UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAMPUS DE ARAÇATUBA

EFEITOS DO FIPRONIL SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO NO FÍGADO PERFUNDIDO DE RATO

Hyllana Catarine Dias de Medeiros
Zootecnista

ARAÇATUBA – SP
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAMPUS DE ARAÇATUBA

EFEITOS DO FIPRONIL SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO NO FÍGADO PERFUNDIDO DE RATO

Hyllana Catarine Dias de Medeiros

Orientador: Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA - SP
2014

Catalogação na Publicação(CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Medeiros, Hyllana Catarine Dias de

M488e Efeitos do fipronil sobre o metabolismo energético no fígado de rato / Hyllana Catarine Dias de Medeiros. -- Araçatuba: [s.n], 2014.
62 f. il.; + CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2014.
Orientador: Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto

1. Glicogenólise. 2. Glicólise. 3.Gliconeogênese. 4. Inseticidas. 5. Metabolismo energético. T.

CDD 572.43

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Efeitos do fipronil sobre o metabolismo energético no fígado perfundido de rato.

AUTORA: HYLLANA CATARINE DIAS DE MEDEIROS

ORIENTADOR: Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.

Dra. KARINA SAYURI UTSUNOMIYA

Dra. GISELE FABRINO MACHADO

Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO

DATA DA REALIZAÇÃO: 7 de novembro de 2014.

Presidente da Comissão Examinadora
Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO
- Orientador -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

HYLLANA CATARINE DIAS DE MEDEIROS- nascida em Caicó (RN) no dia 6 de dezembro de 1987, ingressou no curso de bacharelado em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista – UNESP - Campus de Dracena (SP) em agosto de 2007, obtendo o grau de zootecnista em julho de 2012. Esteve envolvida em atividades de pesquisa desde o início da graduação, desenvolvendo-as no Laboratório de Bioquímica Metabólica e Toxicológica (LaBMeT), atuando principalmente nas áreas de Bioquímica Toxicológica e Metabolismo. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Ingressou no curso de Mestrado em Ciência Animal pela UNESP, Campus de Araçatuba (SP), em março de 2013 na área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica sob orientação do Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto, responsável pelas disciplinas de Bioquímica e Bioquímica Animal dos cursos de graduação em Engenharia Agronômica e Zootecnia, respectivamente. Ao longo do mestrado também foi bolsista FAPESP, concluindo o curso em novembro de 2014.

"A verdadeira viagem do descobrimento não consiste

em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos."

Marcel Proust

DEDICO:

A meus pais e irmãos.

Por serem os motivos do meu riso diário.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo seu amor incondicional, pela companhia, por sempre me guiar, pela alegria de viver, por minha família, pelo ar que respiro, pelos dons que me deu e por me permitir evoluir espiritualmente a cada minuto.

Ao meu orientador Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto. Agradeço por me permitir aprender tanto ao longo desses anos com sua paciência e dedicação. Seu exemplo foi fundamental para meu crescimento.

À Faculdade de Medicina Veterinária Campus de Araçatuba (FMVA) - UNESP e ao curso de pós-graduação em Ciência Animal.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do presente trabalho (Processo 2012/15135-6) e pela bolsa de mestrado concedida (Processo 2012/21869-2).

À equipe do LaBMeT, em especial ao Marcos Antonio Maioli, com quem tive a honra de poder trabalhar e aprender.

À equipe do Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade Estadual de Maringá (UEM), em especial à Aparecida Pinto Munhos Hermoso, técnica do laboratório, que me acompanhou durante a fase experimental. Trabalhando sozinha não seria possível desenvolver esse projeto.

Aos meus pais Rita de Cassia e Hildo e irmãos Pedro e Hyanna. O simples fato de existirem já me faz ser eternamente grata. Amo vocês.

Ao Darci F. Kroger Jr., por permanecer ao meu lado, sempre me apoiando e incentivando a trabalhar na pesquisa.

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS..... .12
1.1 O uso do fipronil..... 13
1.2 Funções metabólicas do fígado..... 16
1.3 Mitocôndria e função energética 18
1.4 O metabolismo dos carboidratos no fígado.....18
1.5 O metabolismo das proteínas no fígado.....22
1.6 Método da perfusão de fígado.....23
2 OBJETIVO..... 26
3 REFERÊNCIAS..... 26

CAPÍTULO 2 - O FIPRONIL INIBE O METABOLISMO ENERGÉTICO NO FÍGADO PERFUNDIDO DE RATO
RESUMO 35
1 INTRODUÇÃO 36
2 MATERIAL e MÉTODOS..... 37
2.1 Avaliação ética..... 37
2.2 Animais..... 38
2.3 Fipronil..... 38
2.4 Líquido de perfusão 38
2.5 Método de perfusão do fígado..... 39
2.6 Determinação dos parâmetros metabólicos 40
2.7 Análise estatística 40
3 RESULTADOS..... 41
3.1 Efeito do fipronil no fígado de ratos alimentados 41
3.2 Efeito do fipronil no fígado de ratos em jejum.....45
4 DISCUSSÃO..... 52
5 CONCLUSÃO 56
6 REFERÊNCIAS..... 56

EFEITOS DO FIPRONIL SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO NO FÍGADO PERFUNDIDO DE RATO

RESUMO - O fipronil é um inseticida utilizado para o controle de infestações parasitárias em animais e plantas. O seu mecanismo de ação ocorre por meio da inibição dos receptores do ácido γ-aminobutírico e dos canais de Cl^-. Em mamíferos, além do sistema nervoso central, outros órgãos podem ser afetados pelo tratamento com fipronil, dentre eles o fígado. O presente estudo objetivou caracterizar os efeitos do fipronil sobre o metabolismo hepático, por meio da técnica de perfusão isolada de fígado de rato. Foram avaliados parâmetros associados ao metabolismo de carboidratos no período pós-prandial e no jejum e também o metabolismo de aminoácidos no jejum. O fipronil foi infundido no fígado na faixa de concentrações de 10 a 50 µM. O consumo de oxigênio foi monitorado por polarografia e nas amostras do perfusado efluente foram quantificadas as produções de glicose, lactato, piruvato, ureia e amônia. Em animais alimentados, o fipronil inibiu o consumo de oxigênio. Houve aumento da liberação de glicose e lactato provenientes do catabolismo do glicogênio, indicando estímulo da glicogenólise e glicólise. No fígado de animais em jejum, o fipronil inibiu a produção de glicose e de ureia a partir da L-alanina, enquanto a produção de amônia e de lactato foi aumentada. Esses resultados revelam que o fipronil inibe os processos biossintéticos e estimula os processos compensatórios de geração de ATP (glicogenólise e glicólise). A inibição do consumo de oxigênio corrobora que uma ação inibitória sobre a atividade respiratória mitocondrial e, portanto, uma interferência sobre o metabolismo energético seja o mecanismo de ação citotóxica do fipronil.

Palavras-chave: glicogenólise, glicolise, gliconeogênese, inseticidas, metabolismo energético

EFFECTS OF FIPRONIL ON ENERGY METABOLISM IN THE PERFUSED RAT LIVER

SUMMARY - Fipronil is an insecticide used to control parasitic infestations in animals and plants. Its mechanism of action is through inhibition of receptor γ-aminobutyric acid and the Cl^- channel. In mammals, besides the central nervous system, other organs may be affected by treatment with fipronil, including the liver. The present study aimed to characterize the effects of fipronil on hepatic metabolism, through the technique of isolated perfused rat liver. Parameters related to carbohydrate metabolism in the postprandial and fasting period and also the aminoacids metabolism during fasting were evaluated. Fipronil was infused in the perfused livers in the concentration range of 10-50 μM. Oxygen consumption was monitored by polarography and in samples of effluent perfusate the production of glucose, lactate, pyruvate, urea and ammonia was quantified. In fed animals, fipronil inhibited the oxygen consumption significantly. There was increased release of glucose and lactate from the catabolism of glycogen, indicating stimulation of glycogenolysis and glycolysis. In the liver of fasted animals, fipronil inhibited the production of glucose and urea from exogenous $_L$-alanine, whereas the production of ammonia and lactate was increased. These results indicate that the fipronil inhibits biosynthetic processes (gluconeogenesis and ureagenesis) and stimulates compensatory processes of ATP formation (glycolysis and glycogenolysis). Inhibition of oxygen consumption corroborates the suggestion that an inhibitory effect on mitochondrial respiratory activity and therefore an interference with energy metabolism is the possible mechanism of cytotoxic action of fipronil.

Keywords: gluconeogenesis, glycogenolysis, glycolisis, insecticides, energetic metabolism

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

A necessidade de avanços na produção de alimentos deve atender à crescente demanda da população por mais quantidade e maior qualidade dos gêneros (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO, 2009). Em consequência disso, a busca de eficácia na produção agrícola justifica a grande expansão no consumo de agrotóxicos para a melhoria da produtividade e da qualidade dos alimentos (ANDEF, 2012). Em 2012 o mercado de praguicidas no Brasil movimentou US$ 9.710 bilhões (SINDAG, 2013). Noquadro geral, o mercado brasileiro de defensivos cresceu 190% nos últimos 10 anos, contra 93% do mercado mundial (PELAEZ et al., 2009).

