 2000**. United States Geological Survey National Water-Quality Assessment Program. USGS. Estados Unidos, 2003.

DPR. Department of Pesticide Regulation. **Pesticide chemistry database**. Department of Pesticide Regulation, Sacramento-California. Dissipation. Rhône - Poulenc Agricultural Limited. Data Package ID No. 169043-45 DPR Document No. 52062-240 Pt.1, 2001.

DULOT, F. N.; PASTORI, M. C.; OLIVERO, O. A.; GONZALEZ, C.I.D.; LORIA, M.; MATOS, D.; SOBEL, P. T.;BUJAN, D. E.; ALBIANO, E. C. N. Trocas cromátides irmãs e aberrações cromossômicas em uma população expostos a pesticidas. **Mutat. Res.**, 143 p. 237-244, 1985.

ESPÍNDOLA, E. L. G.; BRIGANTE, J.; DORNFELD, C. B. Estudos ecotoxicológicos no rio Mogi-Guaçu. In: BRIGANTE, J., ESPÍNDOLA, E. L. G. **Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu**. São Carlos: Rima, 2003. p.129–148.

FENET, H.; BELTRAN, E.; GADJI, B.; COOPER, J.F.; COSTE, C.M. Fate of a phenilpyrazole in vegetation and soil under tropical field conditions. **J. Agric. Food Chem.**, v 49, p.1293-1297, 2001.

FERNANDEZ-PATRON, C., K. G. STEWART, et al. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. **Circ. Res.**, v.87, n.8, p.670-6. 2000.

FEUNG, C. S.; YENNE S. P. Fipronil: **Aerobic Aquatic Metabolism**. Rhône-Poulenc Agricultural Limited. Data Package ID No. 169043. DPR Document No. 52062-180. 1997.

FUNG, H.T.; CHAN, K.K., CHING, W.M.; KAM C.W. A case of accidental ingestion of ant bait containing fipronil. **J. Toxicol-Clin. Toxicol.**, v.41, n.3, p. 245–248, 2003.

GAUTHIER, M.; BELZUNCES, L.; SCHLICHTER, R.; LAPIED, B. **Analyse électrophysiologique, pharmacologique et moléculaire de facteurs modulant les effets d`um insecticide, le fipronil, sur des recepteurs GABAergiques d`insectes**. França, 2008. 210f. Tese (Doutorado) – Universidade D`ANGERS, França, 2008.

GRANT, D.B., CHALMERS, A.E., WOLFF, M.A., HOFFMAN, H.B., BUSHEY, D.F., KUHR, R.J. & MOTOYAMA, N. Fipronil: action at the GABA receptor. In: **Pesticides and the Future: minimizing chronic exposure of humans and the environment**. IOS Press, Amsterdam. p.147-156, 1998.

GRANT, D.B.; BLOOMQUIST, J.R.; AYAD, H.H.; CHALMERS, A.E. A comparison of mammalian and insect GABA receptor chloride channels. **Pest. Sci.**, v.30, p.355-356, 1990.

GUIMARAES, D. A., E. RIZZI, et al. Doxycycline dose-dependently inhibits MMP-2-mediated vascular changes in 2K1C hypertension. **Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v.108, n.5, p.318-25. 2011.

GUNASEKARA, A. S.; TRUONG, T.; GOH, K. S.; SPURLOCK, F.; TJEERDEMA, R. S. Environmental fate and toxicology of Fipronil. **J. Pest. Sci.** v. 32, n. 3, p. 189-199, 2007.

HAINZL, D.; CASIDA, J.E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 93, p.12746-12767, 1996.

HERIN, F.;BOUTET-ROBINET, E.; LEVANT, A.; DULAURENT, S.; MANIKA, M.; GALATRY-BOUJU, F.; CARON, F.; SOULAT, J. M. Thyroid Function Tests in Persons with Occupational Exposure to Fipronil. **Thyroid**. 21(7): 701-706, 2011

HOOD, A.; HASHMI, R. ; KLAASSEN, C. D.; Effects of Microsomal Enzyme Inducers on Thyroid-Follicular Cell Proliferation, Hyperplasia, and Hypertrophy. **Toxicol. Appl. Pharm.**, v. 160(2) p. 163–170, 1999.

HURLEY, P.M.; HILL, R.N.; WHITING, R.J. Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents, **Environ. Health Perspect.**, v.106, p.437–445, 1998.

IKEDA, T.; ZHAO, X.; NAGATA, K.; KONO, Y.; SHONO, T.; YEH, J. Z.; NARAHASHI, T. Fipronil Modulation of Gama-Aminobutyric Acid Receptors in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 296, n. 3, p. 914-921, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA - INCA - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Posicionamento do instituto nacional de câncer José Alencar Gomes da Silva Acerca dos Agrotóxicos.** 06 de abr. de 2015. Disponível em:<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf>. Acesso em: 20 de outubro de 2015.

JACKSON, D.; CORNELL, C.B.; LUUKINEN, B.; BUHL, K.; STONE, D. 2009. Fipronil Technical Fact Sheet; **National Pesticide Information Center**, Oregon State University Extension Services. <http://npic.orst.edu/factsheets/fiptech.pdf>.

JACOB-FERREIRA, A.; SCHULZ, R. Activation of intracellular matrix metalloproteinase-2 by reactive oxygen–nitrogen species: Consequences and therapeutic strategies in the heart. **Arch. Biochem. Biophys.**, V.540, p.82-93, 2013.

JACOBSON, L. S. V.; HACON, S. S.; ALVARENGA, L.; GOLDSTEIN, R. A.; GUMS, C.; BUSS, D. F. ; LEDA, L. R. Comunidade pomerana e uso de agrotóxicos: uma realidade pouco conhecida. **Cien. Saude Colet.**,14(6) p 2239-2249, 2009

JENNINGS, K.A.; CANERDY, T.D.; KELLER, R.J.; ATIEH, B.H.; DOSS, R.B.; GUPTA, R.C. Human exposure to fipronil from dogs treated with frontline. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 44, n.5, p. 301–303, 2002.

KI, Y. W., LEE, J. E., PARQUE, 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. **Toxicol. Lett.**, v.211, p.18-28. 2012

KIDD, H; JAMES, D. **The agrochemicals handbook**. Cambridge, 3th ed. Royal Society of Chemistry Information Services. 1991.

LACROIX, M.Z.; PUEL, S.; TOUTAIN, P.L.; VIGUIÉ, C. Quantification of fipronil and its metabolite fipronil sulfone in rat plasm over a wide range of concentrations by LC/UV/MS. **J. Chromatogr. B.**, v. 878, 1934-1938, 2010.

LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. 1^a. Edição, Editora Manole, São Paulo, 1999.

