

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS**  
**CÂMPUS DE DRACENA**

**EFEITO DO FIPRONIL NA FERTILIDADE EM RATOS:  
EFEITOS OXIDANTES E PROTEÇÃO PELA VITAMINA E**

**Meiriele Mazzo**  
Farmácia-Bioquímica

**DRACENA – SP**  
**2017**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS**  
**CÂMPUS DE DRACENA**

**EFEITO DO FIPRONIL NA FERTILIDADE EM RATOS:  
EFEITOS OXIDANTES E PROTEÇÃO DA VITAMINA E**

**Meiriele Mazzo**

**Orientador: Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto**

Dissertação apresentada à Unesp – Câmpus de Dracena, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

**DRACENA – SP**

**2017**

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

M477e

Mazzo, Meiriele.

Efeito do fipronil na fertilidade em ratos: efeitos oxidantes e proteção pela vitamina E / Meiriele Mazzo. -- Dracena: [s.n.], 2017.

48 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2017.

Orientador: Fábio Erminio Mingatto

Inclui bibliografia.

1. Enzimas antioxidantes. 2. Estresse oxidativo. 3. Espermatozoide. 4. Inseticidas. 5. Testículo. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITO DO FIPRONIL NA FERTILIDADE EM RATOS: EFEITOS OXIDANTES E PROTEÇÃO PELA VITAMINA E

AUTORA: MEIRIELE MAZZO

ORIENTADOR: FABIO ERMINIO MINGATTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL, área: PRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FABIO ERMINIO MINGATTO  
Curso de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - UNESP

Profa. Dra. FLAVIA THOMAZ VERECHIA PEREIRA  
Curso de Zootecnia / Unidade de Dracena-UNESP / Faculdade de Ciência Agrárias e Tecnológicas de Dracena

Profa. Dra. DANIELA BERNADETE ROZZA  
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba

Ilha Solteira, 21 de fevereiro de 2017

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MEIRIELE MAZZO** – nascida em 10 de dezembro de 1983, na cidade de Dracena/SP - Brasil, filha de Idalina Léa Bazotte Mazzo e Leopércio Mazzo. Ingressou no curso de Graduação em Farmácia - Bioquímica pela Universidade do Oeste Paulista - Unoeste - Presidente Prudente (SP) em fevereiro de 2003, obtendo o grau de Farmacêutica e Bioquímica em dezembro de 2006. Em março de 2015, iniciou as atividades no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Animal, em nível de mestrado, área de concentração Produção Animal na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - Campus de Dracena, realizando estudos na área de “Bioquímica Metabólica e Toxicológica” sob orientação do Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto, concluindo o curso em Fevereiro de 2017.

**"Não existem sonhos impossíveis para aqueles que realmente acreditam que o poder realizador reside no interior de cada ser humano, sempre que alguém descobre esse poder algo antes considerado impossível se torna realidade." (Albert Einstein)**

**"Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu."  
(Sarah Westphal)**

Dedico este trabalho as pessoas mais importantes em minha vida, aos meus pais Idalina Léa Bazotte Mazzo e Leopércio Mazzo, meu filho Arthur Mazzo Prado, meus irmãos Maíra Cristina Mazzo e Leopércio Mazzo Junior e ao meu sobrinho Heitor Mazzo, por me incentivarem quando foi preciso e por sempre acreditarem em mim.

Com Amor, dedico!

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, por permitir que eu alcançasse meus objetivos, por me guiar e dar forças nos momentos mais difíceis de minha vida.

À minha Família, em especial aos meus pais Leopércio e Idalina, meu filho Arthur e meus irmãos Maíra e Junior que são a razão por eu estar onde estou hoje, pelo apoio incondicional, confiança, carinho, amizade, amor, por nunca medirem esforços para proporcionarem a mim uma ótima formação, aos quais eu dedico a minha vida.

Ao meu querido Prof. Fábio Erminio Mingatto pela orientação, apoio, paciência, dedicação, compreensão, pela confiança depositada e, sobretudo por ter sempre acreditado em mim. Obrigada por contribuir para meu crescimento profissional e, especialmente pela atenção, carinho e amizade. A você professor, minha imensa e eterna gratidão.

A todos meus amigos da Pós - Graduação, em especial a equipe LaBMet, principalmente à Kamila Vilas Boas Balieira, Anilda Rufino de Jesus Santos e Paulo Francisco Veiga Bizerra por toda ajuda e companheirismo durante nossas semanas dentro do laboratório e nossos fins de semana de tratamento dos animais.

Aos técnicos de Laboratório da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - Unesp - Câmpus de Dracena, João Milton, Wanderson, Andréia e Edison pelo auxílio na condução das análises.

Muito Obrigada!



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	13
2.1 Fipronil.....	13
2.2 Intoxicação pelo fipronil.....	15
2.3 Estresse oxidativo e a infertilidade .....	16
2.4 A Vitamina E como antioxidante.....	18
2.5 Fipronil na reprodução.....	19
3 OBJETIVOS .....	21
3.1 Objetivo geral .....	21
3.2 Objetivos específicos .....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Reagentes.....	21
4.2 Animais.....	22
4.3 Tratamento .....	22
4.3.1 Estudo piloto para seleção da dose do fipronil .....	22
4.3.2 Tratamentos para análise da atividade do fipronil na fertilidade e proteção pela vitamina E.....	23
4.4 Teste de fertilidade.....	24
4.4.1 Contagem de espermatozoides.....	24
4.5 Análise de parâmetros do estresse oxidativo no homogenato de testículo .....	25
4.5.1 Preparação do homogenato de testículo.....	25
4.5.2 Concentração de glutathiona reduzida (GSH).....	26
4.5.3 Oxidação dos grupos tióis de proteínas .....	27
4.5.4 Peroxidação dos lipídeos de membrana .....	29
4.6 Parâmetros de estresse oxidativo avaliados no sobrenadante obtido a partir do homogenato de testículo .....	30

4.6.1 Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx).....	30
4.6.2 Atividade das enzimas catalase (CAT).....	30
4.7 Análise Estatística .....	31
5 RESULTADOS .....	32
5.1 Teste de Fertilidade.....	32
5.1.1 Contagem de espermatozoides epididimais.....	32
5.1.2 Avaliação do efeito do fipronil e proteção pela vitamina E .....	33
5.2 Parâmetros do estresse oxidativo avaliados no homogenato de testículo .....	33
5.2.1 Concentração de glutathiona reduzida (GSH).....	33
5.2.2 Oxidação dos grupos tióis de proteína .....	34
5.2.3 Peroxidação dos lipídeos de membrana .....	35
5.3 Parâmetros de estresse oxidativo avaliados no sobrenadante obtido do homogenato de testículo .....	36
5.3.1 Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx).....	36
5.3.2 Atividade da enzima catalase.....	37
6 DISCUSSÃO .....	39
7 CONCLUSÕES .....	42
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43



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



## Comissão de Ética em Uso de Animais

# Certificado

Tendo em vista o Protocolo CEUA 23/2015, certificamos que o Projeto intitulado "**Potencial Toxicológico do inseticida finopril na fertilidade em ratos, mecanismos envolvidos e efeito protetor da vitamina E**" (**Toxicological potential of the insecticide fipronil on the fertility in rats, involved mechanisms and protector effect of the vitamin E**), sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Fábio Erminio Mintgatto** está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética em Uso de Animais – CEUA, do Curso de Graduação em Zootecnia, do Câmpus Experimental de Dracena – UNESP, e foi aprovado pela referida Comissão.

Dracena, 19 de novembro de 2015.

**Prof. Dr. Danilo Domingues Millen**  
Presidente da Comissão de Ética em Uso de Animais

## **EFEITO DO FIPRONIL NA FERTILIDADE EM RATOS: EFEITO OXIDANTE E PROTEÇÃO PELA VITAMINA E**

**RESUMO** - Fipronil é um inseticida de amplo-espectro de ação, utilizado para o controle de pragas nas lavouras e de ectoparasitas na medicina veterinária. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos tóxicos do fipronil sobre a fertilidade de ratos machos por meio da avaliação da produção de espermatozoides e de danos oxidativos causados no homogenato de testículos, além de avaliar a ação protetora da vitamina E. Ratos Wistar machos pesando aproximadamente 200 g foram divididos em três grupos (n = 6): controle: DMSO (60%) mais salina (40%) por via intraperitoneal (i.p.); fipronil 5: fipronil dissolvido em DMSO (60%) mais salina (40%) (5 mg/kg de peso corporal i.p.); fipronil 5 + vitamina E: fipronil dissolvido em DMSO (60%) mais salina (40%) (5 mg/kg de peso corporal i.p.) e vitamina E (100 mg/kg de peso vivo via oral). Durante 14 dias os animais foram pesados e cada grupo recebeu seu respectivo tratamento conforme citado, sendo que no 15º dia os animais foram eutanasiados e os testículos e epidídimos foram isolados para realização das seguintes análises: concentração de espermatozoides nos epidídimos, atividade das enzimas glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), determinação das concentrações de glutatona reduzida (GSH), grupos tióis de proteínas e malondialdeído (MDA) no homogenato dos testículos. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. O fipronil reduziu significativamente a produção de espermatozoides ( $P < 0,01$ ) e a vitamina E apresentou efeito protetor sobre esse parâmetro. A atividade da enzima GPx aumentou e a da CAT foi significativamente reduzida pelo fipronil ( $P < 0,001$  e  $P < 0,05$ , respectivamente) e a vitamina E reestabeleceu as atividades das enzimas para níveis similares aos do grupo controle. Observou-se uma redução significativa na concentração de GSH nos testículos dos ratos tratados com fipronil ( $P < 0,001$ ) em relação ao grupo controle e a vitamina E apresentou uma proteção parcial deste efeito. Não houve alteração na concentração de grupos tióis de proteínas. Houve um aumento significativo na concentração de MDA ( $P < 0,05$ ), indicador de lipoperoxidação, nos animais tratados com fipronil e esse efeito foi diminuído pela vitamina E. Conclui-se que o fipronil afetou a produção de espermatozoides em ratos por apresentar atividade oxidante e que este efeito foi revertido pela vitamina E.