Os praguicidas são biocidas por natureza, isto é, são venenos utilizados na agropecuária para eliminar formas de vida consideradas pragas agrícolas. Todos os agrotóxicos têm como propriedade comum, bloquear o metabolismo de organismos indesejáveis, para os quais são tóxicos (PEDRO, 2008). Estes químicos podem agir eliminando ou controlando algum processo vital, como, por exemplo, os processos reprodutivos (BAIRD, 2002). Nesse grupo de compostos químicos diversificado encontram-se os fungicidas, os inseticidas e os herbicidas.

A contaminação por praguicida em animais de produção desperta atenção, tendo em vista suas consequências para a saúde humana, causada por seu uso crescente e inadequado (BASTOS et al., 2011). Surtos de intoxicação em geral envolvem elevado número de mortes e tem sido descritos em bovinos (SANTOS et al., 2014), bubalinos (GRECCO et al., 2009) e ovinos (SOUZA et al., 1996). O método de aplicação, a espécie, o sexo e a idade dos animais afetados são fatores de risco relevantes para a ocorrência da intoxicação (SANTOS et al., 2014).

A presença de resíduos e contaminantes em produtos animais tais como carne, leite e ovos, pode ocorrer por diferentes fontes. A contaminação de pastos, rações, fontes de água e do ambiente, o uso de domissanitários nos

currais e estabelecimentos de produção, o pastejo de animais em áreas recentemente pulverizadas, o desvio do inseticida pelo vento, o reaproveitamento de embalagens de inseticidas vazias como bebedouros, o uso em animais de produtos que originalmente foram formulados para instalações, ou mesmo produtos destinados à veterinária, porém, em concentração excessiva (KAN; MEIJER, 2007; KAN, 2009).

Envenenamento por resíduos de praguicidas em altos níveis de concentração em alimentos é relativamente raro (SINITOX, 2010), mas o efeito acumulativo, oriundo desses resíduos presentes em baixas concentrações é responsável por diversos efeitos crônicos, efeitos esses que estão relacionados à possibilidade de associação entre exposição a praguicidas e doenças como câncer (JOBIM et al., 2010), endocrinopatias, neuropatias, entre outras (WAISSMANN, 2007).

É difícil alegar que os problemas provocados pelos praguicidas sejam decorrentes da sua utilização, e sim pelo uso inadequado, pois a rigidez e evolução da legislação e do sistema de registro garantem que os produtos colocados à disposição do usuário são seguros, quando bem utilizados Porém, a toxicidade dos praguicidas é variável e depende das propriedades dos ingredientes ativos e inertes do produto. (TAVELLA et al., 2011).

1.1 O uso do fipronil

O fipronil (RS)-5-amino-1-(2,6-dicloro-α,α,α-trifluoro-p-tolil)-4-trifluoro metilsulfinilpirazol-3-carbonitrila (Figura 1) foi lançado em 1993 como o primeiro inseticida fenilpirazol, sendo este um composto sintético produzido pela companhia Rhône-Poulenc Agro em 1987 (TINGLE et al., 2003). O grupamento CF_3 do fipronil na posição 4 (tri-fluor-metil-sulfinil-pirazol), confere a estrutura maior lipossolubilidade, alteração nas propriedades eletrônicas, no metabolismo, na efetividade e nos aspectos toxicológicos, quando comparado

a praguicidas da mesma classe como, por exemplo, ao etiprole (outro praguicida fenilpirazol), que tem C_2H_5 na posição 4 (CABONI et al., 2003).

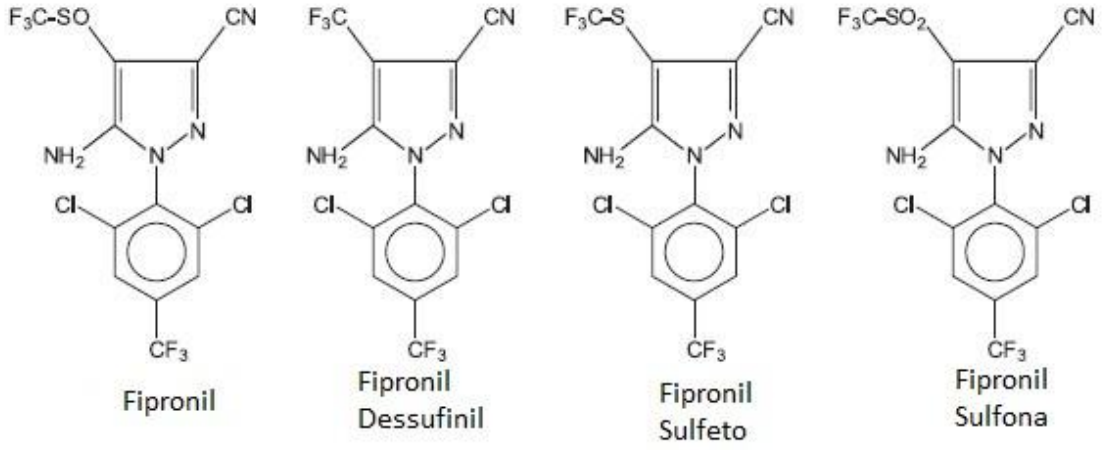

Figura 1. Estrutura química do fipronil e seus metabólitos. Adaptado de Kurz et al. (2013).

No Brasil, o início da utilização de fipronil foi registrado no ano 2000 em plantações da região Nordeste (MASUTTI; MERMUT, 2007). É amplamente utilizado como inseticida, formicida e cupinicida em plantações de soja, cana-de-açúcar, algodão, arroz, batata, cevada, feijão, milho, trigo e pastagens. Na veterinária, ele é usado contra pulgas, carrapatos e piolhos de cães, gatos e bovinos (AAJOUD et al., 2003; CHANTON et al., 2001). A ampla disseminação deste composto deve-se à sua eficácia no combate a insetos resistentes a outros pesticidas (BOBE et al., 1997). No Brasil pode ser encontrado como Frontline®, Fiprolex®, Topline® de uso veterinário para administração em cães, felinos, bovinos e também pode estar associado a outras moléculas como metoprene. O fipronil de uso agrícola é comercializado como Blitz®, Klap® e Regent®.

O fipronil é uma molécula extremamente ativa e um potente desregulador do sistema nervoso central. Sua toxicidade é atribuída à habilidade de agir no receptor do ácido γ-aminobutírico (GABA) como um

bloqueador não competitivo dos canais de Cl^- dos neurônios no sistema nervoso central, levando o organismo-alvo à morte por hiperexcitação neuronal e paralisia (HAINZL; CASIDA, 1996; HAINZL et al., 1998, ZHAO et al., 2004). O canal iônico de GABA é igualmente importante na transmissão nervosa em vertebrados e invertebrados e o fipronil se liga aos receptores GABA de ambos. Porém, a ligação da substância aos receptores GABA em insetos apresenta afinidade 100 vezes maior em relação aos receptores GABA de mamíferos, tornando a ligação menos firme que nos invertebrados e isso proporciona seletividade do fipronil (GRANT et al., 1990; ZHAO et al., 2005).

Apesar da menor toxicidade do fipronil para mamíferos, existem relatos de casos de intoxicação humana pelo praguicida. No Sri Lanka, um caso de intoxicação aguda após ingestão de elevada dose de fipronil acarretou em morte humana (MOHAMED et al., 2004). Chodorowski e Anand (2004) relataram um caso clínico descrevendo os sintomas induzidos por fipronil em pacientes, relatando dores de cabeça, sudorese, náuseas, vertigem e fraqueza. Em 11 estados dos EUA 103 casos foram identificados no intervalo entre 2001 e 2007. Em 2001 foram registrados 5 casos, passando para 30 em 2007. A maioria teve exposição ao inseticida em residência privada e grande parte envolveu o uso de produtos de cuidados para animais de estimação. As exposições ocorreram, geralmente, a partir de pulverização inadvertida, derramamento de produtos ou ventilação inadequada da área tratada (LEE, et al., 2010). Szegedi et al. (2005) sugeriram que o fipronil possui alguns efeitos sobre o sistema nervoso de mamíferos, mas estes são geralmente moderados e temporários. Embora várias investigações tentem esclarecer a toxicidade neuronal de fipronil em mamíferos, há poucos dados detalhados de efeitos fisiológicos (FUNG et al., 2003).