LEE, S.J.; MULAY, P.; DIEBOLT-BROWN, B.; LACKOVIC, M.J.; MEHLER, L.N., BECKMAN, J.; WALTZ, J.; PRADO, J.B.; MITCHELL, Y.A.; HIGGINS, S.A.; SCHWARTZ, A.; CALVERT, G.M. Acute illnesses associated with exposure to fipronil - surveillance data from 11 states in the United States, 2001-2007. **Clin. Toxicol.**, v.48, n.7, p. 737-744, 2010.

LEGHAIT, J.; GAYRARD, V.; PICARD-HAGEN, N.; CAMP, M.; PERDU, E.; TOUTAIN, P. L.; VIGUIÉ, C. Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. **Toxicology.**, v. 255(1-2), p.38-44, 2009.

LI, P.; AKK, G. The insecticide fipronil and its metabolite fipronil sulphone inhibit the rat $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABAA receptor. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 155, p. 783-794, 2008.

MANRIQUE, W. G. **Toxicidade Aguda e Risco Ecotoxicológico do Fipronil para o Guaru (*Poecilia reticulata*) e Dissipação no Ambiente Aquático.** Jaboticabal, SP, 2009. 58 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Estadual Paulista. Centro de Aquicultura da Unesp. Campus de Jaboticabal, 2009

MANRIQUE, W.G.; FIQUEIREGO, M.A.P.; MACHADO-NETO, J.G. Dissipation and environmental risk of fipronil on aquatic environment. **The Biologist** (Lima), vol. 11, n. 1, p. 107-117, 2013.

MARTINEZ, A., H. R. OH, et al. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. **Biochem. J.**, v.383, p.413-8, 2004.

MARTINS, A.P. Efeitos neurocomportamentais do fipronil administrado em dose única a ratos. São Paulo, 2009. 86f. Dissertação (Mestrado) – **Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2009.

MATSUDA, K.; BUCKINGHAM, S.D.; KLEIER, D.; RAUH, J.J.; GRAUSO, M.; SATTELLE, D.B. Neonicotnoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.22(11), p.573-580, 2001.

MEDE, K; RHÔNE-POULENC AGRICULTURAL LIMITED. **Fipronil: Aquatic Field Dissipation**. Rhône-Poulenc Agricultural Limited. 1997. Data Package ID No. 169043-45 DPR Document No. 52062-240 Pt.1.

MOHAMED, F., SENARATHNA, L., PERCY. A., ABEYEWARDENE, M., EAGLESHMAM, G., CHENG, R., AZHER, S., HITTARAGE, A., DISSANAYAKE, W., SHERIFF, M. H. R., DAVIES, W., BUCKLEY, N., EDDLESTON, M. Acute human poisoning with the N- phenylpyrazole 27 insecticide fipronil – a GABAA – gated chloride channel blocker. **J. Toxicol-Clin. Toxic.**, v. 42, n.7, p. 955-963, 2004.

MONTICIELO, O. A.; PALOMINOS, P. E.; CHAKR, R. M. S.; BORTOLI, R.; XAVIER, R. M.; BRENOL, J. C. T. Esclerose sistêmica e níveis séricos elevados de organoclorado: uma associação possível? **Rev. Bras. Reumat.** v 48 n 1 , 2008

MURRAY, D. L.; TAYLOR, P. L. Claim no easy victories: Evaluating the pesticide industry's Global Safe Use campaign. **World Development**, v. 28, n. 10, p. 1735–1749, 2000,

NEHÉZ, M.; BOROS, P.; FERKEL, A.; MOHOS, J.; PATOLAS, P.; VETRO, G.; ZIMANYI, M.; DESI, I. Análise citogenética de pessoas que trabalham com agrotóxicos na região do sul da Hungria. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 8 p. 37-44, 1988.

OHI, M.; DALSENTER, P.R.; ANDRADE, A.J.M.; NASCIMENTO, A.J. Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. **Toxicol. Lett.**, v.146 (2), p.121-127, 2004.

OLIVEIRA, P. R., BECHARA, G. H., DENARDI, S. E., OLIVEIRA, R. J., MATHIAS, M. I. C. Cytotoxicity of fipronil on mice liver cells. **Microsc. Res. Tech.**, v. 75(1), p. 28-35, 2012A.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; OLIVEIRA, R. J.; MATHIAS, M. I. C. Genotoxic and mutagenic effects of fipronil on mice. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v 64(6), p. 569–573, 2012B.

OLIVEIRA, P.R. **Avaliação dos efeitos do fipronil (ingrediente ativo do Frontline®) nos ovários de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) e no sangue periférico de roedores.** Rio Claro, 2010. 173f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

OZOE, Y.; YAGI, K.; NAKAMURA, M.; AKAMATSU, M.; MIYAKE, T.; MATSUMURA, F. Fipronil-related heterocyclic compounds: structure-activity relationship for interaction with γ -aminobutyric acid- and voltage-gated ion channels and insecticide action. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 66(2), p.92-104, 2000.

PALMA, I. D. F.; MEDEIROS, H. C. D.; SANTANA, A. T.; GUELF, M.; MINGATTO, F. E. **Efeito do fipronil na bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos.** Poster. In: IX SIMPÓSIO DE CIÊNCIAS DA UNESP, 2013, Dracena. Anais eletrônicos... Dracena: UNESP, 2013. Disponível em: < <http://www.dracena.unesp.br/Home/Eventos/sicud2013/ivo-dias-ferreira-da-palma---efeitos.pdf>>. Acesso em: 20 de outubro de 2015.

PEI, Z.; YITONG, L.; BAOFENG, L.; GAN, J.J. Dynamics of fipronil residue in vegetable-field ecosystem. **Chemosphere**, v.57, p.1691-1969, 2004.

POHL, H.; SMITH-SIMON, C.; HICKS, H. Health effects classification and its role in the derivation of minimal risk levels: developmental effects. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 28, p.55-60, 1998.

RATRA, G. S.; CASIDA, J. E. GABA receptor subunit composition relative to insecticide potency and selectivity. **Toxicol. Lett.**, 122, p. 215-222, 2001.

RATRA, G.S.; ERKKILA, B.E.; WEISS, D.S.; CASIDA, J.E. Unique insecticide specificity of human homomeric rho 1 GABA(C) receptor. **Toxicol. Lett.**, v.129, p.47-53, 2002.

RHÔNE-POULENC. Atelier International Fipronil/lutte antiacridienne. Lyon, 3-5 May 1995. **Rhône-Poulenc Agrochimie**, Lyon, France, 1995.

RIGOTTO, R. M.; CARNEIRO, F. F.; MARINHO, A. M. C. P.; ROCHA, M.M.; FERREIRA, M. J. M.; PESSOA V. M.; TEIXEIRA, A. C. A.; SILVA, M. L. V.; BRAGA, L. Q. V.; TEIXEIRA, M. M. O verde da economia no campo: desafios à pesquisa e às políticas públicas para a promoção da saúde no avanço da modernização agrícola. **Cien. Saude Colet.**, 17(6) p.1533-1542, 2012

SARTOR, I. F.; SANTARÉM, V. A.. Agentes empregados no controle de ectoparasitos, In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farm. Apl. Med. Vet.** 4 ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 567-583, 2006.