**Palavras-chave:** enzimas antioxidantes; estresse oxidativo; espermatozoide; inseticidas; testículo.

## EFFECT OF FIPRONIL ON THE FERTILITY IN RATS: OXIDANT EFFECT AND PROTECTION BY VITAMIN E

**ABSTRACT** - Fipronil is an insecticide with a broad-spectrum of action, used largely in both agricultural crops and veterinary medicine to control pests and ectoparasites. The objective of this study was to evaluate the toxic effects of fipronil on the fertility of male rats by evaluating sperm production and oxidative damage caused in the testis homogenate, as well as the protective action of vitamin E. Male Wistar rats weighing approximately 200 g were divided into three groups (n = 6): control: corn oil orally and DMSO (60%) plus saline (40%) intraperitoneally (i.p.); fipronil 5: fipronil dissolved in DMSO (60%) plus saline (40%) (5 mg/kg body weight i.p.); fipronil 5 + vitamin E: fipronil dissolved in DMSO (60%) plus saline (40%) (5 mg/kg body weight i.p.) and vitamin E dissolved in corn oil (100 mg/kg body weight orally). During 14 days the animals were weighed and each group received its respective treatment as mentioned, and on the 15th day the animals were euthanized and the testicles and epididymis were isolated for the following analysis: sperm concentration in the epididymis, activity of the glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) enzymes, concentrations of reduced glutathione (GSH), protein thiol groups and malondialdehyde (MDA) in the homogenate of testicles. Data were analyzed by ANOVA followed by the Tukey test. Fipronil significantly reduced sperm production ( $P < 0.01$ ) and vitamin E had a protective effect on this parameter. The activity of the GPx enzyme increased and that of CAT was significantly reduced by fipronil ( $P < 0.001$  and  $P < 0.05$ , respectively) but the vitamin E reestablished the enzyme activities to levels similar to those of the control group. A significant reduction in GSH concentration was observed in the testis of rats treated with fipronil ( $P < 0.001$ ) compared to the control group and vitamin E showed partial protection against this effect. There was no change in the concentration of thiol groups of proteins. There was a significant increase in the concentration of MDA ( $P < 0.05$ ), indicative of lipoperoxidation, in the animals treated with fipronil and this effect was reduced by vitamin E. It was concluded that fipronil declined the sperm production of the rats because its oxidant activity and that this effect was reversed by vitamin E.

**Keywords:** antioxidants enzymes; oxidative stress; spermatozoids; insecticides; testis.

## 1 INTRODUÇÃO

O fipronil é um inseticida pertencente à família dos fenilpirazóis e age com boa seletividade no controle de insetos (HAINZL; CASIDA, 1998; TINGLE et al., 2003), sendo extensivamente utilizado em uma variedade de infestações como baratas, mosquitos, cupins, formigas, gafanhotos, além de pulgas, piolhos e carrapatos de cães, gatos e bovinos (CHANTON et al., 2001; AAJOUUD et al., 2003; PAIM et al., 2010). Seu mecanismo de ação é baseado no bloqueio não competitivo dos canais de Cl<sup>-</sup> ligados aos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), levando os insetos à morte por hiperexcitação neuronal e paralisia (ZHAO, 2004).

Embora seja considerado seguro para os animais, vários estudos têm relatado que o fipronil é rapidamente metabolizado no fígado e os seus metabólitos são amplamente distribuídos nos tecidos, principalmente no tecido adiposo (TINGLE et al., 2003). Foi comprovado que a formação do metabólito sulfona, derivado de uma reação de oxidação, corresponde à principal via do metabolismo hepático deste composto (CABONI et al., 2003; TANG et al., 2004). Alguns estudos demonstraram que o fipronil exerce efeito tóxico às células do fígado de ratos (TAVARES et al., 2015; GUELFU et al., 2015). Além dos efeitos tóxicos para o fígado o fipronil também tem apresentado efeitos sobre a reprodução, sendo que estudos demonstram que o uso do fipronil afeta o sistema reprodutor em ratas (TINGLE et al., 2003; OHI et al., 2004; COX, 2005), porém há uma escassez de estudos sobre a fertilidade em machos.

A infertilidade em machos tem sido relacionada com a diminuição da viabilidade e fertilidade dos espermatozoides, as quais podem ser provocadas pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO), excedendo assim a capacidade antioxidante celular e levando ao chamado estresse oxidativo (HSU et al., 1998). O estresse oxidativo também é considerado um dos principais fatores associados à perda na fertilidade de amostras de sêmen durante sua manipulação e armazenamento, principalmente quando utilizadas técnicas que necessitam da retirada do plasma seminal (BALL et al., 2001; CALAMERA et al., 2001; WATSON, 2000; AITIKEN, BAKER, 2006).

Diversos estudos demonstraram que a vitamina E aumenta a concentração e a qualidade de espermatozoides em diferentes espécies animais (BRZEZINSKA-

SLEBODZINSKA et al., 1995; YOUSEF; ABDALLAH; KAMEL, 2003; HONG et al., 2010; YUE et al., 2010). Acredita-se que a vitamina E seja o componente primário do sistema antioxidante dos espermatozoides (SURAI et al., 1998), sendo um dos principais protetores de membrana contra ERO e peroxidação lipídica (AKIYAMA, 1999). Sua ação é baseada no aumento da resistência das células ao peróxido de hidrogênio e sua capacidade de destruição dos peróxidos livres formados (DROGE, 2002).

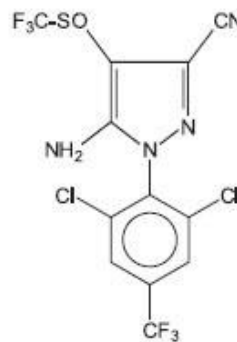
O presente estudo teve como objetivo analisar a interferência do fipronil na fertilidade de ratos machos, uma vez que os relatos existentes da ação do fipronil sobre a reprodução focam principalmente estudos em fêmeas. Foram considerados os danos oxidativos causados no homogenato dos testículos e também foi investigado o efeito protetor da vitamina E contra a ação tóxica do fipronil.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Fipronil

O fipronil é o primeiro inseticida fenilpirazol sintético, o qual foi produzido entre 1985 e 1987 e lançado em 1993 pela companhia Rhône-Poulenc Agro, comercialmente registrado como Regente® (BOBÉ et al., 1998ab; TINGLE et al., 2003).

De acordo com a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) o nome químico do fipronil é (RS)-5-amino-1-(2,6-dicloro- $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-p-tolil)-4-trifluoro metilsulfonilpirazol-3-carbonitrila, e sua fórmula estrutural é:



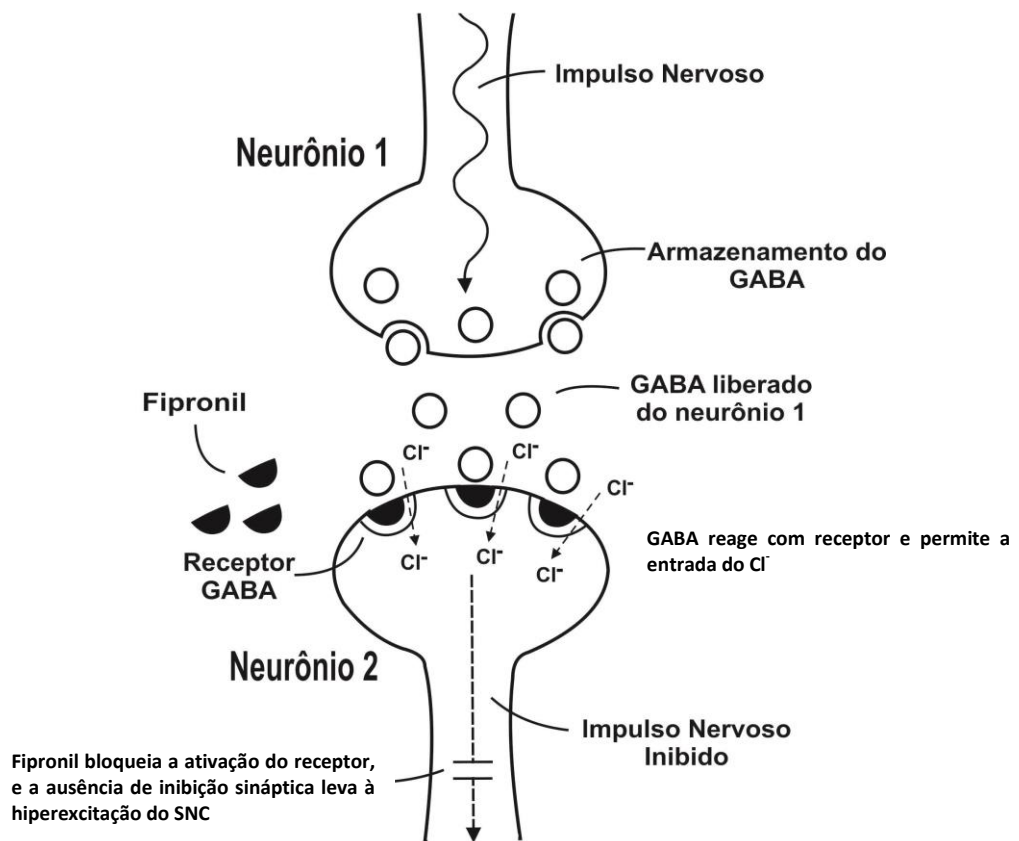
**Figura 1.** Estrutura química do fipronil (fonte: domínio público).

Esse inseticida é largamente utilizado na saúde pública, na agricultura e na medicina veterinária para o controle de uma variedade de pragas, como baratas, mosquitos, formigas, gafanhotos, pulgas, carrapatos e piolhos (CHANTON et al. 2001, AAJOUND et al. 2003). Considerado um inseticida de segunda geração altamente ativo e de amplo espectro, foi desenvolvido com o intuito de reduzir danos ao meio ambiente e aos mamíferos, além de servir como alternativa à resistência de alguns insetos a outros compostos inseticidas como organofosforados, piretróides e carbamatos, desempenhando assim, grande ação em doses inferiores aos agentes anteriormente citados (BOBE et al. 1997; WILDE et al., 2001).