Além do SNC, outros órgãos podem ser afetados pelo tratamento com fipronil, dentre eles o fígado. Em estudo realizado por Silva (2008) avaliando os efeitos da exposição prolongada de ratos ao composto, foi observado tumefação das células hepáticas e aumento do peso do fígado em animais tratados com 10 mg/kg administrados via gavagem. Estudos crônicos incluindo

fipronil na alimentação de ratos mostraram a ocorrência de ansiedade, diminuição do ganho de peso, dos valores hematológicos, do consumo e eficiência na conversão alimentar. Promoveu alterações nos hormônios da tireóide, na bioquímica da urina e em parâmetros sanguíneos, como o colesterol, cálcio e proteína. Modificou também, características da necropsia dos animais (EPA, 1996).

De acordo com Leghait et al. (2009), o fipronil é oxidado no fígado formando principalmente o fipronil sulfona (Figura 1). Essa reação é catalisada pelas enzimas do CYP, sendo a isoforma 3A4 considerada a principal responsável (TANG et al., 2004). A produção de metabólitos é a principal via de eliminação do inseticida pelo fígado (CABONI et al., 2003; TANG et al., 2004). Uma vez na corrente sanguínea, o fipronil e seus metabólitos são amplamente difundidos, particularmente nos tecidos gordurosos, além de apresentarem alto nível de recirculação enterohepática (HAINZL; CASIDA, 1996; MOHAMED et al., 2004). O tratamento de animais com fipronil provoca a elevação na atividade do CYP, indicando a formação dos metabólitos (CABONI et al., 2003; DAS et al., 2006). Das et al. (2006) sugeriram que a formação do metabólito sulfona potencializaria a toxicidade do fipronil e que, ambos podem induzir a morte celular em culturas de hepatócitos humanos. Oliveira et al. (2012) avaliaram o fígado de camundongos após exposição a diferentes doses de fipronil (15, 25, e 50 mg/kg) e observaram alterações histológicas compatíveis a processos autofágicos, esteatose e morte celular por necrose.

1.2 Funções metabólicas do fígado

Devido à sua interposição entre o trato digestivo e a circulação geral do organismo, o fígado desempenha uma função central no metabolismo. Ele recebe grandes quantidades de nutrientes e xenobióticos que são absorvidos por meio do trato digestivo e veia porta. Entre as principais funções hepáticas estão a captação de aminoácidos, lipídios, carboidratos e vitaminas, com

subsequente armazenamento, conversão metabólica e liberação no sangue e bile. O fígado é também o principal órgão envolvido na biotransformação de substâncias exógenas (xenobióticos), com capacidade de converter compostos hidrofóbicos em hidrossolúveis, mais facilmente eliminados pelo organismo (GUILLOUZO, 1998).

A célula parenquimal (hepatócito) é a principal unidade funcional do órgão, constituindo 60% da população de células e 80% do volume total do fígado. A suspensão de hepatócitos ou o sistema de fígado em perfusão têm sido utilizados para estudar o metabolismo e a toxicidade de uma grande variedade de drogas e substâncias químicas (COLTURATO et al., 2012; CONSTANTIN et al., 2014; MAIOLI et al., 2013; MINGATTO et al., 2002; MINGATTO et al., 2008), uma vez que mantêm membranas intactas e têm altos níveis de várias enzimas do sistema de metabolismo de xenobióticos e seus cofatores sendo, portanto, úteis para o estudo da captação, alvos intracelulares e eventos que levam a danos celulares por substâncias químicas e seus metabólitos via biotransformação (MOLDÉUS, 1978).

Os diversos aspectos da lesão química ao fígado incluem a natureza dos agentes hepatotóxicos, a característica da lesão, o mecanismo para os efeitos hepatotóxicos, as circunstâncias de exposição e a importância médica e social. Algumas hepatotoxinas encontradas na natureza são produtos de plantas, metabolismo de fungos e bactérias ou são minerais (SCHOENTAL, 1963). Muitos agentes hepatotóxicos são produtos da indústria química ou farmacêutica (TOLMAN; SIRRINE, 1998; ZIMMERMAN, 1998). Outros ainda são subprodutos ou resíduos de materiais industriais que, por poluir o ambiente, podem ter acesso a humanos e animais. A lesão hepatotóxica pode ter várias formas. Alguns agentes levam à necrose, esteatose, cirrose ou carcinoma (SCHOENTAL, 1963; TOLMAN; SIRRINE, 1998; ZIMMERMAN, 1998). Outros levam apenas a interferências na secreção biliar e icterícia, com pequena ou nenhuma lesão evidente ao parênquima hepático (ROUILLER, 1964; ZIMMERMAN, 1998).

1.3 Mitocôndria e função energética

A mitocôndria é responsável pela síntese da quase totalidade do ATP necessário à manutenção da estrutura e função celular. A produção do ATP pelas mitocôndrias ocorre através do acoplamento do funcionamento da cadeia de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa. Os elétrons doados por substratos oxidáveis à cadeia respiratória na membrana mitocondrial interna, por meio de NADH ou $FADH_2$, são transferidos ao O_2 reduzindo-o a H_2O (respiração mitocondrial). A transferência dos elétrons das coenzimas NADH e $FADH_2$, ocorre por meio dos equivalentes redutores à NADH desidrogenase (Complexo I) e succinato desidrogenase (Complexo II), respectivamente. Os complexos I e II recebem e transferem os elétrons para a ubiquinona por meio de uma série de centros Fe-S, que por sua vez os transfere para a ubiquinona-citocromo c oxidorredutase (Complexo III), e este para a citocromo oxidase (Complexo IV) por meio do citocromo c, uma proteína que se localiza na face externa da membrana mitocondrial interna (NELSON; COX, 2014).

O fluxo de elétrons segue ao longo da cadeia respiratória resultando no bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna gerando um gradiente eletroquímico de H^+. A energia livre liberada no retorno do H^+ à matriz mitocondrial induz alteração conformacional no componente F1 da F1Fo- ATP sintase, liberando o ATP formado a partir de ADP e Pi em seus sítios catalíticos (MITCHELL, 1961; BOYER et al., 1973).

1.4 O metabolismo dos carboidratos no fígado

Em animais a glicose possui diferentes rotas metabólicas. Ela é oxidada de forma parcial ou completa, ou, pode também ser armazenada na forma de glicogênio, dependendo da necessidade do organismo (Figura 2).

No fígado, o transporte de glicose ocorre por transportadores GLUT2 os quais, de modo eficiente, mantêm a concentração de glicose no hepatócito na mesma proporção com que este nutriente existe na circulação sangüínea

(VOET et al., 2002). No entanto, a glicose só poderá ser utilizada pelo tecido hepático após ser fosforilada. A enzima responsável por essa reação, a glicoquinase, possui baixa afinidade pela glicose (NELSON; COX, 2014; VOET et al., 2002) assim, o fígado só irá fosforilar e garantir a permanência da glicose dentro das células hepáticas, uma vez que haja concentração suficientemente alta de glicose na circulação. Isso ocorre, porque o fígado pode usar outros substratos energéticos como ácidos graxos ou aminoácidos como fonte energética. Apesar da insulina não influenciar a captação de glicose nas células hepáticas, influencia profundamente sua utilização. A glicose só será utilizada pelo fígado como nutriente preferencial quando a razão insulina/glucagon for suficientemente alta para ativar a via glicolítica (NELSON; COX, 2014). O alto aporte de glicose somado a presença de insulina estimulam a síntese de glicogênio, e, neste momento, o fígado passa a ser um armazenador de glicose (VOET et al., 2002). Caso contrário, o fígado fará exatamente o oposto, será um exportador de glicose. No momento de jejum, quando houver predomínio do glucagon sobre a insulina, a glicogenólise é ativada e o fígado passará a exportar a glicose que havia armazenado sob a forma de glicogênio.

Como o glicogênio é uma reserva limitada e somente pode suprir a demanda de glicose no organismo por algumas horas, o fígado lança mão de outro recurso, a gliconeogênese (NELSON; COX, 2014). A gliconeogênese ocorre predominantemente no tecido hepático pelo estímulo do glucagon e é simultânea a glicogenólise hepática (NELSON; COX, 2014). Enquanto houver glicogênio, a velocidade da gliconeogênese é pequena, no entanto, esta via ocorrerá em velocidade máxima após a exaustão do glicogênio hepático (STRYER, 1996). É preciso lembrar que a gliconeogênese é uma síntese e, como toda síntese, é um processo que consome energia, sob a forma de ATP. Para cada molécula de glicose formada a partir de duas moléculas de piruvato são necessárias 6 moléculas de ATP. A síntese de glicose que ocorre no fígado durante períodos de jejum prolongados tem como principais precursores

aminoácidos, do glicerol, advindo da mobilização de triglicerídeos do tecido adiposo e do lactato (NELSON; COX, 2014).