SCOTT, V. M.; STEPHEN, D. P.; DENNIS, K. D. Influence of fipronil compounds and rice-cultivation land-use intensity on macroinvertebrate communities in streams of southwestern Louisiana, USA. **Environ. Poll.**, v.152, p.497-503, 2008.

SILVA, J.M.; FARIA, H.P.; SILVA, E.N.; PINHEIRO, T.M.M. **Protocolo de Atenção à Saúde dos Trabalhadores Expostos a agrotóxicos**. Brasília. Ministério da saúde. 2006.

SILVA, S. A. **Efeitos neurocomportamentais da exposição prolongada de ratos ao fipronil**. 2008. 108f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo

SIMPSON, E.; DAVIS, S. Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis – some new perspectives. **Endocrinology**, v.142, p.589-4594, 2001.

SOUSA, G.; FONTAINE, F.; PRALAVORIO, M.; BOTTA-FRIDLUND, D.; LETREUT, Y.; RAHAMNI, R. Insecticide cytotoxicity and CYP1A1/2 induction in primary human and rat hepatocyte cultures, **Toxicol. In Vitro**, v.11, p.451–457, 1997.

SZEGEDI, V.; BARDOS, G.; DÉTÁRI, L.; TÓTH, A.; PELYHE, I.; VILÁGI, I. Transient alterations in neuronal and behavior activity following bensultap and fipronil treatment in rats. **Toxicology**, n.214, p.67-76, 2005.

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. **Chem-Biol. Interac.**, v.147(3), p.319-329, 2004.

TERÇARIOL, P.R.G.; GODINHO, A.F. Behavioral effects of acute exposure to the insecticide fipronil. **Pest. Biochem. Physiol.**, v.99, p.221-225, 2011.

TINGLE, C.C.D.; ROTHER, J.A.; DEWHURST, C.F.; LAUER, S.; KING, W.J. Fipronil: Environmental Fate, Ecotoxicology, and Humam Health Concerns. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v.176, p.1-66, 2003.

U.S. EPA. (Environmental Protection Agency) Fipronil for use on Rice (Regent ®, Icon®) and Pets (Frontline ®). HED Risk Assessment. Chemical 129121. Barcodes D242090, D245656, D245627, & D241676. Cases 288765, 031271, 060305, & 061662. Submissions S535772, S541670, S541551, S534929. **Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances**, Washington DC. 1998.

U.S. EPA. (Environmental Protection Agency) Fipronil Pesticide fact sheet. EPA 737-F-96-005. **Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances** Washington, USA. 7 pp., 1996

VIDAU, C.; GONZÁLEZ-POLO, R. A.; NISO SANTANO, M.; GOMÉZ SÁNCHEZ, R.; BRAVO-SAN PEDRO, J. M.; PIZARRO-ESTRELLA, E.; BLASCO, R.; BRUNET, J. L.; BELZUNCES, L. P.; FUENTES, J. M. Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. **Neurotoxicology**, v. 32, p. 935-943, 2011

VOGEL, G.; HAGLER, M. Effects of neonatally administered inpridole on adult behaviors of rats. **Pharmacol. Biochem. Beh.**, v.55, p.155-161, 1996.

WALTER, A., N. ETIENNE-SELLOUM, et al. Angiotensin II induces the vascular expression of VEGF and MMP-2 in vivo: preventive effect of red wine polyphenols. **J. Vasc. Res.**, v.45, n.5, p.386-94. 2008.

WESSELING, C.; CORRIOLSB, M.; BRAVO, V. Acute pesticide poisoning and pesticide registration in Central America. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.207, p.697-705, 2005.

WILDE, G.E.; WHIWORTH, R.J.; CLAASSEN, M.; SHUFRAN, R.A. Seed treatment for control of wheat insects and its effect on yield. **J. Agr. Urban. Entomol.**, v.18, p.1-11, 2001.

WILLIAMS, E. D. Mechanisms and pathogenesis of thyroid cancer in animals and man. **Mutat. Res-Fund. Mol. Mec. Mutag.**, v.333(1-2), p. 123-129, 1995

WORMLEY, D.D.; RAMESH, A.; HOOD, D.B. Environmental contaminant-mixture effects on CNS development, plasticity, and behavior. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.197, p.49-65, 2004.

YASMIN, C. M. MCENIERY, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.25, n.2, p.372. 2005.

Referências Bibliográficas

ZHAO, X.; SALGADO, V.L. The role of GABA and glutamate receptors in susceptibility and resistance to chloride channel blocker insecticides. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 97, p. 153-160, 2010.

ZHAO, X.; YEH, J. Z.; SALGADO, V. L.; NARAHASHI, T. Fipronil is a Potent Open Channel Blocker of Glutamate-Activated Chloride Channels in Cockroach Neurons. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 310(1), p. 192-201, 2004.



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Toxicology and Pharmacology

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

Exposure to fipronil elevates systolic blood pressure and disturbs related biomarkers in plasma of rats



Joao Leandro Chaguri^a, Antonio Francisco Godinho^a, Daniel França Horta^a,
Victor Hugo Gonçalves-Rizzi^b, Jose Sergio Possomato-Vieira^b,
Regina Aparecida Nascimento^b, Carlos Alan Dias-Junior^{a,b,*}

^a Center for Toxicological Assistance, Biosciences Institute of Botucatu, Sao Paulo State University – UNESP, Botucatu, Sao Paulo, Brazil

^b Department of Pharmacology, Biosciences Institute of Botucatu, Sao Paulo State University – UNESP, Botucatu, Sao Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2015

Received in revised form

22 December 2015

Accepted 26 December 2015

Available online 31 December 2015

Keywords:

Fipronil

Cardiovascular toxicity

Biomarkers

Pesticides

ABSTRACT

Recent reports show that fipronil affects non-target organisms, including environmental species populations and potentially humans. We aimed to examine if fipronil exposure affects the systolic blood pressure and related biomarkers. Thus, fipronil was orally administered to rats (30 mg/kg/day) during 15 days (Fipronil group) or physiological solution (Control group). While fipronil increased significantly the systolic blood pressure (158 ± 13 mmHg), no significant changes were observed in Control group (127 ± 3 mmHg). Significantly, higher levels of fipronil in plasma were observed in Fipronil group (0.46 ± 0.09 μ g/mL versus 0.17 ± 0.11 μ g/mL in Control group). Fipronil group showed lower weight gain compared with Control group. While fipronil resulted in higher concentrations of endothelin-1, reduced antioxidant capacity and lower levels of circulating matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and nitric oxide (NO) metabolites compared to Control group, no alteration was observed in serum biomarkers of renal and hepatic/biliary functional abilities. Therefore, this study suggests that fipronil causes hypertension and endothelin-1 plays a key role. Also, these findings suggest that reductions of both MMP-2 and NO may contribute with the elevation of systolic blood pressure observed with fipronil.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Fipronil [(±)-5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoromethylsulfanylpyrazole-3-carbonitrile] is the first member of the phenylpyrazole insecticide class, and possesses a trifluoromethylsulfanyl functional group on the heterocyclic ring. The fipronil has a broad spectrum of action against insects, being used to control fleas, ticks, termites, mole crickets, ants, rootworms, beetles, cockroaches and other insects (Tingle et al., 2003). Fipronil was initially developed to replace pesticides, such as organophosphates, carbamate and pyrethroids insecticides, having action against resistant pest strains (Narahashi et al., 2007), becoming an insecticide widespread used in agriculture. Narahashi et al. (2010) demonstrated that LD₅₀ values of fipronil are 0.13 and 41 mg/kg in houseflies and rats, respectively, thus providing highly specificity for fipronil (Narahashi et al., 2010).