Vários estudos têm demonstrado que a ação tóxica do fipronil nos insetos, baseia-se em sua habilidade de agir como um bloqueador não competitivo dos canais de Cl<sup>-</sup> ligados aos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), uma



substância que controla o fluxo de íons cloro através da membrana da célula nervosa, causando a morte dos insetos por hiperexcitação do Sistema Nervoso Central (SNC) e paralisia (ZHAO, 2004; BLOOMQUIST, 2015). Normalmente, quando o GABA é liberado do terminal nervoso pré-sináptico, ele se liga a uma proteína receptora pós-sináptica contendo um canal iônico de cloreto intrínseco (Figura 2). Quando o GABA se liga ao receptor, o canal é aberto e os íons  $\text{Cl}^-$  fluem para o neurônio pós-sináptico. Esta permeabilidade ao cloreto pode hiperpolarizar significativamente (tornar mais negativo) o potencial de membrana e tem um efeito amortecedor no disparo de impulsos nervosos, reduzindo a resistência da membrana. O fipronil se liga ao canal de  $\text{Cl}^-$  e bloqueia sua ativação pelo GABA, e esta ausência de inibição sináptica leva à hiperexcitação do SNC (BLOOMQUIST, 2015).



**Figura 2.** Representação da ação do fipronil no receptor GABA. Fonte: Adaptado de Bloomquist (2015).

## 2.2 Intoxicação pelo fipronil

As principais vias de intoxicação pelo fipronil são: oral, dermal e por inalação (JENNINGS et al. 2002; FUNG et al., 2003). Se a dose do fipronil não for usada conforme as indicações do fabricante, esse inseticida pode ser tóxico aos mamíferos. Há relatos na literatura, de casos de intoxicação, devido à exposição acidental ou utilização equivocada do composto (CHODOROWSKI; ANAND, 2004). De acordo com relatos na literatura, a ingestão de uma elevada dose de fipronil acarretou em morte humana por intoxicação aguda (MOHAMED et al., 2004). Em ratos, durante a exposição crônica com fipronil, houve sintomas como apreensão e inclusive levando a morte.

Não se pode confirmar que os sintomas provocados pela intoxicação com fipronil, tais como sudorese, náuseas, vômitos e agitação resultem da toxicidade neurológica. Um estudo que relatou casos de convulsões em coelhos, sugerindo que o SNC seja o maior alvo do fipronil (WEBSTER, 1999). Foram relatados outros efeitos com o uso do fipronil: redução do ganho de peso, diminuição do consumo de alimento e eficiência na conversão do alimento, diminuídas medidas hematológicas, alterações nos hormônios tireoidianos, aumento no peso do fígado e progressiva nefropatia senil. Relatos de efeitos de contato local com o fipronil foram brandos, constando apenas de irritação transitória dos olhos e pele (EPA, 1996).

Em mamíferos há poucos estudos relacionados ao inseticida. Quando o fipronil e seus metabólitos atingem a corrente sanguínea, são distribuídos nos tecidos gordurosos e apresentam um alto nível de circulação enterohepática. (HAINZL; CASIDA, 1998; MOHAMED et al., 2004). A formação do metabólito sulfona provém de uma reação de oxidação correspondente à principal via do metabolismo hepático deste composto (CABONI et al., 2003; TANG et al., 2004). De acordo com estudos, essa reação de oxidação é catalisada pelas enzimas do CYP (LEGHAIT et al. 2009). Os animais que fizeram uso do fipronil em tratamentos demonstraram a elevação na atividade do CYP no fígado. A enzima hepática citocromo P450 3A4 é responsável pela formação do metabólito sulfona, tanto em humanos quanto em ratos (CABONI; SAMMELSON; CASIDA, 2003; TANG et al., 2004; DAS et al., 2006). De acordo com Das et al. (2006) a formação do metabólito seria uma forma de

ativação da toxicidade do composto, o que potencializaria seus efeitos. Em estudos realizados por Tavares et al. (2015), Guelfi et al. (2015) e Medeiros et al. (2015) tanto o fipronil quanto seus metabólitos dessulfinil e sulfona interferiram nos processos metabólicos de produção de energia em mitocôndrias e hepatócitos isolados além do fígado de rato em perfusão, provocando a morte celular dos hepatócitos.

### **2.3 Estresse oxidativo e a infertilidade**

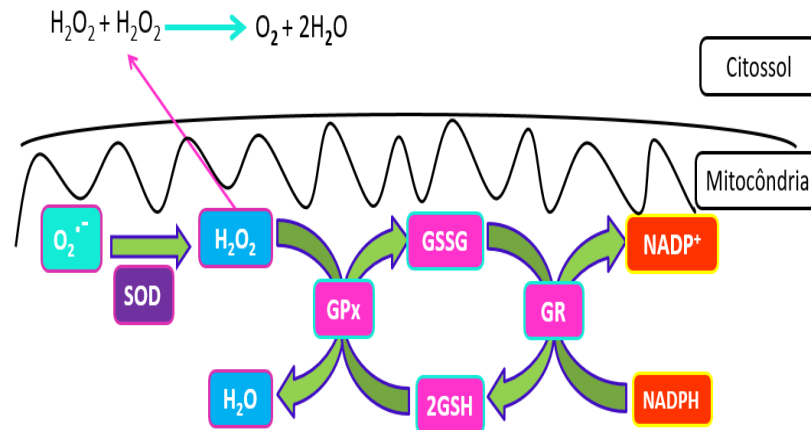
O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a produção de radicais livres e o grau de proteção dos mecanismos antioxidantes (ONG; SHAN; CHIA, 2002).

Entre os radicais livres, estão as espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo as mais importantes o radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ), o ânion superóxido ( $\text{O}_2^\bullet$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). O peróxido de hidrogênio e o ânion superóxido são as ERO formadas primariamente, sendo o  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerado por meio da dismutação (enzimática ou não enzimática) do ânion superóxido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O principal local de produção das ERO acontece na mitocôndria (BARJA, 2007). A fosforilação oxidativa gera grande parte da energia produzida no organismo, envolvendo cinco complexos enzimáticos (BLIER et al., 2001). Os complexos de I a IV (cadeia de transporte de elétrons) fazem parte do transporte de elétrons através de uma série de proteínas via reações de oxi-redução, sendo o seu destino final uma molécula de oxigênio. Em situações normais, o oxigênio é, então, convertido em água no complexo IV, e a energia é estocada e utilizada para a produção de ATP no complexo V ( $\text{F}_0\text{F}_1$  ATP-sintetase). Entretanto, durante esse processo, uma pequena porcentagem do oxigênio utilizado pela mitocôndria no complexo IV, é convertida em uma das várias ERO, em vez de água (DOWNLING; SIMMONS, 2009).

De acordo com Halliwell e Gutteridge (2007), fisiologicamente, o organismo pode se defender da agressão mediada pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) utilizando-se das reservas de enzimas antioxidantes, entre elas a glutathione peroxidase (GPx), a glutathione redutase (GR) e a catalase (CAT). O estresse

oxidativo é o desequilíbrio entre ERO versus sistema antioxidante pela diminuição dos níveis de GSH e o aumento da concentração da glutathiona oxidada (GSSG) e lipoperoxidação, ocorrendo a redução da atividade de enzimas antioxidantes: CAT, superóxido dismutase (SOD), GPx e GR (SIES, 1986) (Figura 3).



**Figura 3.** Sistema Antioxidante Celular

Um das causas mais frequentes da disfunção espermática é o estresse oxidativo, sendo este considerado um dos principais fatores associados à perda na fertilidade de amostras de sêmen durante sua manipulação e armazenamento, sobretudo quando utilizadas técnicas que retiram do plasma seminal (BALL et al., 2001; CALAMERA et al., 2001; WATSON, 2001; AITIKEN; BAKER, 2002).

Estudos afirmam que 40 a 80% dos homens inférteis apresentam altos níveis de oxigênio reativo seminal, independente da causa da infertilidade (PASQUALOTTO et al., 2000). O espermatozoide é um organismo aeróbio, onde o oxigênio é um elemento importante para manutenção de suas funções, entretanto, pode ocasionar sérios danos à célula espermática, quando apresenta elevadas concentrações, o que ocorre, por exemplo, na elevada produção de ERO. O excesso de ERO afeta a qualidade do sêmen, provocando a perda da motilidade de forma irreversível, inibição da respiração espermática, lesões ao DNA espermático e mitocondrial e perda de enzimas intracelulares, prejudicando a capacidade fecundante do espermatozoide (IRVINE et al., 2000; VALENÇA; GUERRA, 2007). Acredita-se ainda que a susceptibilidade do espermatozoide às ERO seja devida à

quantidade limitada de antioxidantes, principalmente os enzimáticos, atribuída à pequena quantidade de citoplasma na célula espermática (VERNET; AITKEN; DREVET, 2004).

#### **2.4 A Vitamina E como antioxidante**

O organismo animal possui um mecanismo para proteger-se do processo oxidativo e as substâncias responsáveis por esses processos receberam o nome de antioxidantes. As substâncias classificadas como agentes antioxidantes são as vitaminas, minerais e enzimas, sendo que estes podem reconduzir o balanço entre as moléculas oxidantes e antioxidantes no organismo, conservando a integridade das membranas celulares e prevenindo o dano oxidativo ao DNA (KODAMA et al., 1997)

No sistema antioxidante enzimático ocorre a proteção das membranas celulares contra a peroxidação lipídica, sendo que os responsáveis pela proteção são três enzimas: a glutathiona peroxidase (GPx), a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (DANDEKAR et al., 2002).

O sistema de proteção de membranas não enzimático é constituído basicamente pelas vitaminas E ( $\alpha$ -tocoferol) e C (ascorbato), que são capazes de reparar os radicais livres e assim impedir a cascata oxidativa (BUETTNER, 1993).