A Figura 2 esquematiza de forma simplificada as possíveis vias metabólicas da glicose:

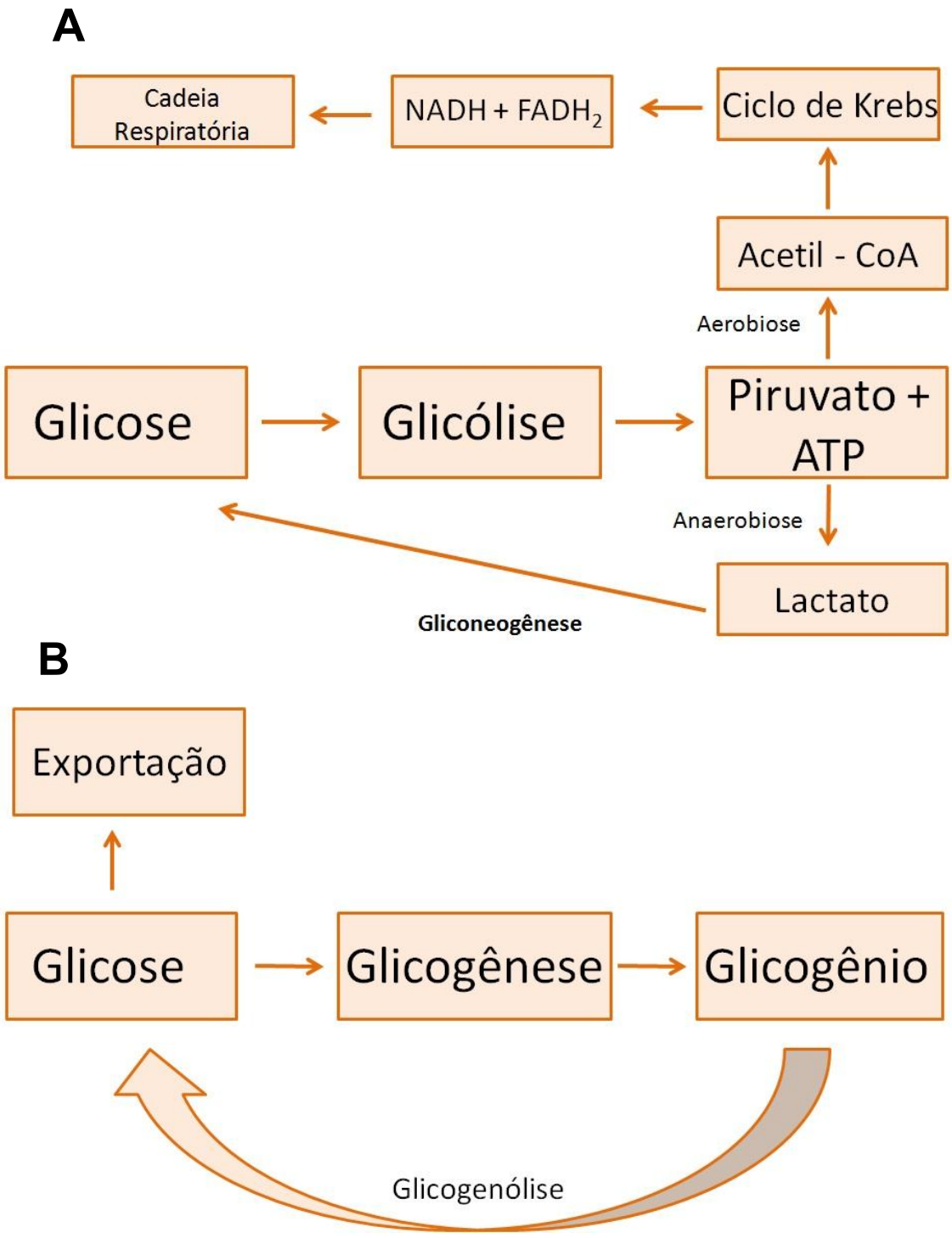

Figura 2. Esquema simplificado das vias metabólicas da glicose no fígado. A etapa "A" ilustra a síntese de ATP em anaerobiose, formando lactato, e em aerobiose, na qual ocorre oxidação completa da glicose a CO_2 e H_2O. Em jejum prolongado o lactato pode ser precursor da molécula de glicose a partir da glioneogênese. O esquema "B" mostra que a glicose em excesso é armazenada na forma de glicogênio (glicogênese) e que em período de jejum o glicogênio é degradado (gligogenólise).

1.5 O metabolismo das proteínas no fígado

Os aminoácidos que excedem as necessidades de síntese de proteínas ou de outras biomoléculas não podem ser armazenados e são excretados, ao contrário dos ácidos graxos e glicose. Eles são usados como fonte energética do metabolismo. A amina é removida e o esqueleto carbônico é transformado em um intermediário das principais vias metabólicas. O grupo amina em excesso é convertido em ureia, enquanto seus esqueletos carbônicos são transformados em acetil-CoA, acetoacetil-CoA, piruvato, ou em um dos intermediários do ciclo do ácido cítrico (Figura 3). Assim, podem se formar ácidos graxos, corpos cetônicos e glicose a partir de aminoácidos (NELSON; COX, 2014; STRYER,1996).

O figado é o principal órgão de degradação dos aminoácidos nos mamíferos terrestres. Nos seres humanos 90% do nitrogênio urinário está sob a forma de ureia, principal produto de excreção do metabolismo nitrogenado. A síntese de ureia consome 2 ATP e mais 1 ATP que é hidrolisado a AMP, dessa forma, considera-se um gasto de 2 ligações fosfato, consumindo, assim, quatro ligações fosfato ricas em energia por molécula de ureia sintetizada (MARZZOCO; TORRES, 2007; STRYER, 1996).

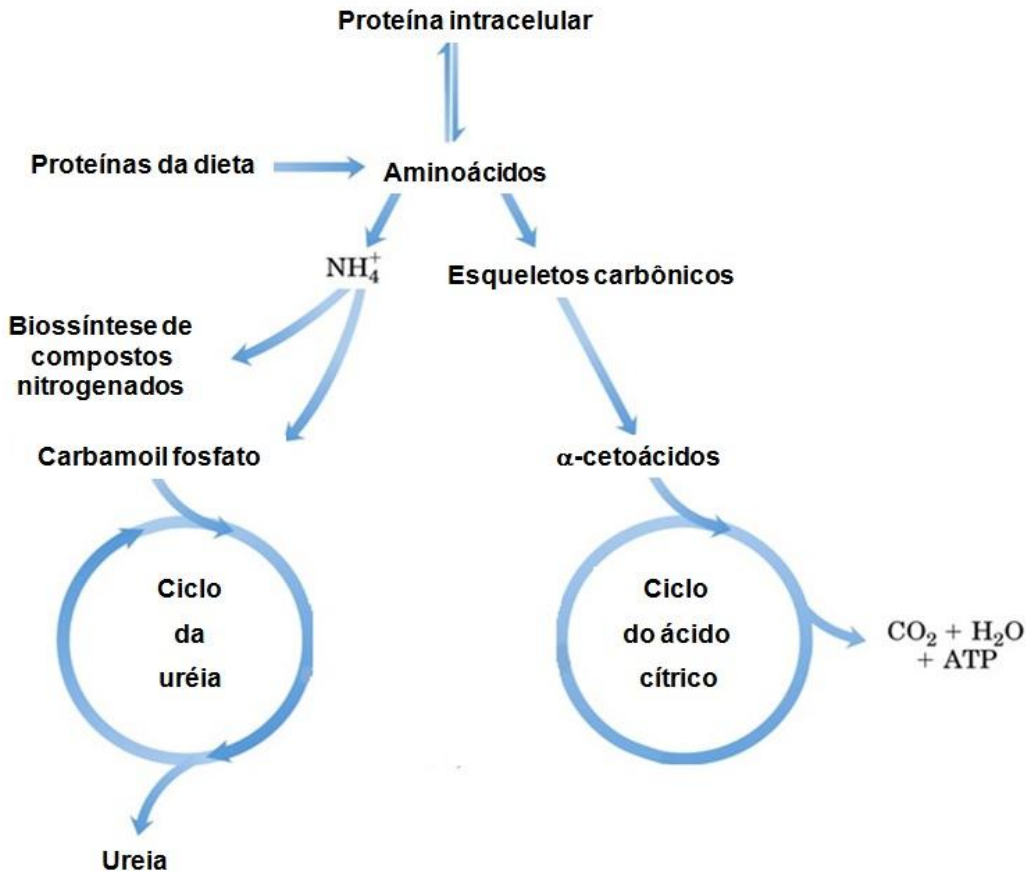

Figura 3. Esquema simplificado das vias metabólicas de aminoácidos (NELSON e COX, 2014).

1.6 Método de perfusão do fígado

A perfusão do fígado é uma técnica na qual os vasos aferentes (veia porta e artéria hepática) e vaso eferente (veia hepática) do órgão são canulados, de tal forma que o experimentador pode controlar a qualidade do líquido arterial e colher, para posterior análise, o líquido venoso. Podem ser utilizadas bombas, como observado na figura 4, para impulsionar o líquido de perfusão através do órgão ou a força da gravidade. A microcirculação e as relações intercelulares são, em geral, pouco alteradas (BRACHT et al., 2003). O grupo de Bucher e Scholz descreveu 1965 que é possível manter as funções

hepáticas com um sistema livre de hemoglobina, uma vez que se faz uso de oxigenadores eficientes, como, por exemplo, oxigenadores de membrana (BRACHT et al., 2003). Para o sucesso da técnica é necessário o uso do meio semissintético de perfusão. A solução mais utilizada é a descrita em 1932 por Krebs e Henseleit, onde a concentração de sais é muito próxima a do sangue, esta deve ser devidadente aquecida e saturada com oxigênio para que a integridade do órgão seja mantida (BRACHT et al., 2003).