Jackson et al. (2009) have suggested that the “no observed adverse effect level” (NOAEL) for acute oral dose of fipronil in rats is 2.5 mg/kg.

Importantly, recent evidences have shown that fipronil may be a potent toxicant affecting non-target organisms, including environmental species populations and potentially humans (Le Faouder et al., 2007) and deleterious effects were observed on the early stages of the animal development (Udo et al., 2014; Badgujar et al., 2015; Terçariol and Godinho, 2011). Although the fipronil's actions are blocking the gamma-aminobutyric acid (GABA)-ergic receptors and glutamate (Glu)-gated chloride channels (Narahashi et al., 2007; Zhao et al., 2005), concerningly, evidence has demonstrated that fipronil induces the releasing of reactive oxygen species, resulting in increased oxidative stress (Overmyer et al., 2007; Vidau et al., 2011). Supporting these findings, it has been shown that fipronil induced oxidative stress in kidney and brain of mice (Badgujar et al., 2015). Interestingly, we have received some cases of intoxication with fipronil in our center for assistance and control of intoxications, who has presented symptoms typically associated with the blockade of the GABAergic receptors function (such as nausea, headache and seizures) and surprisingly, also presented elevation of blood pressure. Together, these findings point to the

* Corresponding author at: Department of Pharmacology, Biosciences Institute of Botucatu, Sao Paulo State University (UNESP), Distrito de Rubiao Junior, S/N, 18.618-970 Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

E-mail address: carlosjunior@ibb.unesp.br (C.A. Dias-Junior).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2015.12.020>

1382-6689/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

importance of further exploring the mechanisms responsible for fipronil-induced intoxication. However, no previous study had examined the effects of exposure to fipronil on systolic blood pressure, and to our knowledge, this is the first study to elucidate the mechanisms involved in the very early development of fipronil-induced hypertension in rats.

Therefore, we expanded previous reports and we hypothesized that fipronil exposure (during 15 days) increases systolic blood pressure in rats and the fipronil-induced hypertension is associated with significant changes in circulating levels of related biomarkers: endothelin-1, matrix metalloproteinase type 2 (MMP-2), NO and antioxidant capacity.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental design

All procedures for animal experimentation were approved by the Ethics Committee, Biosciences Institute of Botucatu, Sao Paulo State University (Protocol n° 620/2014), which is complied with international guidelines of the European Community for the use of experimental animals. Twenty male *Wistar* rats (250 ± 20 g) were used in this study. The animals were housed in standard rat cages and maintained at 22 °C on a 12-h light/dark cycle, and were given free access to water and rat chow.

The animals were randomly distributed into one fipronil-exposed group (Fipronil, *n* = 12) and one Control group (non-fipronil-exposed, Control, *n* = 8) for 15 days, as follows: animals in the fipronil-exposed group were treated by gavage with dose of 30 mg/kg of commercial product containing fipronil (Regent® 800WG, BASF, Agro Brazil, Sao Paulo, Brazil). The animals in the Control group were treated by gavage with physiological solution. The protocol of intoxication using 30 mg of fipronil *via oral* used in this study was chosen with basis in previous studies, which evaluated the dose range to fipronil (Udo et al., 2014; Moser et al., 2015). At the end of the experimental protocol (15th day), we evaluated the weight gain and the rats were anaesthetized with 2% isoflurane (Isoforine, Cristalia, Sao Paulo, Brazil) at a continuous oxygen flow (2 L/min), having confirmed immobility and loss of righting reflex, the rats were submitted to euthanasia.

The whole-blood samples were collected in siliconized vacuum tubes containing no additives (for serum) or lyophilized ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) or heparin (*Vacutainer* Becton-Dickinson, BD, Oxford, UK) for plasma and fractions were used after serum separation or whole blood centrifugation, and both were stored at –80 °C until use for biochemical analysis.

2.2. Measurement of arterial blood pressure in conscious rats

Indirect systolic blood pressure (mmHg) was measured 1 h before (1st day) and during (1st to 15th) at alternated days (between 8 and 12 am) using tail-cuff plethysmography (catalog # EFF 306, Insight, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil). Conscious rats were restrained for 5–10 min in a warm box (Insight, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil) in a quiet room and conditioned to numerous cuff inflation-deflation cycles by a trained operator. Systolic blood pressure was measured, and the mean of three measurements was recorded, as previously described (Gonçalves-Rizzi et al., 2015; Nascimento et al., 2015).

2.3. Determination of fipronil concentrations in plasma

Whole-blood levels of fipronil were determined by liquid–liquid extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) system (Prominence Shimadzu®, Kyoto, Japan), according to the method proposed by Cid et al.

(2012) and adapted from Xavier et al. (2014). Briefly, blood samples were subjected to extraction by stirring with acetonitrile (Merck, Germany) and the filtered material was evaporated at room temperature and re-suspended with acetonitrile, then, passed with hydrophilic syringe filter with 13 mm diameter and pore 0.22 μm (PTFE membrane, VWR, Atlanta, GA, USA). A volume of 10 μL was injected into HPLC-UV, using a chromatographic column (C18). The whole-blood fipronil levels were expressed in μg/mL.

2.4. Determinations of plasma endothelin-1 and MMP-2 concentrations

For measurements were used commercial enzyme immunoassay (ELISA) kits for endothelin-1 (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, USA, catalog # DET100) and for MMP-2 (Abcam Inc, Cambridge, MA, USA, catalog # AB100730) plasma level assays, according to the manufacturer's instructions. The plasma endothelin-1 and MMP-2 levels were expressed in pg/mL.

2.5. Measurements of total antioxidant capacity

Serum antioxidant activity was determined by the Trolox (a water-soluble vitamin E analog, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma, St. Louis, MO, USA) equivalent antioxidant capacity assay as previously described (Ortner Hadžiabdić et al., 2015). Briefly, the antioxidant capacity is measured as the ability of the test compound (serum) to decrease the color of the reaction mixture by reacting directly with the ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical cation. The ABTS solution was mixed with 300 mL of the diluted serum sample and the reaction mixture was allowed to stand in the dark. After 3 min, the inhibition of the initial absorbance was recorded at 734 nm using an ultraviolet-visible spectrophotometer (UV 4-100, ATI Unicam, Cambridge, UK). Antioxidant activity of the sample was determined using a standard curve approach and was expressed as mmol of Trolox equivalent/L of sample.