As vitaminas E e C agem simultaneamente na proteção das membranas lipídicas contra o dano oxidativo, sendo que a vitamina E oxida-se e interrompe a reação em cadeia da peroxidação lipídica de biomembranas e lipoproteínas (HSU et al. 1998). A vitamina C desloca as ERO da fase aquosa para a cadeia transportadora de elétrons e assim evita a peroxidação lipídica, além de reciclar a vitamina E oxidada (radical  $\alpha$ -tocoferil) (HSU et al., 1998).

No processo de maturação o espermatozoide perde citoplasma, perdendo parte dos mecanismos endógenos de reparo e as defesas enzimáticas, o que também foi observado em outros tipos celulares. Porém, o espermatozoide é protegido do ataque oxidativo pelo plasma seminal, o qual é composto por enzimas e moléculas antioxidantes, como as vitaminas E e C, superóxido dismutase e a catalase (DONNELLY; MCCLURE; LEWIS, 1999).

Kodama et al., 1997 relataram que para melhorar a eficiência reprodutiva, são usados alguns antioxidantes, entre eles as vitaminas A, C e E. A administração de vitaminas C e E (200 mg) por um período de dois meses aumentou a concentração espermática no ejaculado em machos oligospermicos.

Santana et al. (2015) estudaram os mecanismos pelos quais o gossipol, uma substância presente no caroço de algodão, provoca infertilidade em machos. Os autores concluíram que o gossipol afeta o sistema antioxidante dos testículos afetando a produção de espermatozoides. A vitamina E por sua vez, protegeu os testículos devido à sua ação como antioxidante.

## **2.5 Fipronil na reprodução**

Diversos experimentos e relatos na literatura têm demonstrado que o fipronil pode interferir na função reprodutiva em diferentes espécies animais. Tingle et al. (2003) descreveram que o fipronil em doses sistêmicas de 26 mg/kg de peso corporal/dia em ratos e 28 mg/kg de peso corporal/dia em ratas, levou à diminuição do tamanho da ninhada, bem como diminuiu o peso corporal dos animais e a porcentagem de acasalamento; reduziu o índice de fertilidade, a sobrevivência pós-implantação e pós-natal da prole, além de retardar o desenvolvimento desta.

Ohi et al. (2004) demonstraram que os efeitos adversos sobre o aparelho reprodutor de ratas expostas ao fipronil estão relacionados às alterações do sistema endócrino. As ratas foram expostas ao fipronil nas concentrações de 70, 140 e 280 mg/kg de peso corporal como uma única dose tópica na região cervical. Essas doses correspondem a uma, duas e quatro vezes a dose mais elevada recomendada pelos fabricantes.

Cox (2005) relatou que ratas fêmeas expostas ao fipronil nas concentrações 0,1, 1,0 e 10,0 mg/mL, por gavagem no sexto dia de gestação, apresentaram disfunções em hormônios tireoidianos, causando tumores benignos e malignos, e em hormônios sexuais, interferindo no desenvolvimento sexual dos filhotes machos e aumentando o tempo de intervalo entre os períodos férteis em fêmeas, levando à infertilidade.

Em um estudo com peixe zebra (*Danio rerio*), Boaru et al. (2013) expuseram peixes em estágio reprodutivo de maturação e as desovas a três concentrações diferentes de fipronil (C1 = 0,016mg/L, C2 = 0,041mg/L, C3 = 0,082mg/L). A taxa de sobrevivência nos 21 dias de exposição foi de 100% nos três grupos experimentais e no grupo controle. No entanto, os efeitos sobre os parâmetros reprodutivos foram evidentes mesmo com a menor concentração de fipronil aplicada sendo que a dose mais elevada de fipronil diminuiu tanto a desova como a fertilização e a porcentagem de eclosão, em comparação com o grupo controle.

Barros et al. (2016) avaliaram os efeitos resultantes da exposição perinatal ao fipronil nas concentrações de 0,03; 0,3 ou 3 mg/kg de peso corporal e suas possíveis repercussões tardias sobre parâmetros reprodutivos em ratos machos. Os resultados demonstraram que a exposição perinatal ao fipronil tem efeitos em longo prazo sobre a motilidade espermática, e que o epidídimo pode ser um órgão-alvo.

Em trabalho realizado com codornas japonesas (*Coturnix japonica*) administrando uma dose de fipronil (2,26 mg/kg de peso corporal) durante 15 dias, Khalil et al. (2017) observaram que o inseticida afeta negativamente o sistema reprodutivo das codornas japonesas machos, alterando índices fisiológicos, comportamentais e histopatológicos. Foi observada diminuição significativa da taxa de fertilização de ovos após o acasalamento das codornas machos tratadas com fipronil com codornas fêmeas receptivas. Além disso, observaram-se alterações teciduais nos testículos, diminuição da concentração de testosterona e aumento do estradiol no sangue. Os autores concluíram que essas alterações podem estar relacionadas com o aumento da incidência de infertilidade nas codornas machos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estudar os mecanismos de ação do fipronil sobre a fertilidade em ratos machos incluindo avaliação dos danos causados no homogenato dos testículos, além de analisar a ação protetora da vitamina E.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Avaliar os efeitos do fipronil e a possível proteção da vitamina E:

- na fertilidade de ratos machos, por meio da quantidade de espermatozoides epididimais;

- no estado oxidativo do homogenato de testículo por meio da atividade das enzimas GPx e catalase, concentração de GSH, além do estado oxidativo de grupos tióis de proteínas e dos lipídeos de membrana.

### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Reagentes**

O fipronil foi cedido pela empresa Ourofino Agronegócios (Cravinhos, SP, Brasil), contendo 96,6% de pureza, analisado por cromatografia de alta precisão. A vitamina E é da empresa Aché, adquirida em uma farmácia comercial.

Em todos os ensaios foram empregados reagentes de maior grau de pureza disponíveis comercialmente e as soluções foram preparadas com água ultra-filtrada em sistema purificador Millipore DirectQ-3<sup>®</sup> (Milli-Q<sup>®</sup>). O fipronil foi solubilizado em uma mistura de dimetilsulfóxido (DMSO) e solução salina (NaCl 0,9%) e a vitamina E foi solubilizada em óleo de milho comercial.



## 4.2 Animais

Os animais usados foram ratos Wistar machos de aproximadamente 200 g provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu. Esses foram alojados no Biotério de Manutenção do Campus de Dracena em ambiente controlado com temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  com ciclo de luz de 12h, divididos em caixas acrílicas, recebendo alimentação específica para roedores e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos com animais usados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da FCAT/Unesp - Câmpus de Dracena (Protocolo CEUA 23/2015).

## 4.3 Tratamento

### 4.3.1 Estudo piloto para seleção da dose do fipronil

Inicialmente foi realizado um estudo piloto para definir a dose de fipronil a ser utilizada nos experimentos para avaliar o mecanismo de ação do fipronil e a atividade protetora da vitamina E. No estudo piloto foram realizados experimentos de contagem do número de espermatozoides epididimais em ratos (6 animais por grupo) tratados com duas doses diferentes de fipronil por 14 dias consecutivos:

- Controle: recebeu óleo de milho por gavagem gástrica e uma mistura de dimetilsulfóxido (DMSO) e solução salina (NaCl 0,9%) (1,5:1) via intraperitoneal.

- TF5: recebeu solução de fipronil na dosagem de 5 mg/kg de peso vivo (1/20 da DL50) dissolvido em DMSO mais salina via intraperitoneal e óleo de milho por gavagem gástrica.

- TF10: recebeu solução de fipronil na dosagem de 10 mg/kg de peso vivo (1/10 da DL50) dissolvido em DMSO mais salina via intraperitoneal e óleo de milho por gavagem gástrica.

#### **4.3.2 Tratamentos para análise da atividade do fipronil na fertilidade e proteção pela vitamina E**

Os resultados obtidos no estudo piloto mostraram que não houve diferença significativa entre as doses de fipronil 5 mg/kg de peso vivo e 10 mg/kg de peso vivo na contagem de espermatozoides epididimais. Sendo assim, optou-se pela dose de 5 mg/kg para os testes visando avaliar a atividade do fipronil na fertilidade e possível proteção da vitamina E. Outros três grupos de 6 animais foram divididos aleatoriamente e durante 14 dias no período matutino os animais foram pesados e cada grupo recebeu o seu devido tratamento:

- Grupo 1 (Controle): recebeu óleo de milho por gavagem gástrica e uma mistura de dimetilsulfóxido (DMSO) e solução salina (NaCl 0,9%) (1,5:1) via intraperitoneal.

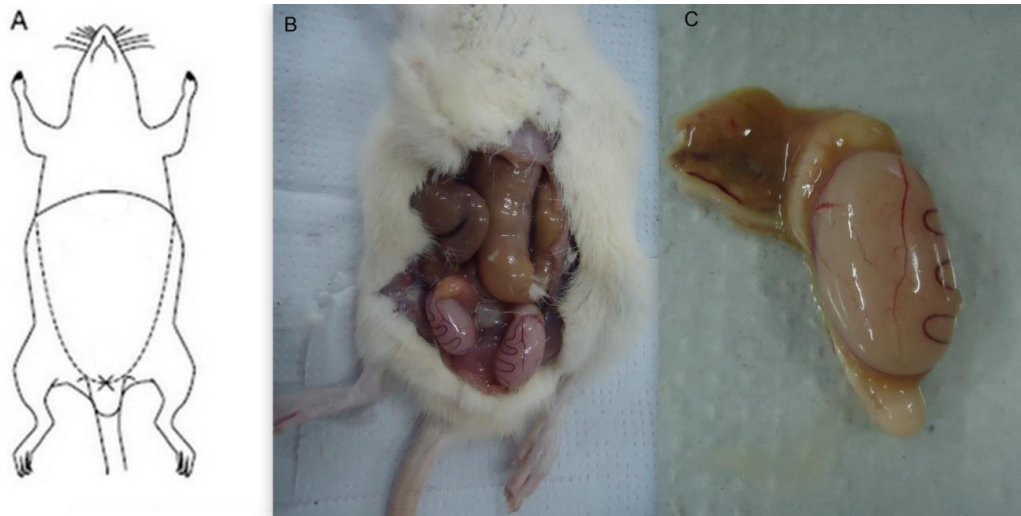
- Grupo 2: recebeu solução de fipronil na dosagem de 5 mg/kg de peso vivo (1/20 da DL50) dissolvido em DMSO mais salina via intraperitoneal e óleo de milho por gavagem gástrica.