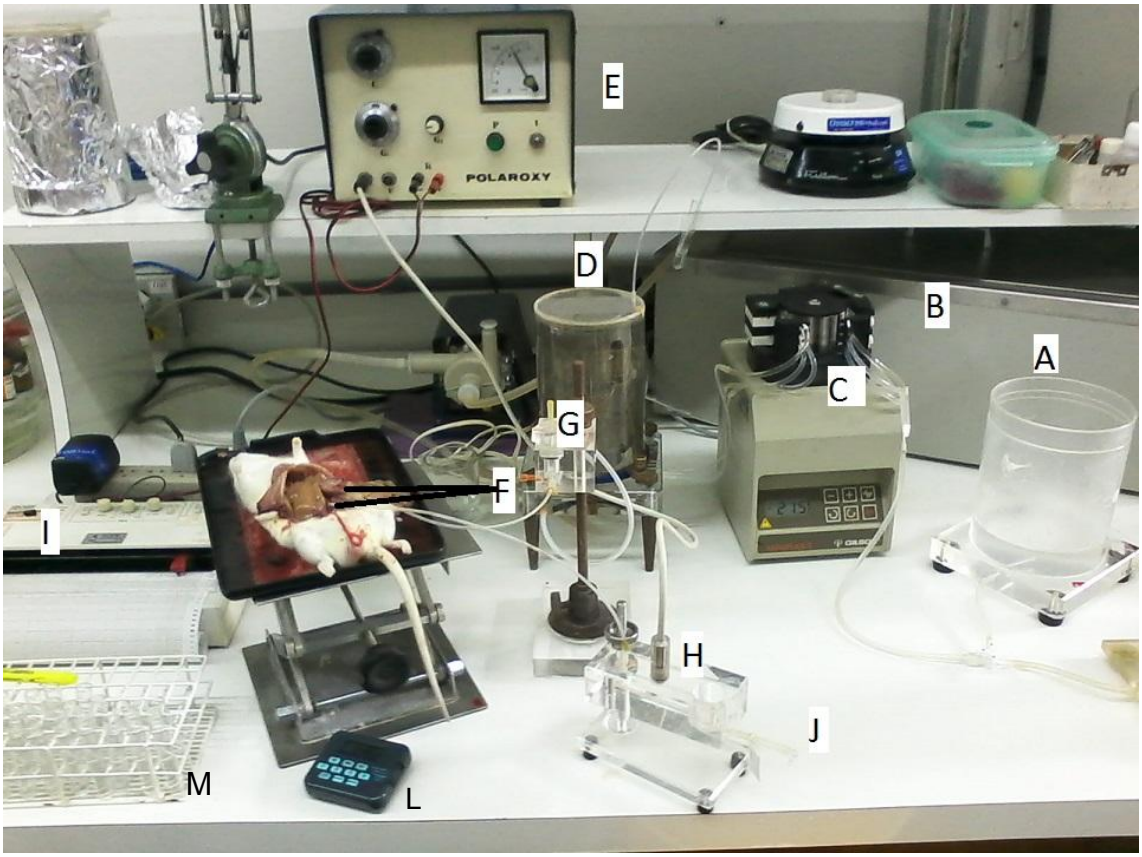

Figura 4. Imagem mostrando o sistema de perfusão do fígado. A sequência de letras indica o sentido do fluxo e os equipamentos responsáveis pela condução do liquido de perfusão até o fígado. (A) reservatório do líquido de perfusão, (B) banho termostatizado com bomba de circulação externa, conectado ao oxigenador, (C) bomba peristáltica para o líquido arterial, (D) oxigenador de membrana com aquecimento e troca simultânea de gases, (E) polarógrafo conectado ao registrador, (F) cânulas de entrada e saída do líquido de perfusão no fígado, (G) captador de bolhas (H) eletrodo de platina e prata (eletrodo de oxigênio), conectado ao polarógrafo, (I) registrador potenciométrico, (J) cânula para coleta para-fluxo (vazamento) do líquido de perfusão (L) cronômetro e (M) tubos de coleta do líquido de perfusão.

2 Objetivo

Estudar os efeitos do fipronil sobre o metabolismo energético em fígados perfundidos de ratos, com relação a parâmetros associados ao metabolismo de carboidratos e proteínas no fígado de ratos no período pós-prandial e no jejum, com o intuito de elucidar os mecanismos de ação tóxica da substância.

3 Referências

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

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DEFESA VEGETAL Resultados concretos da ciência inovadora. **ANDEF**, São Paulo, 2012. Disponível em: <http//www.andef.com.br/defensivos/índex.asp?cod=1> Acesso em: 28 ago. 2014.

BAIRD, C. **Química ambiental**, 1. ed. Porto Alegre: Boohman, 2002, p. 290.

BASTOS, L. H. P.; CARDOSO, M. H. W. M.; NÓBREGA, A. W.; JACOB, S. C. Possíveis fontes de contaminação do alimento leite, por agrotóxicos, e estudos de monitoramento de seus resíduos: uma revisão nacional. **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 19, n. 1, p. 51-60, 2011

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

BOYER, P. D.; CROSS, R. L.; MOMSEN, W. A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, p. 2837-2839, 1973.

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; KELMER-BRACHT A.M. O estudo do metabolismo no fígado em perfusão. In BRACHT, A., ISHII-IWAMOTO, E.L (Ed.), **Métodos de laboratório em bioquímica**, Barueri: Manole Ltda, 2003. p. 275-289.

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

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 of Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 189-190, 2004.

COLTURATO, C. P.; CONSTANTIN, R. P.; MAEDA JUNIOR, A. S.; CONSTANTIN, R. P.; YAMAMOTO, N. S.; BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; CONSTANTIN, J. Metabolic effects of silibinin in the rat liver. **Chemico-Biological Interact**, v. 195, p. 119-132, 2012.

CONSTANTIN, R. P.; CONSTANTIN, R. P.; BRACHT, A.; YAMAMOTO, N. S.; ISHII-IWAMOTO.; E. L.; CONSTANTIN, J. Molecular mechanisms of citrus flavanones on hepatic gluconeogenesis. **Fitoterapia**, v. 92, p. 148-162, 2014.

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

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.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. High level expert forum - How to feed the World in 2050. **Global agriculture towards 2050**: The challenge. Rome, 2009.

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

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

GRECCO, F. B.; SCHILD, A. L.; SOARES, M. P.; RAFII, M. B.; SALLIS, E. S. V.; DAMÉ, M. C. Intoxicação por organofosforados em búfalos *(Bubalus bubalis*) no Rio Grande do Sul**. Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 211-214, 2009.

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

HAINZL, D.; CASIDA J. E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 12746-12767, 1996.

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.

JOBIM, C. F. P.; NUNES, N. L.; GIUGLIANI, R.; CRUZ, M. B. I. Existe uma associação entre mortalidade por câncer e uso de agrotóxicos? Uma contribuição ao debate. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 1, p. 277-288, 2010.

KAN, A. C. Transfer of toxic substances from feed to food. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 423-431, 2009.

KAN, A. C.; MEIJER, L. A. G. The risk contamination of food with toxic substances present in animal feed. **Animal Feed Science and terminology**, v. 133, p. 84-108, 2007.

KURZ, M. H. S.; MARTEL, S.; GONÇALVES, F. F.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLAB, R.; ADAIME, M. B. Development of a Fast Method for the Determination of the Insecticide Fipronil and its Metabolites in Environmental Waters by SPE and GC-ECD. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 4, p. 631-638, 2013.

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. **Clinical Toxicology**, 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 n. 1-2, p. 38-44, 2009.

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

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. Metabolismo de Aminoácidos. In: Marzzoco, A., Torres, B.B. (Ed), **Bioquímica básica**, 3. ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2007. p. 213-240.

MASUTI, C. S. M.; MERMUT, A. R. Degradation of friponil under laboratory conditions in a tropical soil from Sirinhaém Pernambuco, Brazil. **Journal of Environmental Science and Health**, (part B). v. 42, p. 33-43. 2007.

MINGATTO, F. E.; MAIOLI, M. A.; BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. Effects of monocrotaline on energy metabolism in the rat liver. **Toxicology Letters**, v. 182, n. 1-3, p. 115-120. 2008.

MINGATTO, F. E. RODRIGUES, T.; PIGOSO, A. A.; UYEMURA, S. A.; CURTI, C.; SANTOS, A. C. The critical role of mitochondrial energetic impairment in the toxicity of nimesulide to hepatocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 2, p. 601-607, 2002.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. Nature, v. 191, p. 144-148, 1961.