2.6. Determinations of plasma nitrite/nitrate (NOx) concentrations

The plasma NO metabolites (nitrite/nitrate) – NOx concentrations were determined in duplicate using the Griess reaction as described previously (Gonçalves-Rizzi et al., 2015; Nascimento et al., 2015). Briefly, 40 μL of plasma was incubated with the same volume of nitrate reductase buffer (0.1 M potassium phosphate, pH 7.5, containing 1 mM b nicotinamide adenine dinucleotide phosphate and 2 U of nitrate reductase/mL) in individual wells of a 96-well plate. Samples were allowed to incubate overnight at 37 °C in the dark; 8 μL of freshly prepared Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in 5% phosphoric acid) was added to each well, and the plate was incubated for an additional 15 min at room temperature. A standard nitrate curve was obtained by incubating sodium nitrate (0.2–200 IM) with the same reductase buffer. The absorbance values were measured at 540 nm using a microplate reader (Spectrophotometer, Synergy 4, BIOTEK, Winooski, VT, USA). The NOx levels in plasma were expressed in μmol/L.

2.7. Evaluations of liver/biliary or kidney functional abilities

Serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) (IFCC method with pyridoxal phosphate activation), alkaline phosphatase (ALP) (IFCC method with aminomethylpropanol buffer), gamma-glutamyltransferase (GGT) (Szasz-Persijn method, using L-g-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide), creatine kinase (CK) (N-acetylcysteine-activated IFCC method), creatinine

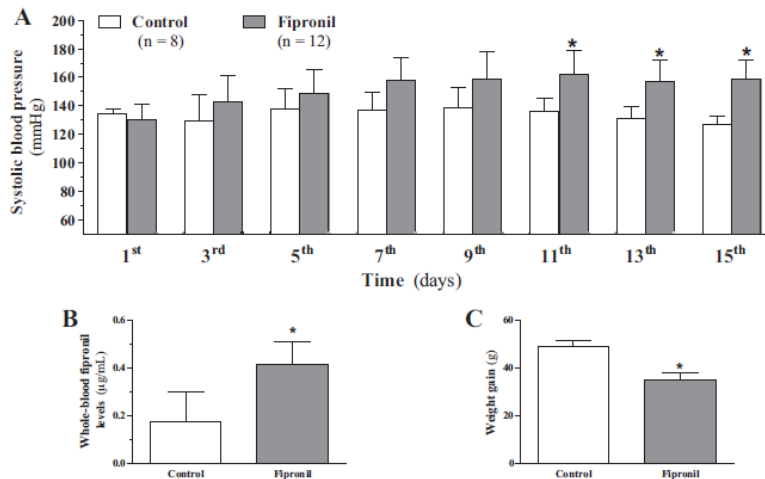


Fig. 1. Systolic blood pressure (mmHg, A), whole-blood fipronil levels ($\mu\text{g/mL}$, B) and weight gain (g, C) in the non-fipronil-exposed (Control group) or fipronil-exposed (Fipronil group) rats. Data are shown as mean \pm S.E.M. Comparisons between groups were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) test for repeated measures. * $p < 0.05$ versus Control group.

(Jaffe kinetic method) and urea (urease/glutamate dehydrogenase kinetic method) were assayed on a Dimension EXL 200 Integrated Chemistry System (Siemens, Erlangen, Germany), according to the manufacturer's specifications. Total imprecision, as expressed by the coefficient of variation (CV) was less than 2.5% for all analytes tested, as previously described (Lippi et al., 2006).

2.8. Data analysis and statistics

The results are expressed as means \pm SEM. Shapiro–Wilk test was applied to verify normality of data distribution. Comparisons between groups were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) test for repeated measures or Student's paired *t*-test with Bonferroni's correction *post hoc* test, and *t*-distribution and degree of freedom (*df*) values are presented as well. We used Graph Pad Prism® 6.0 for Windows (San Diego, CA, USA) to analyze the results. Differences were considered significant when probability (**p*) < 0.05.

3. Results

3.1. Effect of fipronil exposure on systolic blood pressure

The effects of fipronil exposure on systolic blood pressure were assessed in conscious rats. As shown in Fig. 1, fipronil caused significant increases in systolic blood pressure (162 ± 16 , $t = 4.071$, $df = 18$; 157 ± 14 , $t = 4.234$, $df = 17$; and 158 ± 13 mmHg, $t = 5.327$, $df = 16$, in Fipronil group on days 11, 13 and 15 of exposition, respectively (Fipronil group, * $p < 0.05$, Fig. 1A). No significant changes in systolic blood pressure were observed in Control group throughout experimental period (Fig. 1A).

The Fipronil group presented higher whole-blood fipronil levels (0.46 ± 0.09 $\mu\text{g/mL}$) compared with non-fipronil-exposed rats (0.17 ± 0.11 $\mu\text{g/mL}$ in Control group, $t = 1.583$, $df = 13$, * $p < 0.05$, Fig. 1B). In addition, Fipronil group showed lower weight gain (35 ± 3 g) compared with Control group (48 ± 3 g) ($t = 4.176$, $df = 16$, * $p < 0.05$, Fig. 1C).

Table 1

Serum levels of creatinine, creatine kinase (CK), urea, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and gamma-glutamyltransferase (GGT) in the non-fipronil-exposed (Control group) or fipronil-exposed (Fipronil group) rats. Data are shown as mean \pm S.E.M.

Biomarkers of renal and hepatic/biliary functional abilities	Control group	Fipronil group
Creatinine (mg/dL)	0.500 \pm 0.036	0.455 \pm 0.017
CK (U/L)	797 \pm 143	757 \pm 78
Urea (mg/dL)	39 \pm 2	41 \pm 2
ALT (U/L)	62 \pm 3	59 \pm 3
AST (U/L)	121 \pm 8	123 \pm 9
ALP (U/L)	27 \pm 2	26 \pm 1
GGT (U/L)	9 \pm 0.9	9 \pm 0.1

3.2. Effects of fipronil exposure in circulating biomarkers levels

Fipronil group presented higher concentrations of endothelin-1 (0.152 ± 0.008 pg/mL) compared with Control group (0.197 ± 0.019 pg/mL) ($t = 1.928$, $df = 16$, * $p < 0.05$, Fig. 2A). Also, lower antioxidant capacity (Throlox, 0.075 ± 0.021 versus 0.242 ± 0.080 equiv./L, $t = 2.407$, $df = 8$) and levels of circulating MMP-2 (4498 ± 300 versus 3260 ± 130 pg/mL , $t = 4.072$, $df = 16$) and NOx (13 ± 1 versus 19 ± 1 $\mu\text{mmol/L}$, $t = 4.617$, $df = 16$) were found in fipronil treated rats compared with Controls (Fipronil versus Control group, * $p < 0.05$, Fig. 2B–D, respectively).