- Grupo 3: recebeu solução de fipronil na dosagem de 5 mg/kg de peso vivo (1/20 da DL50) dissolvido em DMSO mais salina via intraperitoneal e vitamina E dissolvida em óleo de milho na dosagem de 100 mg/kg de peso vivo por gavagem gástrica.

Não foi realizado o grupo controle para a vitamina E, pois em estudo anterior realizado por Santana et al. (2015) foi observado que na mesma dose usada neste estudo, a Vitamina E não exerce efeito sobre os parâmetros reprodutivos e de estresse oxidativo no homogenato de testículos.

#### 4.4 Teste de fertilidade

Os ratos foram eutanasiados por decapitação após anestesia com éter, a pele da bolsa escrotal foi incisada e os órgãos sexuais de 6 animais de cada grupo foram removidos: testículos e epidídimo (Figura 4).



**Figura 4.** Representação esquemática a necropsia envolvida no isolamento de testículo e cauda do epidídimo. Incisão bilateral no abdômen do animal (A), visualização da cavidade abdominal, testículo com epidídimo (B). Fonte: Santana, 2014.

##### 4.4.1 Contagem de espermatozoides

De acordo com a metodologia de Elbetieha e Isa Das (2003), as caudas dos epidídimos de cada rato foram colocadas em 10 mL de solução salina normal (NaCl 0,9%) e refrigeradas durante a homogeneização. O macerado resultante de cada epidídimo foi acondicionado em tubos tipo “ependorff” individuais, sendo retirado um volume correspondente a 100  $\mu$ L do macerado. No tubo foi acrescido 900  $\mu$ L de solução de NaCl 0,9% chegando a um volume final de 1 mL. Desse volume foi realizada a contagem do número total de espermatozoides, sendo utilizada para tanto uma câmara de Neubauer, na qual foram contados 128 pequenos quadrados

(Figura 5). A contagem foi realizada em microscópio óptico com aumento de 40 vezes. O número de espermatozoides foi determinado por meio da seguinte fórmula:

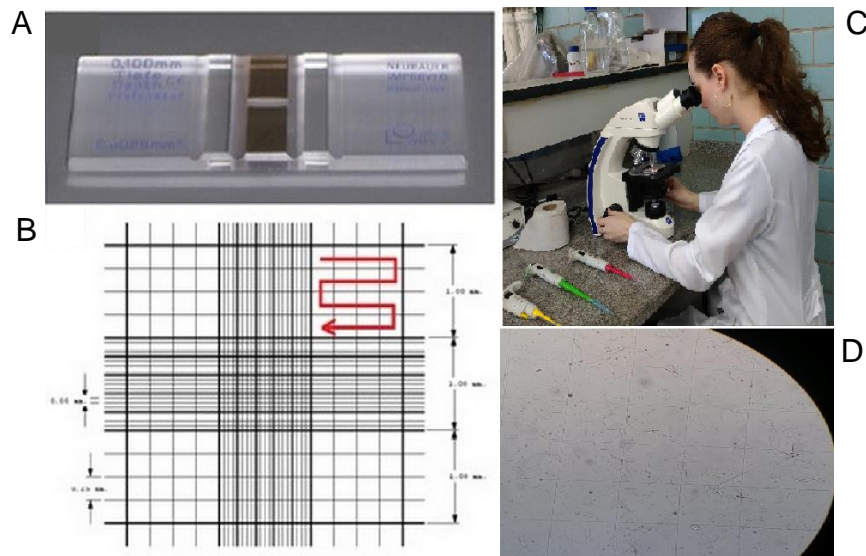
$$S = C \times FC \times V$$

S = Soma total por animal

C = Número de espermatozoides contados

FC = Fator da câmara (1,25)

V = Diluição ( $10^6$ )



**Figura 5.** Esquema simplificado da contagem de espermatozoides. Visão macroscópica da câmara de Neubauer (A), visão microscópica da organização dos quadrantes utilizados para a contagem dos espermatozoides (B), Microscópio óptico (C), Visão dos espermatozoides (D). Fonte: elaborado pelo autor.

## 4.5 Análise de parâmetros do estresse oxidativo no homogenato de testículo

### 4.5.1 Preparação do homogenato de testículo

O homogenato de testículo foi preparado de acordo com Amaral et al., 2008. Após a eutanásia, a túnica albugínea e os vasos principais dos testículos foram descartados, os testículos foram imersos em 25 mL de meio contendo sacarose 250 mM, EGTA 0,2 mM, EDTA 0,1 mM, HEPES-KOH 5 mM (pH 7,4) e BSA 0,1%, mantidos à 4°C e posteriormente recortados e homogeneizados com Potter-

Elvehjem. Para realização da dosagem de GPx e CAT o homogenato foi centrifugado a 8500 g por 10 min, sendo utilizado o sobrenadante (Figura 6).

A proteína do homogenato foi determinada utilizando-se a reação do biureto, de acordo com Cain e Skilleter (1987), utilizando BSA como padrão.



**Figura 6.** Representação do processo de homogeneização dos testículos. Retirada da túnica albugínea e principais vasos (A), testículo recortado em 25 mL de meio (B), homogeneização no homogeneizador tipo Potter-Elvehjem (C), centrifugação de uma porção do homogenato (D). Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.5.2 Concentração de glutathiona reduzida (GSH)

A determinação da concentração de GSH no homogenato de testículo foi realizada de acordo com Hissin e Hilf (1976). Em tubos tipo “ependorf” de 2 mL foi

colocado o homogenato (1 mg de proteína) e em seguida, adicionou-se meio contendo sacarose 125 mM, KCl, 65 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4 para completar 1 mL. Após uma leve homogeneização foram adicionados 500 µL de ácido tricloroacético 13%. A mistura foi agitada e centrifugada a 9000 g por 3 min. Em tubos de ensaio de 5 mL foram adicionados 1800 µL de tampão contendo  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M, pH 8,0, com EDTA 5 mM, 100 µL do sobrenadante obtido da centrifugação e 100 µL de OPT (o-ftalaldeído) 1 mg/mL. Em seguida os tubos foram agitados e mantidos por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Foi efetuada a leitura em espectrofluorímetro RFPC 5301 (Shimadzu, Japão) com comprimentos de onda de 350 e 420 nm para emissão e excitação, respectivamente, com abertura de fenda 3 em ambos os casos. A concentração de GSH foi calculada por meio de uma curva padrão (Figuras 6 e 7).



**Figura 7.** Aparelho Espectrofluorímetro modelo RFPC 5301.  
Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.5.3 Oxidação dos grupos tióis de proteínas

A concentração de grupos tióis (-SH) de proteínas foi determinada usando o reagente de Ellman de acordo com Sedlak & Lindsay (1968) com algumas modificações. Uma amostra do homogenato (5 mg de proteína) foi tratada com 1 mL

de ácido tricloroacético (TCA) a 5%, contendo EDTA 5 mM e submetida a centrifugação a 2500 g por 5 minutos. O precipitado protéico foi lavado duas vezes com a mesma solução de TCA-EDTA. As proteínas foram redissolvidas em 3 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4, contendo EDTA 5 mM e dodecil sulfato de sódio 0,5%. Alíquotas dessa solução foram tratadas com DTNB (concentração final 0,1 mM) dissolvido em 2 mL de tampão Tris-EDTA, pH 8,6. As amostras foram incubadas “no escuro” e a absorvância foi medida a 412 nm e os valores subtraídos de um “branco” obtido pelo tratamento das amostras com N-etilmaleimida 5 mM antes da reação com o DTNB. A concentração de grupos tióis foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . As leituras foram realizadas em espectrofotômetro DU 800 (Beckman-Coulter, EUA) (Figura 8).



**Figura 8.** Aparelho Espectrofotômetro modelo DU 800.  
Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.5.4 Peroxidação dos lipídeos de membrana

A peroxidação dos lipídios de membrana foi determinada no homogenato de testículo dos animais tratados e controle por meio da formação do malondialdeído (MDA), o qual reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (BUEGE; AUST, 1978). O homogenato (5 mg de proteína) foi colocado em tubo de ensaio e foram adicionados 0,2 mL de SDS 8,1% (p/v), 1,5 mL de ácido acético 20% (v/v), 1,5 mL de solução aquosa de TBA a 0,67% (p/v); em seguida o volume foi completado até 4 mL com água tipo Milli-Q e a mistura colocada em banho-maria a 95°C por 60 min. Após o período de incubação os tubos foram retirados e resfriados em banho de gelo e foi adicionado 1mL de água Milli-Q e o complexo MDA-TBA foi extraído com 5 mL de n-butanol. Em seguida os tubos foram centrifugados a 2000 g por 10 minutos, a parte orgânica foi coletada e a absorvância medida a 535 nm em espectrofotômetro NI 2000 UV (NOVA Instruments, Piracicaba, SP, Brasil) (Figura 9). A concentração do complexo MDA-TBA foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ .



**Figura 9.** Aparelho espectrofotômetro NI 2000 UV.  
Fonte: elaborado pelo autor.



#### **4.6 Parâmetros de estresse oxidativo avaliados no sobrenadante obtido a partir do homogenato de testículo**

Para realização da dosagem da atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), 1,5 mL do homogenato foi adicionado em tubo tipo “ependorf” de 2 mL, e essa amostra foi centrifugada a 8500 g por 10 min.

A proteína do sobrenadante foi determinada utilizando-se a reação do biureto, de acordo com Cain e Skilleter (1987), utilizando BSA como padrão.