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 $GABA_A$-gated chloride channel blocker. **Journal of Toxicology**, v. 42 n. 7, p. 955-963, 2004.

MOLDÉUS, P.; HÖGBERG, J.; ORRENIUS, S. Isolation and use of liver cells. In: FLEISCHER, S., PACKER, L. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 60-71, 1978.

NELSON, D. L.; COX M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger** 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 543-586, p. 695-742.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; OLIVEIRA, R. J.; MATHIAS, M. I. C. Cytotoxicity of fipronil on mice liver cells. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 28-35, 2012.

PEDRO, J. **Detecção da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, do inseticida fipronil no organismo teste *Allium cepa***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Intituto de Biociências, Rio Claro: UNESP, São Paulo, p. 117, 2008.

PELAEZ, V.; TERRA, F. H. B.; SILVA, L. R. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. In: XIV ENCONTRO NACIONAL DE ECONOMIA POLÍTICA. São Paulo, jun 2009 Disponível em: <htt://www.sep.org.br/artigo/1521_> Acesso em: 30 ago. 2014.

ROUILLER, C. H. Experimental toxic injury of the liver. In: ROUILLER C. H, (Ed). **The liver**. New York: Academic Press, 1964. v. 2, p. 335-476.

SANTOS, B. L.; MARCOLONGO- PEREIRA, C.; STIGGER, A. L.; COELHO, A. C. B.; SOARES, M. P.; SALLIS, E. S. V.; BARRETO, F.; SCHILD, A. L. Uso inadequado de organofosforados: uma prática de risco para bovinos no Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 7, p. 655-658, 2014.

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

SINITOX. Casos registrados de intoxicação e/ou envenenamento por agrotóxicos de uso agrícola. mar 2011. Disponível em: http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=399. Acesso em: 10 set. 2014.

SCHOENTAL, R. Liver Disease and "natural" hepatotoxins. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 29, p. 823-833, 1963.

SINDAG. Investimento em tecnologia produziu safra recorde. **Conexão Sindag**, v.42, p. 1-4. 2013.

STRYER, L. Degradação de aminoácidos e Cilo da Ureia. In: STRYER, L., (Ed), **Bioquímica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996. p. 597-615.

SOUZA, M. V.; GRAÇA, D. L.; FERRÃO, S. M. N.; CONTESINI, E. A. Regeneration of peripheral nerve fibres following haloxon-induced

degeneration. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 33, n. 4, p. 231-234, 1996.

SZEGEDI, V.; BÁRDOS, G.; DÉTÁRI, L.; TÓTH, A.; BANCZEROWSK-PELYHE, I.; VILAGI, I. Transient alterations in neuronal and behavioral activity following bensultap and fipronil treatment in rats. **Toxicology**, v. 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. **Chemico-Biological Interactions**, v. 147, p. 319-329, 2004.

TAVELLA, L. B.; SILVA, I. N.; FONTES, L. O.; DIAS, J. R. M.; SILVA, M. I. L. O uso de agrotóxicos na agricultura e suas consequências toxicológicas e ambientais. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 07, n. 2, p. 6-12, 2011.

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

TOLMAN, K. G.; SIRRINE, R. W. Occupational hepatotoxicity. **Clinics In Liver Disease**, v. 2, p. 563, 1998.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. Carboidratos. **Fundamentos de bioquímica**, 4 ed Porto Alegre: Artimed, 2002. p. 217-227.

WAISSMANN, W. Agrotóxicos e doenças não transmissíveis. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, p. 15-24, 2007.

ZHAO, X.; YEH, J. Z.; SALGADO, V. L.; NARAHASHI, T. Sulfone metabolite of fipronil blocks γ-aminobutyric acid and glutamate-acivated chloride channels in mammalian and insect neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, p. 363-373, 2005.

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. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 1, p. 192-201, 2004.

ZIMMERMAN, H. J. Drug-induced liver disease. In: SCHIFF, E.R., SORREL, M.F., MADDREY, W.C., (Ed). **Diseases of the liver**. Philadelphia: JB Lippincott, 1998. p. 973-1964.

CAPÍTULO 2 – EFEITOS DO FIPRONIL SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO NO FÍGADO PERFUNDIDO DE RATO

RESUMO - O fipronil é um inseticida utilizado para o controle de infestações parasitárias em animais e plantas. O seu mecanismo de ação ocorre por meio da inibição dos receptores do ácido γ-aminobutírico e dos canais de Cl^-. Em mamíferos, além do sistema nervoso central, outros órgãos podem ser afetados pelo tratamento com fipronil, dentre eles o fígado. O presente estudo objetivou caracterizar os efeitos do fipronil sobre o metabolismo hepático, por meio da técnica de perfusão isolada de fígado de rato. Foram avaliados parâmetros associados ao metabolismo de carboidratos no período pós-prandial e no jejum e também o metabolismo de aminoácidos no jejum. O fipronil foi infundido no fígado na faixa de concentrações de 10 a 50 µM. O consumo de oxigênio foi monitorado por polarografia e nas amostras do perfusado efluente foram quantificadas as produções de glicose, lactato, piruvato, ureia e amônia. Em animais alimentados, o fipronil inibiu o consumo de oxigênio. Houve aumento da liberação de glicose e lactato provenientes do catabolismo do glicogênio, indicando estímulo da glicogenólise e glicólise. No fígado de animais em jejum, o fipronil inibiu a produção de glicose e de ureia a partir da $_L$-alanina, enquanto a produção de amônia e de lactato foi aumentada. Esses resultados revelam que o fipronil inibe os processos biossintéticos e estimula os processos compensatórios de geração de ATP (glicogenólise e glicólise). A inibição do consumo de oxigênio corrobora que uma ação inibitória sobre a atividade respiratória mitocondrial e, portanto, uma interferência sobre o metabolismo energético seja o mecanismo de ação citotóxica do fipronil.

Palavras-chave: glicogenólise, glicolise, gliconeogênese, inseticidas, metabolismo energético.

1 Introdução

O fipronil [(RS)-5-amino-1-(2,6-dicloro-α,α,α-trifluoro-p-tolil)-4-trifluoro metilsulfinilpirazol-3-carbonitrila] pertence ao grupo químico dos fenilpirazóis de segunda geração e foi desenvolvido pela empresa Rhône-Poulenc Agro, em 1987 (TINGLE et al., 2003). É um inseticida de amplo-espectro de ação utilizado extensivamente para o controle de infestações parasitárias. Sua ação tóxica é devido à habilidade de agir como um bloqueador não competitivo dos canais de cloreto (Cl^-) acoplados aos receptores do ácido γ-aminobutírico (GABA), impedindo o influxo dos íons cloreto e, assim, interferindo na transmissão dos impulsos nervosos, levando o inseto à morte por hiperexcitação neuronal e paralisia (ZHAO, 2004).

A ligação da molécula do fipronil é mais forte nos canais de cloro dos insetos do que nos mamíferos, isso o torna um inseticida com toxicidade seletiva, ou seja, ele possui maior capacidade de bloquear a isoforma dos canais de Cl- do receptor GABA de insetos em relação aos vertebrados de modo geral, dessa forma, é considerado seguro, e, em consequência de sua baixa toxicidade, é amplamente utilizado na medicina veterinária (COUTINHO et al., 2005; HAINZL; CASIDA, 1996; HAINZL et al., 1998; GUNASEKARA; TROUNG, 2007). MOHAMED et al. (2004) e ZHAO et al. (2005), porém, indicam que o metabólito fipronil sulfona, resultante da biotransformação hepática do fipronil, por meio do citocromo P450, possui alta afinidade de ligação com os receptores GABA de seres humanos e camundongos.

Silva (2008), avaliando os efeitos da exposição prolongada de ratos ao inseticida, observou tumefação das células hepáticas e aumento do peso do fígado em animais tratados com 10 mg/kg administrados oralmente por gavagem. A dose utilizada corresponde a um décimo da DL50 em ratos, estabelecida por Hainzl e Casida (1996). 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 µM (PALMA et al., 2013).

O fígado é o órgão central no metabolismo, pois está interposto entre o trato digestivo e a circulação geral do organismo. Entre suas principais funções estão a captação de aminoácidos, lipídios, carboidratos e vitaminas, com subsequente armazenamento, conversão metabólica e liberação no sangue, além de produzir a bile. Ele é capaz, também, de acumular, biotransformar e inativar muitos xenobióticos, convertendo-os em substâncias hidrossolúveis, facilitando, assim, a eliminação destes pelo organismo (GUILLOUZO, 1998). No entanto, esse processo tem sido apontado como responsável pelos efeitos tóxicos de inúmeras substâncias químicas, visto que os metabólitos produzidos podem exercer atividades adversas ao organismo animal (IOANNIDES; LEWIS, 2004; MINGATTO et al., 2008).