No changes were observed in serum levels of creatinine, creatinine kinase, urea, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, gamma-glutamyltransferase in fipronil treated rats compared with controls (Table 1, respectively).

4. Discussion

The main results of this present study reveal, for the first time, that fipronil exposure resulted in elevation of both systolic blood pressure and levels of endothelin-1. Additionally, rats exposed to fipronil presented lower weight gain and decreases in antioxidant capacity and levels of MMP-2 and NOx in plasma, and no significant changes were observed in serum levels of creatinine, creatinine

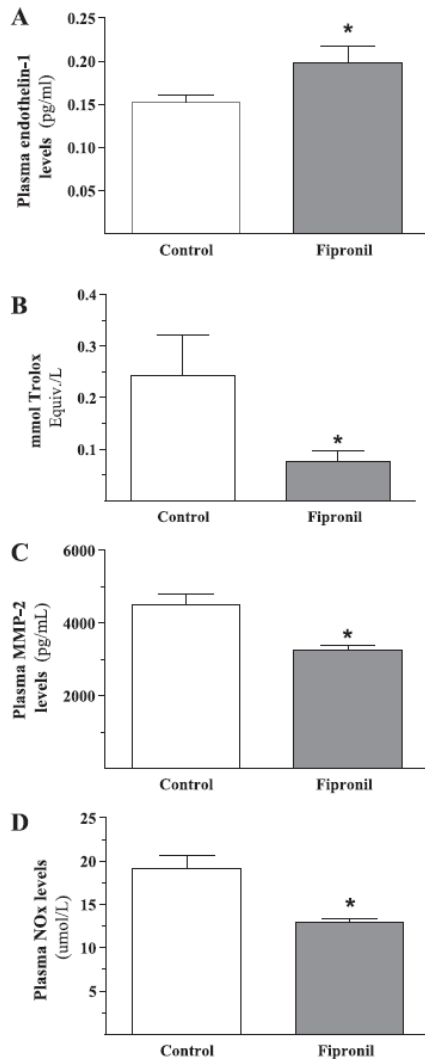


Fig. 2. Plasma endothelin-1 (A), Trolox (B), MMP-2 (C) and NOx (D) in the non fipronil-exposed (Control group) or fipronil-exposed (Fipronil group) rats. Data are shown as mean ± S.E.M. Comparisons between groups were assessed by Student's paired *t*-test with Bonferroni's correction *post hoc* test. **p* < 0.05 versus Control group.

kinase, urea, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, gamma-glutamyltransferase. Thus, these findings suggest that endothelin-1 may play an important role in fipronil-induced hypertension; also, the reductions of both MMP-2 and NO contributed to the elevation of systolic blood pressure observed with fipronil.

Accidental overexposure to the fipronil by farm works has been reported since its introduction in the market in the 90s (Tingle et al., 2003). The existence of fipronil-containing foodstuffs in many households has raised concerns and the possibility of contamination has been considered by governments (Tingle et al., 2003; Le Faouder et al., 2007; Jennings et al., 2002). Although fipronil's selectivity to the insects has been attributed to the inhibition of

chloride channels, which results in uncontrolled neural excitation and, eventually, the death of the insect (Jackson et al., 2009), lower potency has been seen by antagonizes mammalian GABAergic receptors (Ikeda et al., 2004). Accordingly, the human fipronil toxicity results in symptoms and complications typically associated with the blockade of the GABA receptor function, featured by nausea, headache and seizures (Mohamed et al., 2004). However, adverse effects non-related to this fipronil's mode of action has been reported in experimental studies, since low doses of fipronil revealed reproductive toxicity (Moser et al., 2015; Ohi et al., 2004), disturbed maternal behavior (Udo et al., 2014) and disruption of thyroid function in rats (Leghait et al., 2009).

The present study shows that fipronil elevated the systolic blood pressure. Although the mechanisms elucidating how the fipronil exposure resulted in hypertension had never been investigated before, our findings show that fipronil-induced hypertension (Fig. 1) could be explained by increases of endothelin-1 and decreases of NOx levels in plasma (Fig. 2). Supporting our results, it has been suggested that the normal function of the vascular endothelial lining the circulatory system is essential for vascular homeostasis (Murakami and Simons, 2009; Koyama et al., 2013). However, if the endothelial dysfunction is present as in many vascular diseases, including hypertension, there are decreases in endothelium-dependent vasodilators (NO and prostacyclin) and increases in endothelium-dependent vasoconstrictors (endothelin-1 and thromboxane A₂) (Chiu and Chien, 2011). Accordingly, studies in humans have demonstrated that endothelin-1 levels are increased in hypertensive patients (Saito et al., 1990) and endothelin-1 receptor antagonists reduced the blood pressure in resistant hypertension (Weber et al., 2009) and improved the endothelium-dependent vasodilation in essential hypertension (Cardillo et al., 2002). In regard to the NO, it has been demonstrated that lesser NOx plasma concentrations compared with control subjects, confirming biologically that decreases in NO bioavailability during elevation of blood pressure (Panza et al., 1993; Kleinbongard et al., 2006).

Otherwise, endothelial dysfunction has been often associated with a paradoxical increased oxidative stress, according to reduction in antioxidant capacity (Ortner Hadžabiđić et al., 2015; Chiu and Chien, 2011), thus, oxidative stress induced by fipronil (Badgujar et al., 2015; Bebe and Panemangalore, 2005) may have impaired the bioavailability of NO observed here (Fig. 2). Accordingly, previous reports stated that acute fipronil exposure induced oxidative stress (Badgujar et al., 2015) and reduced antioxidant status (Gill and Dumka, 2013) in animals. In this concern, toxicity mediated by pesticides involves excessive production of reactive oxygen species, which may lead to alterations in the cellular antioxidant defense system resulting in susceptibility of cells to oxidative stress (Badgujar et al., 2015; Bebe and Panemangalore, 2005; Moser et al., 2015). Reduction of cellular antioxidant status makes up the cell to become vulnerable to modify lipids, nucleic acids and proteins leading to cell disruption and increased production of lipid peroxidation induced by oxidative stress (Salminen and Paul, 2014). Thus, it is reasonable to consider that endothelial dysfunction has contributed with the fipronil toxicity in the present study.

In addition, decreases in MMP-2 levels in plasma were also observed with fipronil (Fig. 2), supporting earlier findings in which increases in tissue inhibitor of MMP (TIMP) were showed after fipronil exposure (Moser et al., 2015). Accordingly, both reduced levels of MMP-2 and NO could increase vessel rigidity and decrease its plasticity, contributing to increased vascular resistance and hypertension. These suggestions are consistent with previous reports that MMP-2 (a typical gelatinolytic enzyme) is decreased while the collagen deposition presents increased in arteries from hypertensive patients (Ergul et al., 2004) and from hypertension in pregnant rats (Li et al., 2014).