##### **4.6.1 Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)**

A atividade da enzima GPx foi determinada por um método indireto baseado na oxidação da glutathiona reduzida (GSH) para glutathiona oxidada (GSSG) pela GPx e a consequente oxidação da NADPH pela glutathiona redutase a 30°C (FLOHÉ; GUNZLER, 1984). O sistema de reação foi composto de 1,5 mL contendo: GSH 1,0 mM, NADPH 0,2 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,25 mM, EDTA 0,5 mM e tampão fosfato de sódio 0,10 M (pH 7,6), triton X-100 0,1% e 50 µL do sobrenadante do homogenato de testículo. A atividade enzimática foi avaliada em espectrofotômetro DU 800 (Beckman-Coulter, EUA) no comprimento de onda de 340 nm e a oxidação de 1 µmol of NADPH/min foi usada como uma unidade de GPx. A atividade específica foi expressa como unidade por mg de proteína.

##### **4.6.2 Atividade das enzimas catalase (CAT)**

A avaliação da atividade da enzima catalase foi realizada com 50 µL do sobrenadante do homogenato de testículo em 1,75 mL de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7). A reação foi iniciada pela adição de 200 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM. A atividade da catalase foi definida como a quantidade da enzima requerida para decompor 1 nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto, a 25°C. A absorvância foi lida em espectrofotômetro DU 800 (Beckman-Coulter, EUA) a 230 nm. A atividade específica foi expressa como unidade por mg de proteína (AEBI; BERGMAYER, 1974).

#### **4.7 Análise Estatística**

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos e seis repetições por tratamento.

A significância estatística dos dados experimentais foi determinada pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, sendo considerados estatisticamente significantes resultados com valores de  $P < 0,05$ . As análises foram realizadas por meio do programa GraphPad Prism versão 4.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, EUA).

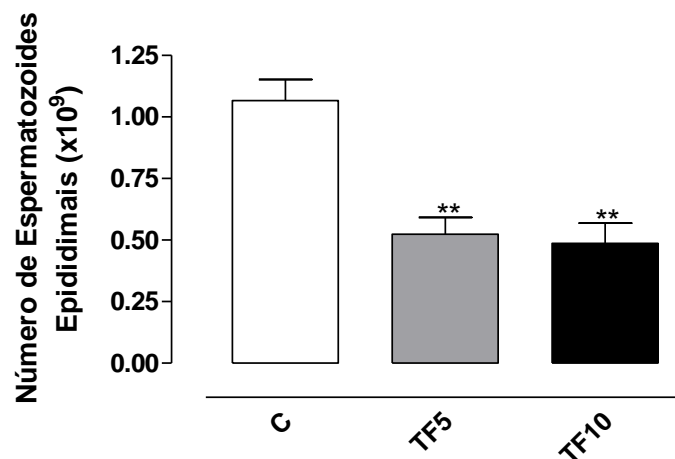
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Teste de Fertilidade

#### 5.1.1 Contagem de espermatozoides epididimais

##### Parâmetro para seleção da dose de fipronil

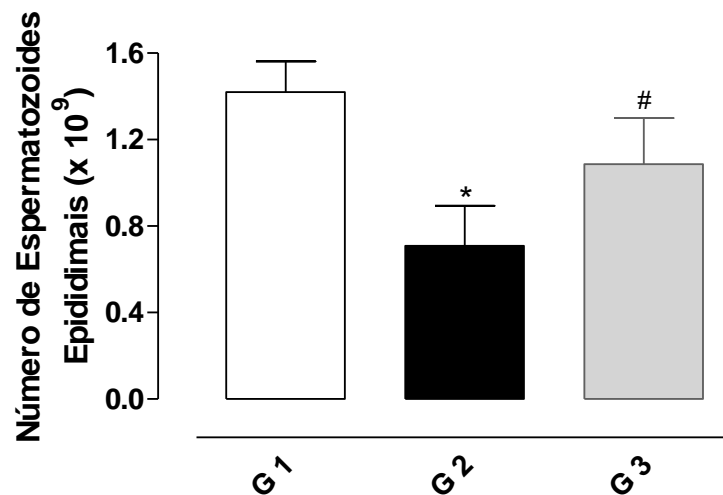
Inicialmente foram testadas duas concentrações de fipronil para a escolha da dose efetiva. Os tratamentos com fipronil 5 mg/kg de peso vivo (G2) e 10 mg/kg de peso vivo (G3) diminuíram significativamente a contagem de espermatozoides da cauda do epidídimo em relação ao grupo controle (G1), porém não houve diferença entre os grupos tratados, portanto para a continuação deste estudo, optou-se pela dose de 5 mg/kg de peso vivo do fipronil (Figura 10).



**Figura 10.** Efeito de diferentes doses do fipronil sobre a produção de espermatozoides. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. C = controle; TF5 = fipronil 5 mg/kg de peso vivo; TF10 = fipronil 10 mg/kg de peso vivo. \*\*Significativamente diferente do controle ( $P < 0,01$ ).

### 5.1.2 Avaliação do efeito do fipronil e proteção pela vitamina E

Após ter selecionado a dose de 5 mg/kg de peso vivo, foram realizados experimentos para avaliar o mecanismo de ação do fipronil e a atividade protetora da vitamina E. O tratamento com fipronil 5 mg/kg de peso vivo (G2) diminuiu significativamente a contagem de espermatozoides da cauda do epidídimo em relação ao controle (G1 e a vitamina E (G3) reestabeleceu a quantidade de espermatozoides para valores semelhantes ao grupo controle (Figura 11).



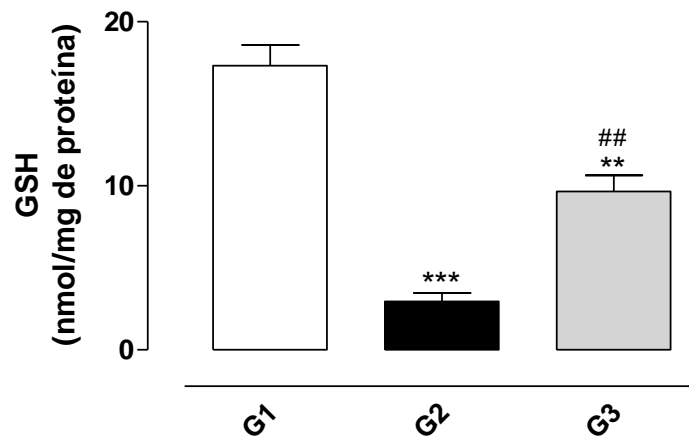
**Figura 11.** Efeito do fipronil sobre a produção de espermatozoides e ação protetora da vitamina E. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = fipronil 5 mg/kg de peso vivo; G3 = fipronil 5 mg/kg de peso vivo + vitamina E 100 mg/kg de peso vivo. \*Significamente diferente do controle (G1) ( $P < 0,05$ ). #Significamente diferente do tratado com fipronil (G2) ( $P < 0,05$ ).

## 5.2 Parâmetros do estresse oxidativo avaliados no homogenato de testículo

### 5.2.1 Concentração de glutathiona reduzida (GSH)

O tratamento dos animais com o fipronil (G2) promoveu uma redução significativa na concentração de GSH no homogenato de testículo (Figura 12). O

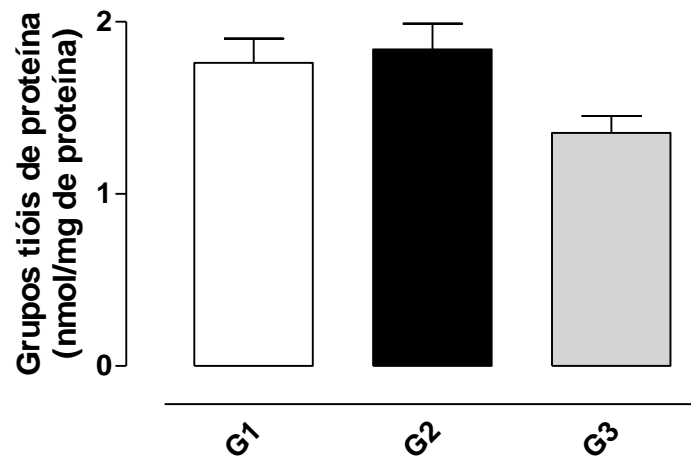
tratamento dos animais com a vitamina E (G3) protegeu parcialmente os testículos do efeito provocado pelo fipronil no estado oxidativo da glutathiona.



**Figura 12.** Efeito do fipronil sobre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) no homogenato de testículos de ratos e ação protetora da vitamina E. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = fipronil 5 mg/kg de peso vivo; G3 = fipronil 5 mg/kg de peso vivo + vitamina E 100 mg/kg de peso vivo. \*\*,\*Significativamente diferente do controle (G1) ( $P < 0,05$  e  $P < 0,001$ , respectivamente). ##Significativamente diferente do grupo fipronil (G2) ( $P < 0,01$ ).

### 5.2.2 Oxidação dos grupos tióis de proteína

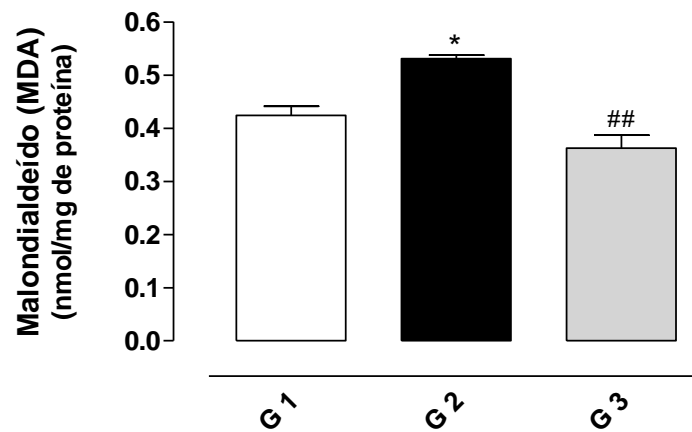
Não foi observada alteração significativa na concentração de grupos tióis de proteína nos animais tratados com fipronil (G2) em relação ao grupo controle (Figura 13).



**Figura 13.** Efeito do fipronil sobre a oxidação de grupos tióis de proteína no homogenato de testículos de rato e ação protetora da vitamina E. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = fipronil 5 mg/kg de peso vivo; G3 = fipronil 5 mg/kg de peso vivo + vitamina E 100 mg/kg de peso vivo.