Nesse sentido, em função da importância do fígado para o organismo animal e as evidências de que o fipronil exerce ação sobre mitocôndrias isoladas, o presente estudo foi planejado para investigar os efeitos do fipronil em fígado de rato em perfusão isolada, uma metodologia na qual a integridade estrutural e funcional do órgão é preservada. O fipronil foi infundido na faixa de concentração de 10 a 50 µM e no perfusado efluente foram avaliados diversos parâmetros relacionados ao metabolismo energético e de carboidratos, entre eles o consumo de oxigênio, a glicogenólise e glicólise no fígado de ratos alimentados e a gliconeogênese e ureogênese em fígado de ratos em jejum.

2 Material e Métodos

2.1 Avaliação ética

A Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Campus Experimental da UNESP de Dracena certificou que os procedimentos utilizando

animais estão de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” (Protocolo n°. 34/2012).

2.2 Animais

Ratos Wistar machos pesando entre 200 e 250 g foram mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá “UEM” – PR em número máximo de quatro animais por caixa, com cobertura metálica e serragem de madeira. As caixas plásticas, com dimensões (CxLxA) 41x34x16 cm, foram armazenadas sob temperatura controlada de aproximadamente 22ºC e os animais receberam alimento e água *ad libitum*, com uma dieta padronizada para animais de laboratório (Nuvilab®, Colombo, PR, Brasil). Em alguns protocolos experimentais os animais permaneceram em jejum de 24 horas antes da perfusão do fígado.

2.3 Fipronil

O fipronil foi gentilmente cedido pela empresa Ourofino Agronegócios (Cravinhos, SP, Brasil), contendo 96,6% de pureza, analisado por cromatografia de alta precisão. Considerando-se dados preliminares de testes realizados no laboratório, as doses selecionadas e empregadas nos experimentos *in vitro* foram de 10, 15, 25 e 50 µM baseadas em estudos realizados por Palma et al. (2013).

2.4 Líquido de Perfusão

O líquido de perfusão padrão utilizado foi o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (KREBS; HENSELEIT, 1932) com pH 7,6, saturado com a mistura de oxigênio: dióxido de carbono (95:5%), contendo albumina de soro bovino a 25 mg% (p/v). A composição salina do tampão foi: NaCl 115 mM; $NaHCO_3$ 25

mM; KCl 5,8 mM; Na_2SO_4 1,2 mM; $MgCl_2$ 1,18 mM; NaH_2PO_4 1,2 mM e $CaCl_2$ 1,3 mM.

2.5 Método de perfusão do fígado

Para o procedimento cirúrgico, os ratos foram anestesiados por injeção intraperitoneal de tiopental (50 mg/kg de peso vivo). A técnica cirúrgica utilizada foi a descrita por Scholz e Bücher, 1965. O abdômen foi aberto e o tecido conjuntivo que cerca o fígado seccionado. A veia esplênica foi fechada e a veia porta canulada sob fluxo. Com isso ocorre o completo dessangramento do fígado. Em seguida o tórax foi aberto, e para isso, o diafragma e as costelas foram cortados para exposição completa do coração, em seguida foi feito o fechamento da veia hepática por meio da veia cava superior. Dessa maneira, a veia hepática foi canulada por meio da veia cava inferior. O fígado permaneceu conectado ao animal (sistema de perfusão *in situ*), e o fluxo através do órgão foi ajustado para valores que permitiam oxigenação adequada (entre 4 e 5 mL por minuto, por grama de fígado), o que pode ser avaliado a partir da concentração venosa de oxigênio (nunca inferior a 0,2 mM).

O sistema de perfusão é composto de uma bomba peristáltica, um oxigenador de membrana e uma câmara para onde o efluente do fígado é conduzido, sendo que nesta está acoplado um microeletrodo de platina com polarógrafo, um registrador potenciométrico. Além disso, no sistema, existe um banho-maria com bomba de circulação externa do líquido, um cilindro contendo a mistura carbogênica (O_2:CO_2 / 95:5) e uma bomba de infusão. As partes essenciais deste sistema foram construídas nas oficinas da Universidade Estadual de Maringá. O fluido de perfusão é bombeado através do sistema de oxigenação com temperatura controlada (37^oC) antes de entrar no fígado via a cânula inserida na veia porta. O fluxo de perfusão deve ser mantido constante em cada procedimento experimental, sendo ajustado a 30 e 35 mL/min, dependendo do peso do fígado. Amostras do líquido perfundido foram

coletadas, após a etapa de padronização, em tempos específicos e analisados para a determinação de glicose, lactato e piruvato.

2.6 Determinação dos parâmetros metabólicos

Amostras do perfusado efluente foram coletadas a cada dois minutos e analisadas, utilizando procedimentos enzimáticos-padrão para a determinação de glicose (BERGMEYER; BERNT, 1974), lactato (GUTMAN; WAHLEFELD, 1974), piruvato (CZOK; LAMPRECHT, 1974), além de ureia (BERGMEYER, 1974) e amônia (KUN; KEARNEY, 1974) no caso dos animais em jejum. O consumo de oxigênio no meio de perfusão efluente foi monitorado continuamente com o auxílio de um eletrodo de platina blindado com Teflon adequadamente posicionado em uma câmara de acrílico como descrito por Scholz e Bücher (1965).

As taxas metabólicas foram calculadas a partir das diferenças entre o fluxo de entrada e saída do líquido e a taxa de fluxo total e foram expressas em relação ao peso do fígado.

2.7 Análise estatística

A significância estatística dos dados experimentais foi determinada pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Newman-Keuls, comparando o grupo tratado e controle e os resultados com valores de $p < 0,05$ considerados estatisticamente significantes. As análises foram realizadas aplicando o programa GraphPad Prism, versão 4.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, USA 03/04/2003).

3 Resultados

3.1 Efeito do fipronil sobre o catabolismo do glicogênio e consumo de oxigênio no fígado de ratos alimentados

O fígado foi perfundido com meio livre de substrato e de forma não-recirculante. Sob essas condições, a célula produz ATP principalmente à custa da oxidação dos ácidos graxos endógenos, mas, simultaneamente, exibe atividade glicogenolítica e glicolítica (SCHOLZ; BÜCHER, 1965), indicadas pela liberação de glicose, lactato e piruvato. A figura 1A mostra as alterações nos fluxos metabólicos causadas pelo fipronil 50 μM infundido durante 40 minutos. A liberação de glicose e produção de lactato tiveram aumento progressivo em função da presença do inseticida, atingiram um novo estado estacionário e, logo após a sua retirada, as taxas voltaram rapidamente à valores próximos aos basais. O consumo de oxigênio foi afetado de forma expressiva pela presença do fipronil, sendo inibido maximamente aos 30 minutos de infusão e, mesmo após a retirada do inseticida, a inibição se manteve estável por mais 10 minutos e, após, diminuiu progressivamente à níveis inferiores aos basais. Quanto ao piruvato, nenhuma alteração foi observada durante o período experimental. Ensaios como os mostrados na Figura 1A foram repetidos com diferentes concentrações de fipronil e estão resumidos na Figura 1B. Os valores controle (zero de fipronil) correspondem às taxas basais obtidas antes do início da infusão do fipronil (6 a 10 minutos de perfusão).

Os parâmetros relacionados à produção de piruvato não foram alterados em função do aumento da dose de fipronil. O consumo de oxigênio apresentou leve aumento nas concentrações 10 e 15 μM (5,9% e 5,3%, respectivamente) e nas concentrações 25 e 50 μM houve, contudo, significante queda no consumo de oxigênio (16,1% e 19,7%, respectivamente) em relação ao controle. Um comportamento diferente pode ser visto na produção de glicose, considerando-se que nas duas primeiras concentrações ocorreu decréscimo de 18,4% e 15%, respectivamente, e nas duas maiores concentrações de fipronil a

produção de glicose foi estimulada, chegando ao significante aumento de 103,3% quando o meio contendo 50 µM de fipronil foi infundido. A produção de lactato se comportou de forma dose dependente, porém, o aumento foi significante apenas nas concentrações 25 µM (83%) e 50 µM (156,5%) de fipronil.

A glicogenólise total (Figura 2) calculada por meio da equação: glicose liberada + ½ (lactato + piruvato) com base nos experimentos representados pela figura 1A, sendo esta, de acordo com Kimmig et al. (1983), uma boa forma de representação da atividade glicogenolítica sob as condições utilizadas no experimento. O gráfico estabelece um comparativo entre a série controle (ausência de fipronil) e as diferentes concentrações do fipronil no final de sua infusão (46 a 50 minutos do período experimental). Verifica-se que a taxa de liberação do glicogênio aumentou progressivamente de acordo com o aumento da concentração de fipronil. Os valores de aumento em relação ao controle foram de 0,53%, 12,5%, 32,5% e 157,6%, respectivamente, para as concentrações 10, 15, 25 e 50 µM.