Importantly, the fipronil's mechanism is blocking the chloride channels of GABA-ergic receptors and glutamate-gated chloride channels (Narahashi et al., 2007; Zhao et al., 2005) and GABA antagonists activate vasopressin release (Isobe and Nishino, 1997; Magnusson and Meyerson, 1993; Sladek and Armstrong, 1987). Furthermore, vasopressin mediates the expression of the endothelin-1 (Emori et al., 1991; Imai et al., 1992; Li et al., 2003), which, in turn, is responsible for control the heart rate and systemic arterial pressure (Faraci, 1989). Therefore, it is possible that fipronil causes the vasopressin release and vasopressin had induced the expression of endothelin-1, elevating the systolic blood pressure as observed in the present study.

Earlier studies have reported that liver, kidney and brain are the target organs for toxic insults of fipronil (Badgujar et al., 2015; Terçariol and Godinho, 2011), owing to the fact that these tissues are extremely perfused organs and receive high blood volumes. In fact, liver toxicity to fipronil has been reported in mice following subchronic and chronic exposures (De Oliveira et al., 2012). On the other hand, this was not observed in our current short-term (15 days) study (Table 1). The present results show that although Fipronil group presented lower weight gain (Fig. 1), suggesting biological toxicity, no significant alterations were observed neither liver/biliary or kidney functional abilities as reflected by no significant changes in alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, gamma-glutamyltransferase, creatine kinase, creatinine and urea levels in plasma (Table 1). Importantly, a previous study showed that with repeated dosing fipronil accumulated (Moser et al., 2015) and increases in fipronil levels have been related to induction of hepatic metabolizing enzymes (Moser et al., 2015; Das et al., 2006). However, these differences could be explained, at least in part, by physiological and compensatory responses, as well as differing levels of fipronil and its metabolites resulted from different dosage regimen.

Therefore, it should be taken into account that reference levels and acceptable daily intakes for fipronil are set at doses much lower than those used here, which were approached to try to identify biological changes. In addition, although these doses may reflect high peaks in exposures with high contamination or poisonings (Jennings et al., 2002; Mohamed et al., 2004), a logical follow-up study should be driven to assess lower doses and longer exposure periods, to start approaching environmentally relevant exposures.

5. Conclusion

The main conclusions of the present study are that repeated oral exposition of 30 mg/kg/day of fipronil caused hypertension and disturbed related biomarkers that regulate the blood pressure. In addition, increases in endothelin-1 and decreases in antioxidant capacity, MMP-2 and NO were observed after 15 days of fipronil exposure. However, no changes in hepatic/biliary or renal function after 15 days of exposure were seen with fipronil. Therefore, our results suggest that endothelin-1 plays a key role in fipronil-induced hypertension and are in accordance with the notion that reductions of both MMP-2 and NO contribute to the elevation of blood pressure.

Conflict of interest

There is no conflict of interest to declare.

Acknowledgements

This study was funded by Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (FAPESP, Brazil).

References

- Badgujar, P.C., Pawar, N.N., Chandratte, G.A., Telang, A.G., Sharma, A.K., 2015. Fipronil induced oxidative stress in kidney and brain of mice: protective effect of vitamin E and vitamin C. *Pestic. Biochem. Physiol.* 118, 10–18.
- Bebe, F.N., Panemangalore, M., 2005. Pesticides and essential minerals modify endogenous antioxidant and cytochrome P450 in tissues of rats. *J. Environ. Sci. Health B* 40, 769–784.
- Cardillo, C., Campia, U., Kilcoyne, C.M., Bryant, M.B., Panza, J.A., 2002. Improved endothelium-dependent vasodilation after blockade of endothelin receptors in patients with essential hypertension. *Circulation* 105, 452–456.
- Chiu, J.J., Chien, S., 2011. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol. Rev.* 91 (1), 327–387.
- Cid, Y.P., Ferreira, T.P., Medeiros, D.M.V.C., Oliveira, R.M., Silva, N.C.C., Scott, F.B., 2012. Determination of fipronil in bovine plasma by solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet detection. *Quim. Nova* 35 (10), 2063–2066.
- Das, P.C., Cao, Y., Cherrington, N., Hodgson, E., Rose, R.L., 2006. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 164 (3), 200–214.
- De Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Denardi, S.E., Oliveira, R.J., Mathias, M.I., 2012. Cytotoxicity of fipronil on mice liver cells. *Microsc. Res. Tech.* 75 (1), 28–35.
- Emori, T., Hirata, Y., Ohta, K., Kanno, K., Eguchi, S., Imai, T., Shichiri, M., Marumo, F., 1991. Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension* 18 (2), 165–170.
- Ergul, A., Portik-Dobos, V., Hutchinson, J., Franco, J., Anstadt, M.P., 2004. Downregulation of vascular matrix metalloproteinase inducer and activator proteins in hypertensive patients. *Am. J. Hypertens.* 17, 775–782.
- Faraci, F.M., 1989. Effects of endothelin and vasopressin on cerebral blood vessels. *Am. J. Physiol.* 257, H799–H803.
- Gill, K.K., Dumka, V.K., 2013. Antioxidant status in oral subchronic toxicity of fipronil and fluoride co-exposure in buffalo calves. *Toxicol. Ind. Health* 10, 1–9.
- Gonçalves-Rizzi, V.H., Nascimento, R.A., Possomato-Vieira, J.S., Dias-Junior, C.A., 2015. Sodium nitrite prevents both reductions in circulating nitric oxide and hypertension in 7-day lead-treated rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*
- Ikedo, T., Nagata, K., Kono, Y., Yeh, J.Z., Narahashi, T., 2004. Fipronil modulation of GABA_A receptor single-channel currents. *Pest Manag. Sci.* 60, 487–492.
- Imai, T., Hirata, Y., Emori, T., Yanagisawa, M., Masaki, T., Marumo, F., 1992. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension* 19 (6), 753–757.
- Isobe, Y., Nishino, H., 1997. GABAergic control of Arg-vasopressin release from suprachiasmatic nucleus slice culture. *Brain Res.* 755 (2), 213–220.
- Jackson, D., Cornell, C.B., Luukinen, B., Buhl, K., Stone, D., 2009. Fipronil technical fact sheet. National Pesticide Information Center, Oregon State, pp. 1–3.
- Jennings, K.A., Canerdy, T.D., Keller, R.J., Atieh, B.H., Doss, R.B., Gupta, R.C., 2002. Human exposure to fipronil from dogs treated with frontline. *Vet. Hum. Toxicol.* 44, 301–303.
- Kleinbongard, P., Dejam, A., Lauer, T., Jax, T., Kerber, S., Gharini, P., Balzer, J., Zotz, R.B., Scharf, R.E., Willers, R., Schechter, A.N., Feilisch, M., Kelm, M., 2006. Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 295–302.
- Koyama, T., Ochoa-Callejero, L., Sakurai, T., Kamiyoshi, A., Ichikawa-Shindo, Y., Iinuma, N., Arai, T., Yoshizawa, T., Iesato, Y., Lei, Y., Uetake, R., Okimura, A., Yamauchi, A., Tanaka, M., Igarashi, K., Toriyama, Y., Kawate, H., Adams, R.H., Kawakami, H., Mochizuki, N., Martínez, A., Shindo, T., 2013. Vascular endothelial adrenomedullin-RAMP2 system is essential for vascular integrity and organ homeostasis. *Circulation* 127 (7), 842–853.
- Le Faouder, J., Bichon, E., Brunschwig, P., Landelle, R., Andre, F., Le Bizec, B., 2007. Transfer assessment of fipronil residues from feed to cow milk. *Talanta* 73 (4), 710–717.
- Leghait, J., Gayraud, V., Picard-Hagen, N., Camp, M., Perdu, E., Toutain, P.L., Vigué, C., 2009. Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. *Toxicology* 255 (1–2), 38–44.
- Li, L., Galligan, J.J., Fink, G.D., Chen, A.F., 2003. Vasopressin induces vascular superoxide via endothelin-1 in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension* 41, 663–668.
- Li, W., Mata, K.M., Mazzuca, M.Q., Khalil, R.A., 2014. Altered matrix metalloproteinase-2 and -9 expression/activity links placental ischemia and anti-angiogenic sFlt-1 to uteroplacental and vascular remodeling and collagen deposition in hypertensive pregnancy. *Biochem. Pharmacol.* 89 (3), 370–385.
- Lippi, G., Salvagno, G.L., Montagnana, M., Brocco, G., Guidi, G.C., 2006. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clin. Chem. Lab. Med.* 44 (3), 311–316.
- Magnusson, A.M., Meyerson, B.J., 1993. GABA-A agonist muscimol inhibits stimulated vasopressin release in the posterior pituitary of Sprague-Dawley, Wistar, Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Neuroendocrinology* 58 (5), 519–524.
- Mohamed, F., Senarathna, L., Percy, A., Abeyewardene, M., Eaglesham, G., Cheng, R., Azher, S., Hittarage, A., Dissanayake, W., Sheriff, M.H., Davies, W., Buckley, N.A., Eddleston, M., 2004. Acute human self-poisoning with the N-phenylpyrazole insecticide fipronil – a GABA_A-gated chloride channel blocker. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 42, 955–963.
- Moser, V.C., Stewart, N., Freeborn, D.L., Crooks, J., MacMillan, D.K., Hedge, J.M., Wood, C.E., McMahan, R.L., Strynar, M.J., Herr, D.W., 2015. Assessment of serum