### 5.2.3 Peroxidação dos lipídeos de membrana

A peroxidação dos lipídios de membrana foi avaliada por meio da dosagem do malondialdeído (MDA). Os resultados demonstraram que o tratamento com fipronil (G2) aumentou significativamente a concentração de MDA em relação ao grupo controle (G1). O tratamento concomitante com a vitamina E protegeu os lipídios da oxidação provocada pelo fipronil (Figura 14).

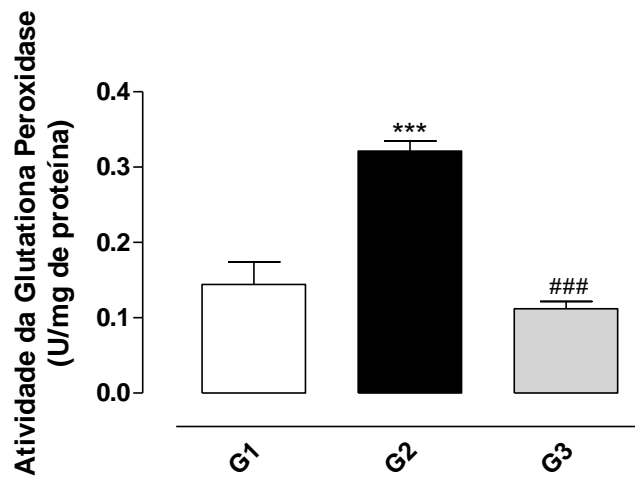


**Figura 14.** Efeito do fipronil sobre a produção de MDA no homogenato de testículos de ratos e ação protetora da vitamina E. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = fipronil 5 mg/kg de peso vivo; G3 = fipronil 5 mg/kg de peso vivo + vitamina E 100 mg/kg de peso vivo. \*Significantemente diferente do controle (G1) ( $P < 0,05$ ). ##Significantemente diferente do grupo fipronil (G2) ( $P < 0,01$ ).

### 5.3 Parâmetros de estresse oxidativo avaliados no sobrenadante obtido do homogenato de testículo

#### 5.3.1 Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)

Houve um aumento significativo na atividade da enzima GPx no grupo tratado com o fipronil (G2) em relação ao controle, e a vitamina E (G3) reduziu a atividade da enzima para valores próximos ao do grupo controle (Figura 15).

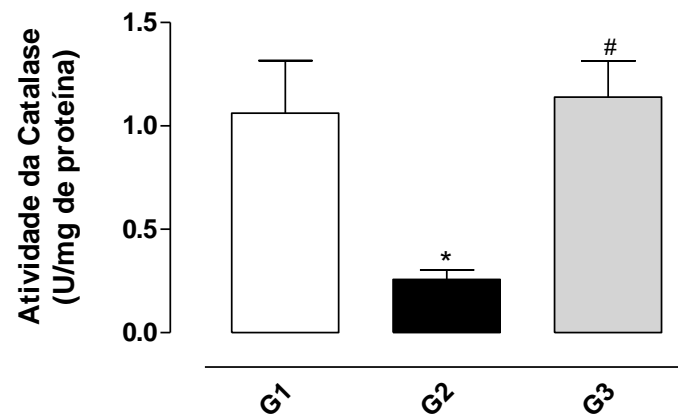


**Figura 15.** Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) no homogenato de testículos de rato e ação protetora da vitamina E. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = fipronil 5 mg/kg de peso vivo; G3 = fipronil 5 mg/kg de peso vivo + vitamina E 100 mg/kg de peso vivo. \*\*\*Significantemente diferente do controle (G1) ( $P < 0,001$ ). ###Significantemente diferente do grupo fipronil (G2) ( $P < 0,001$ ).

### 5.3.2 Atividade da enzima catalase

A atividade da enzima catalase (CAT) foi significativamente reduzida pelo fipronil (G2) e a vitamina E reestabeleceu a atividade da enzima para níveis similares ao do grupo controle (Figura 16).





**Figura 16:** Atividade da enzima da catalase (CAT) no homogenato de testículos de rato e ação protetora da vitamina E. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = fipronil 5 mg/kg de peso vivo; G3 = fipronil 5 mg/kg de peso vivo + vitamina E 100 mg/kg de peso vivo. \*Significantemente diferente do controle (G1) ( $P < 0,05$ ). #Significantemente diferente do grupo fipronil (G2) ( $P < 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do fipronil na fertilidade em ratos machos, o envolvimento do estresse oxidativo e o possível efeito protetor da vitamina E. O tratamento com fipronil 5 mg/kg de peso vivo levou à diminuição do número total de espermatozoides da cauda do epidídimo dos ratos, efeito esse revertido pelo tratamento dos animais com a vitamina E, indicando que uma atividade oxidante do fipronil pode estar envolvida.

Efeitos deletérios do fipronil sobre a fertilidade em fêmeas foram relatados na literatura (TINGLE et al., 2003; OHI et al., 2004; COX, 2005). Porém, existem poucos estudos que avaliam o seu efeito na fertilidade em machos (BARROS et al., 2016; KHALIL et al., 2017).

De acordo com Halliwell e Gutteridge, 2007, fisiologicamente, o organismo pode se defender da agressão mediada pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) utilizando-se das reservas de enzimas antioxidantes, entre elas a glutathiona peroxidase (GPx), a glutathiona redutase (GR) e a catalase (CAT). O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre ERO versus antioxidante pela diminuição dos níveis de GSH e o aumento da concentração da glutathiona oxidada (GSSG) e lipoperoxidação, ocorrendo a redução da atividade de enzimas antioxidantes: CAT, superóxido dismutase (SOD), GPx e GR (SIES, 1986).

No presente estudo, o tratamento com fipronil, resultou numa diminuição na concentração de GSH, sendo que o tratamento com a vitamina E, elevou a concentração deste tripeptídeo, mostrando efeito protetor. Estes resultados estão de acordo com o demonstrado por Mossa; Swelam; Mohafrasha (2015) que demonstraram redução na concentração de GSH no fígado e no rim de ratos tratados com fipronil na dose 10 mg/kg de peso corporal. Badgujar et al. (2015a) observaram uma diminuição na concentração de GSH no rim e cérebro de camundongos tratados com fipronil (5 e 10 mg/kg de peso corporal) e a vitamina E foi capaz de proteger contra o efeito oxidante do fipronil. Outro estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisadores com o fipronil nas doses 5 e 10 mg/kg, foi observada a diminuição na concentração de GSH no fígado de camundongos e também foi observado efeito protetor da vitamina E (BADGUJAR et al., 2015b).

A oxidação de proteínas decorre, principalmente, da ação dos radicais livres sobre o grupo tiol (-SH) da cisteína, causando também agregação e fragmentação de aminoácidos, o que leva à desnaturação proteica (ARKEZENOV; MARKESBERY, 2001; LEICHERT; JAKOB, 2004). Algumas das consequências da oxidação proteica são: a redução ou a inativação da atividade enzimática, o dano a receptores, vias de transdução de sinais e de transporte (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Neste estudo, o tratamento dos animais com fipronil não promoveu alteração na concentração de grupos tíois de proteínas indicando que o seu efeito sobre as enzimas não está relacionado com sua ação oxidante sobre este grupo.

Houve um aumento na formação de MDA no homogenato do testículo em relação ao grupo controle, entretanto o tratamento concomitante com a vitamina E protegeu lipídeos da oxidação provocada pelo fipronil. Esses resultados estão condizentes com Badgujar et al. (2015a) no qual o fipronil causou lipoperoxidação no rim e no cérebro de camundongos e Badgujar et al. (2015b), que observaram aumento na lipoperoxidação no fígado de camundongos, e ambos os estudos demonstraram a proteção pela vitamina E.

No estudo há relatos que o fipronil promoveu aumento na atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) no homogenato de testículo em comparação com o grupo controle, enquanto a vitamina E fez com que a atividade da enzima não se elevasse em relação aos níveis normais. A função biológica da GPx é reduzir o peróxido de hidrogênio formando água (RIBEIRO, 2005). O aumento da atividade da GPx encontrado neste estudo está em desacordo com o descrito por Mossa; Swelam; Mohafrasha (2015), que em análises realizadas no fígado e rim de ratos tratados com fipronil nas doses 0,1, 1,0 e 10 mg/kg de peso vivo, demonstraram uma diminuição na atividade da enzima GPx causada pela maior concentração do inseticida. Tal aumento na atividade de enzimas antioxidantes tem sido atribuído ao mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo, na tentativa de reparar o dano celular (EL-GENDY et al., 2010).

No presente estudo, houve diminuição na atividade da CAT no testículo dos ratos tratados com fipronil em relação ao controle, e a vitamina E teve ação protetora. Os resultados deste estudo estão de acordo com Badgujar et al. (2015a) que avaliaram o efeito do tratamento com fipronil nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg de

peso vivo no rim e no cérebro de camundongos, no qual observou-se uma redução na atividade da enzima na dose de 5 mg/kg e ainda, neste mesmo estudo a vitamina E reverteu o efeito do fipronil.

## 7 CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos neste estudo pode se concluir que:

- O fipronil diminuiu a produção de espermatozoides, podendo levar à infertilidade em ratos machos.
- O mecanismo de toxicidade do fipronil sobre os testículos de rato consiste na indução do estresse oxidativo.
- O tratamento dos animais com a vitamina E mostrou-se eficiente na prevenção dos danos causados pelo fipronil.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAJOUND, A.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1347-1352, 2003.

AEBI, H.; BERGMEYER, H. U. **Catalase in methods of enzymatic analysis**. 2. ed. New York: Academic Press, p. 673-684, 1974.

AITKEN, R. J.; BAKER M. A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, n. 1, p. 66-69, 2006.

AKIYAMA, M. In vivo scavenging effect of ethylcysteine on reactive oxygen species in human semen. **The Japanese Journal of Urology**, v. 90, n. 3, p. 421-428, 1999.

AMARAL, S.; MOTA, P; RODRIGUES, A. S.; MARTINS, L; OLIVEIRA, P. J.; RAMALHO-SANTOS, J. Testicular aging involves mitochondrial dysfunction as well as an increase in UCP2 levels and proton leak. **FEBS Letters**, v. 582, p. 491-496, 2008.

ARKEZENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, p. 141-145, 2001.

BADGUJAR, P. C., CHANDRATRE, G. A, PAWAR, N. N., TELANG, A. G., KURADE, N. P. Fipronil Induced Oxidative Stress Involves Alterations in SOD1 and Catalase Gene Expression in Male Mice Liver: Protection by Vitamins E and C. **Environmental Toxicology**, v. 31, p. 1033-1158, 2015a.

BADGUJAR, P. C., PAWAR, N. N., CHANDRATRE, G. A., TELANG, A. G., SHARMA, A. K. Fipronil induced oxidative stress in kidney and brain of mice: Protective effect of vitamin E and vitamin C. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 118, p. 10-18, 2015b.

BALL, B. A.; VO, A. Osmotix tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 1061-1069, 2001.

BARJA G. Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. **Rejuvenation Research**, v. 10, p. 215-223, 2007.

BARROS, A. L.; BAE JULIE H.; BORGES, C. S.; ROSE, J. L., CAVARIANI, M. M.; SILVA, P. V.; PINHEIRO, P. F. F.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; ARENA, A. C. Perinatal exposure to insecticide fipronil: effects on the reproductive system in male rats. **Reproduction, Fertility and Development**, 2016. doi: 10.1071/RD15517

BLIER, P. U.; DUFRESNE, F.; BURTON, R. S. Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. **Trends in Genetics**, v. 17, p. 400-406, 2001.

BLOOMQUIST, J. R. **Insecticides**: chemistries and characteristics. Flórida: [s.n.], 2015. Disponível em: <<http://ipmworld.umn.edu/bloomquist-insecticides>>. Acesso em: 01 fev. 2017.

BOARU, A., EL MAHDY, C. I., GEORGESCU, B. The effect of fipronil on some reproduction parameters of zebrafish (*Danio rerio*). **AACL Bioflux**, v. 6, n. 2, p. 71-73, 2013.

BOBÉ, A.; COSTE, C. M.; COOPER, J. F. Factors influencing the adsorption of fipronil on soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4861-4865, 1997.

BOBÉ, A.; COOPER, J. F.; COSTE, C. M.; MULLER, M. A. Behavior of Fipronil in Soil under Sahelian Plain Field Conditions. **Pesticide Science**, v. 52, p. 275-281, 1998a.

BOBÉ, A.; MEALLIER P.; COOPER J.; COSTE C. M. Kinetics and mechanisms of abiotic degradation of fipronil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2834-2839, 1998b.

BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; SLEBODZINSKI, A. B.; PIETRAS, B.; WIECZOREK, G. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. **Biological Trace Element Research**, v. 47, p. 69-74, 1995.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, p. 535-543, 1993.

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

CAIN, K.; SKILLETER, D. N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (eds.), **Biochemical Toxicology**, Oxford, IRL Press, p. 217-254, 1987.

CALAMERA, J. C.; FERNANDEZ, P. J.; BUFFONE, M. G.; ACOSTA, A. A.; DONCEL, G. F. Effect of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. **Andrologia**, v. 33, n. 2, p. 79-86, 2001.

CHANTON, P. F.; RAVANEL, P.; TISSUT, M.; MEYRAN, J. C. Toxicity and bioaccumulation of fipronil in the nontarget arthropodan fauna associated with

subalpine mosquito breeding. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 52, p. 8-12, 2001.

CHODOROWSKI, Z; ANAND, J. S. Accidental dermal and inhalation exposure with fipronil - a case report. **Journal Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 189-190, 2004.

COX, C. Fipronil. **Journal of Pesticide Reform**, v. 25, p. 10-15, 2005.

DANDEKAR, S. P. NADKARNI, G. D.; KULKARNI, V.S.; PUNEKAR, S. Lipid Peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 48, n. 3, p. 186-190, 2002.

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

DONNELLY, F. T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. F. M. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. **Fertility and Sterility**, v. 72, p. 484-486, 1999.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

ELBETIEHA, A.; ISA DAAS, S. Assessment of antifertility activities of abamectin pesticide in male rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, p. 307-313, 2003.

EL-GENDY, K. S., ALY, N. M., MAHMOUD, F. H., KENAWY, A., EL-SEBA, A. K. H.. The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 215-221, 2010.

EPA. **New pesticide fact sheet-fipronil**. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, EPA-737-F-96-005, May, 1996.

FLOHÉ, L.; GUNZLER W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 114-121, 1984.

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

GUELFY, M.; MAIOLI, M. A.; TAVARES, M. A.; MINGATTO, F. E. Cytotoxicity of fipronil on hepatocytes isolated from rat and effects of its biotransformation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 6, p. 843-853, 2015.

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



HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4.ed. Oxford: Oxford University Press, 2007. p. 704.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, v.74, p.214-226, 1976.

HONG, Z.; HAILING, L.; HUI, M.; GUIJIE, Z.; LEYAN, Y.; DUBING, Y. Effect of Vitamin E supplement in diet on antioxidant ability of testis in Boer goat. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 90-94, 2010.

HSU, P. C.; LIU, M. Y.; HSU, C. C.; CHEN, L.Y.; GUO, Y. L. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in rat sperm. **Toxicology**, v. 128, n. 3, p. 169-179, 1998.

IRVINE, D. S.; TWIGG, J. P.; GORDON, E. L.; FULTON, N.; MILNE, P. A.; AITKEN, R. J. I. DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 33-44, 2000.

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. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 44, n. 5, p. 301-303, 2002.

KHALIL, S. R.; AWAD, A.; MOHAMMED, H. H. Behavioral response and gene expression changes in fipronil-administered male Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Environmental Pollution**, v. 223, p. 51-61, 2017.

KODAMA, H.; YAMAGUCHI, R.; FUKUDA, J.; KASAI, H.; TANAKA, T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. **Fertility and Sterility**, v. 68, n. 3, p. 519-24, 1997.

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, n. 1-2, p. 38-44, 2009.

LEICHERT, L. I.; JAKOB, U. Protein thiol modifications visualised in vivo. **PLoS Biology**, v. 2, n. 11, e333, 2004.

MEDEIROS, H. C. D.; CONSTANTIN, J.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; MINGATTO, F. E. Effect of fipronil on energy metabolism in the perfused rat liver. **Toxicology Letters**, v. 236, p. 35-42, 2015.

MOHAMED, F.; SENARATHNA, L.; PERCY, A.; ABEYEWARDENE, M.; EAGLESHAM, G.; CHENG, R.; AZHER, S.; HITTARAGE, A.; DISSANAYAKE, W.; SHERIFF, M. H. R.; DAVIES, W.; BUCKLEY, N. A.; EDDLESTON, M. Acute human self-poisoning with the *N*-phenylpyrazole insecticide fipronil – a GABA<sub>A</sub>-gated chloride channel blocker. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 42, n. 7, p. 955-963, 2004.

MOSSA, A.T. H.; SWELAM, E. S.; MOHAFRASH, S. M.M. Sub-chronic exposure to fipronil induced oxidative stress, biochemical and histopathological changes in the liver and kidney of male albino rats. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 775-784, 2015.

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

ONG, C. N.; SHAN, A. M.; CHIA, S. E. Biomarkers for male reproductive health hazards: Are they available **Toxicology Letters**, v. 134, p. 17-30, 2002.

PAIM, F. **Controle seletivo do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1887)*, em bovinos criados em campo nativo, com uso de fipronil e avaliação de sua eficácia em Lages – SC**. 2010. 53f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, 2010.

PASQUALOTTO, F. F.; SHARMA, R. K.; NELSON, D. R.; THOMAS, A. J.; AGARWAL, A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. **Fertility and Sterility**, v. 73, n. 3, p. 459-464, 2000.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELUZIO, M. do C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p.133-149, 2005.

SANTANA, A. T. **Mecanismos da infertilidade causada por gossipol em ratos e efeito protetor da vitamina E**. 2014. 66 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Engenharia, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/115848>>. Acesso em: 30 ago. 2016

SANTANA, A. T.; GUELFY, M.; MEDEIROS, H. C. D.; TAVARES, M. A.; BIZERRA, P. F. V.; MINGATTO, F. E. Mechanisms involved in reproductive damage caused by gossypol in rats and protective effects of vitamin E. **Biological Research**, p.43-48, 2015. doi.org/10.1186/s40659-015-0026-7

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie**, v. 25, p. 1058-1071, 1986.

SURAI, P.; KOSTJUK, I.; WISHART, G.; MACPHERSON, A.; SPEAKE, B.; NOBLE, R.; IONOV, I.; KUTZ, E. Effect of Vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. **Biological Trace Element Research**, v. 64, n. 1-3, p. 119-132, 1998.

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. **Chemical Biological Interactions**, v. 147, p. 319-329, 2004.

TAVARES, M. A.; PALMA, I. D. F.; MEDEIROS, H. C. D.; GUELFY, M.; SANTANA, A. T.; MINGATTO, F. E. Comparative effects of fipronil and its metabolites sulfone and desulfinyl on the isolated rat liver mitochondria. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, p. 206-214, 2015.

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

VALENÇA, R. M. B.; GUERRA, M. M. P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 1, p. 47-53, 2007.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 216, p. 31-39, 2004.

WATSON, P. F.; The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

WEBSTER, M. Product warning: Frontline. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, p. 202, 1999.

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

WOUNG, W. Y.; THOMAS, C. M. G.; MERKUS, J. M. W. M.; ZIELHUIS, G. A.; Steegers-Theunissen, R. P. M. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. **Fertility and Sterility**, v. 73, n. 3, p. 435-442, 2000.

YOUSEF, M. I.; ABDALLAH, G. A.; KAMEL, K. I. Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. **Animal Reproduction Science**, v. 76, p. 99-111, 2003.

YUE, D.; YAN, L.; LUO, H.; XU, X.; JIN, X. Effect of Vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 217-222, 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. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 1, p. 192-201, 2004.