- biomarkers in rats after exposure to pesticides of different chemical classes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 282 (2), 161–174.
- Murakami, M., Simons, M., 2009. Regulation of vascular integrity. *Mol. Med. (Berl.)* 87 (6), 571–582.
- Narahashi, T., Zhao, X., Ikeda, T., Nagata, K., Yeh, J.Z., 2007. Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Hum. Exp. Toxicol.* 4, 361–366.
- Narahashi, T., Zhao, X., Ikeda, T., Salgado, V.L., Yeh, J.Z., 2010. Glutamate-activated chloride channels: unique fipronil targets present in insects but not in mammals. *Pestic. Biochem. Physiol.* 97 (2), 149–152.
- Nascimento, R.A., Mendes, G., Possomato-Vieira, J.S., Gonçalves-Rizzi, V.H., Kushima, H., Delella, F.K., Dias-Junior, C.A., 2015. Metalloproteinase inhibition protects against reductions in circulating adrenomedullin during lead-induced acute hypertension. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 116 (6), 508–515.
- Ohi, M., Dalsenter, P.R., Andrade, A.J., Nascimento, A.J., 2004. Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. *Toxicol. Lett.* 146 (2), 121–127.
- Ortnor Hadziabdić, M., Vitali Čepo, D., Rahečić, D., Božikov, V., 2015. The effect of the mediterranean diet on serum total antioxidant capacity in obese patients: a randomized controlled trial. *J. Am. Coll. Nutr.* 5, 1–12.
- Overmyer, J.P., Rouse, D.R., Avants, J.K., Garrison, A.W., Delorenzo, M.E., Chung, K.W., Key, P.B., Wilson, W.A., Black, M.C., 2007. Toxicity of fipronil and its enantiomers to marine and freshwater non-targets. *J. Environ. Sci. Health B* 42, 471–479.
- Panza, J.A., Casino, P.R., Kilcoyne, C.M., Quyyumi, A.A., 1993. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 87, 1468–1474.
- Saito, Y., Nakao, K., Mukoyama, M., Imura, H., 1990. Increased plasma endothelin level in patients with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* 322 (3), 205.
- Salminen, L.E., Paul, R.H., 2014. Oxidative stress and genetic markers of suboptimal antioxidant defense in the aging brain: a theoretical review. *Rev. Neurosci.* 25 (6), 805–819.
- Sladek, C.D., Armstrong, W.E., 1987. γ -Aminobutyric acid antagonists stimulate vasopressin release from organ-cultured hypothalamo-neurohypophyseal explants. *Endocrinology* 120, 1576–1580.
- Terçariol, P.R., Godinho, A.F., 2011. Behavioral effects of acute exposure to the insecticide fipronil. *Pestic. Biochem. Physiol.* 99, 221–225.
- Tingle, C.C., Rother, J.A., Dewhurst, C.F., Lauer, S., King, W.J., 2003. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 176, 1–66.
- Udo, M.S., Sandini, T.M., Reis, T.M., Bernardi, M.M., Spinosa, H.S., 2014. Prenatal exposure to a low fipronil dose disturbs maternal behavior and reflex development in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 45, 27–33.
- Vidau, C., Gonzalez-Polo, R.A., Niso-Santano, M., Gomez-Sanchez, R., Bravo-San Pedro, J.M., Pizarro-Estrella, E., Blasco, R., Brunet, J.L., Belzunces, L.P., Fuentes, J.M., 2011. Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. *Neurotoxicology* 32, 935–943.
- Weber, M.A., Black, H., Bakris, G., Krum, H., Linas, S., Weiss, R., Linseman, J.V., Wiens, B.L., Warren, M.S., Lindholm, L.H., 2009. A selective endothelin-receptor antagonist to reduce blood pressure in patients with treatment-resistant hypertension: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 374, 1423–1431.
- Xavier, G., Chandran, M., George, T., Beevi, S.N., Mathew, T.B., Paul, A., Arimboor, R., Vijayaree, V., Pradeepkumar, G.T., Rajith, R., 2014. Persistence and effect of processing on reduction of fipronil and its metabolites in chilli pepper (*Capsicum annum* L.) fruits. *Environ. Monit. Assess.* 186 (9), 5429–5437.
- Zhao, X., Yeh, J.Z., Salgado, V.L., Narahashi, T., 2005. Sulfone metabolite of fipronil blocks gamma-aminobutyric acid- and glutamate-activated chloride channels in mammalian and insect neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314 (1), 363–373.