A glicólise (Figura 2), também foi calculada a partir dos experimentos representados pela Figura 1A (lactato + piruvato), com as diferentes concentrações do fipronil. O gráfico compara o valor controle com os valores encontrados ao final da infusão com o fipronil (médias aos 46 a 50 minutos de perfusão). As taxas de glicólise também se comportam de forma dose dependente, ou seja, crescem de acordo com o aumento da concentração do fipronil, e são significativamente maiores que o controle em 15 µM (41%), 25 µM (56,2%) e 50 µM (181%).

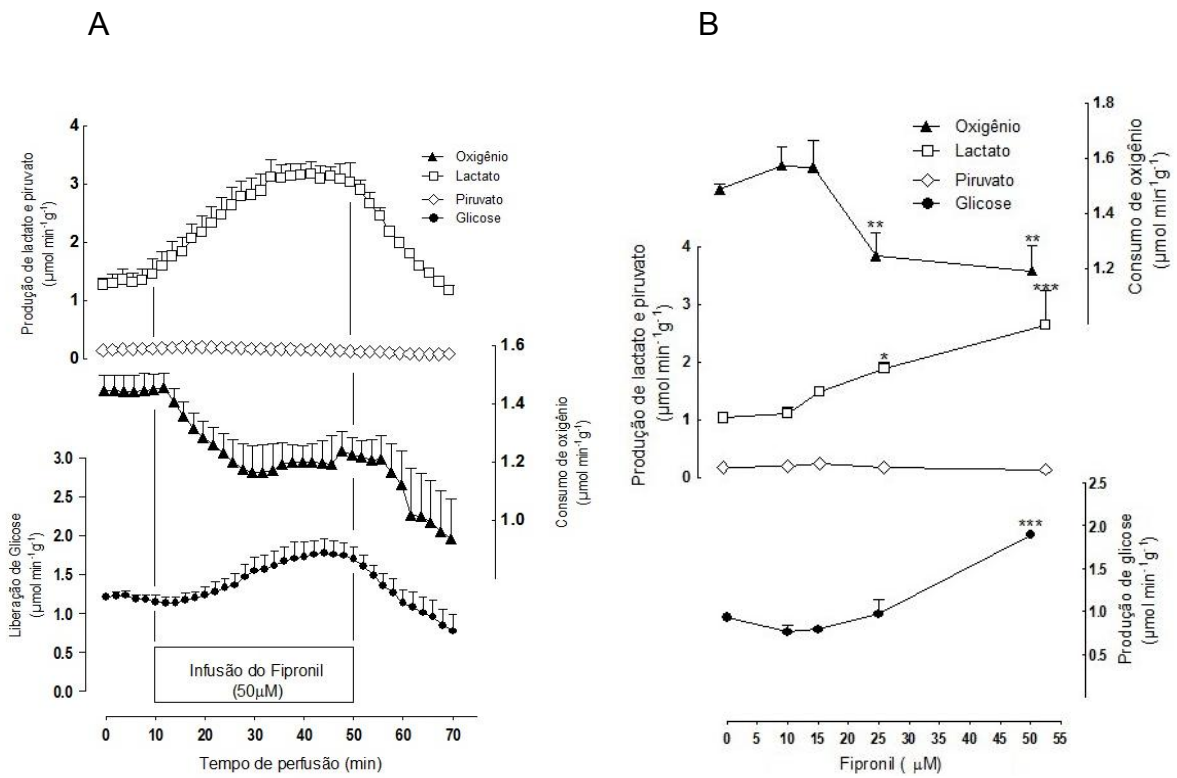

FIGURA 1- Efeito do fipronil sobre os fluxos metabólicos no fígado de ratos alimentados. Painel A: Período das alterações causadas pelo fipronil 50 µM na produção de glicose, lactato ou piruvato e consumo de oxigênio. O fipronil foi infundido dos 10 aos 50 minutos, como indicado nas barras horizontais. Amostras do efluente da perfusão foram coletadas para os experimentos metabólicos e o consumo de oxigênio foi monitorado polarograficamente. Painel B: Ação das diferentes concentrações do fipronil (10 a 50 µM) sobre o fígado após 40 minutos de perfusão. Os resultados representam a média dos valores ± EPM de 3 a 5 experimentos. Os asteriscos indicam a diferença estatística em comparação ao período controle (sem fipronil) com a análise de variância e pós-teste Newman-Keuls (**p<0,01 e *** p< 0,001).

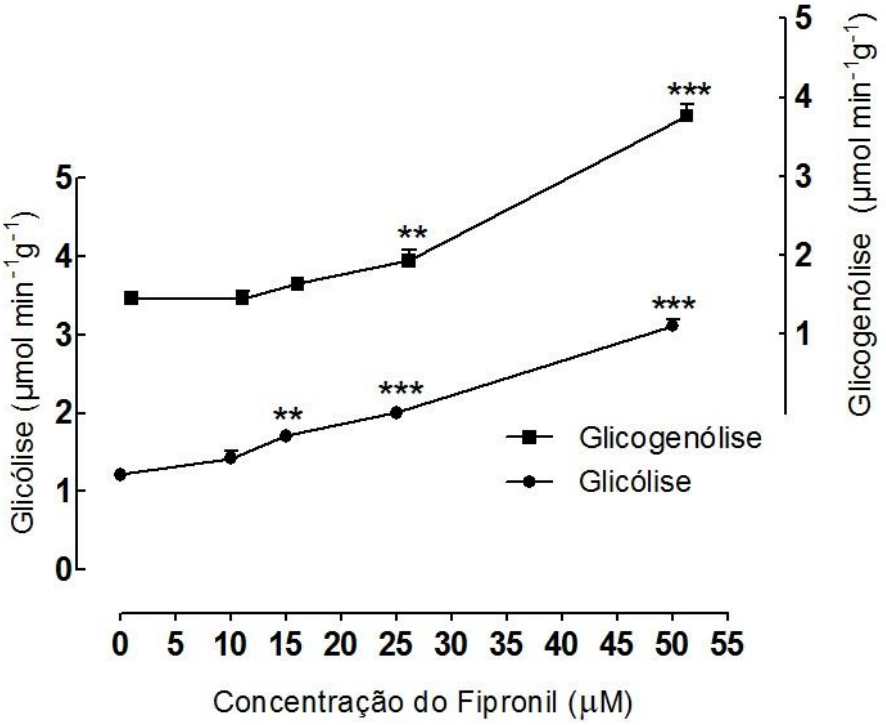

FIGURA 2- Efeito das diferentes concentrações do fipronil (10 a 50 µM) sobre a glicogenólise e glicólise no fígado de ratos alimentados após 40 minutos de perfusão. Os dados foram calculados com base nos experimentos apresentados na Figura 1A. Os resultados representam a média dos valores ± EPM de 3 a 5 experimentos. Os asteriscos indicam a diferença estatística em comparação ao período controle com a análise de variância e pós-teste Newman-Keuls (**p < 0,01 e ***p< 0,001).

3.2 Efeito do fipronil sobre a gliconeogênese, ciclo da ureia e consumo de oxigênio no fígado de ratos em jejum

Os experimentos relacionados à gliconeogênese, ciclo da ureia e consumo de oxigênio foram planejados para avaliar as ações do fipronil sobre processos biossintéticos dependentes de energia. O fígado de ratos submetidos ao jejum prévio de 24 h foi perfundido com $_{L}$-alanina, um substrato gliconeogênico, e com diferentes concentrações de fipronil (10 a 50 μM). A $_{L}$-alanina, foi infundida na concentração supra fisiológica de 2,5 mM. A escolha deste aminoácido se deu uma vez que a alanina, juntamente com a glutamina, são os aminoácidos encontrados em maior concentração nos fluídos corporais, em comparação aos demais aminoácidos (HOLECEK, 2011).

Os resultados referentes aos experimentos estão ilustrados na Figura 3A. Nesta série foi infundindo apenas o meio Krebs-Henseleit nos primeiros 10 minutos e, durante esse período, a quantidade de glicose, lactato e piruvato liberada foi muito pequena devido à baixa concentração do glicogênio hepático, resultante do período em jejum, onde todo o glicogênio hepático foi consumido. Após o período de pré-perfusão, foi infundida a $_{L}$-alanina na concentração de 2,5 mM até o final do período experimental, ou seja, durante 80 minutos. Um aumento considerável na produção de glicose, lactato e piruvato pode ser observado após a adição do aminoácido atingindo a estabilidade aos 10 minutos aproximadamente. A infusão de fipronil 50 μM a partir dos 30 minutos causou progressiva queda na concentração de glicose, diferentemente do piruvato que apresentou um pequeno aumento e do lactato, o qual teve um aumento considerável.

A Figura 3B permite uma avaliação do efeito das diferentes concentrações do fipronil sobre a produção da glicose, lactato e do piruvato. Os valores dos controles correspondem às taxas médias encontradas na presença de 2,5 mM de $_{L}$-alanina, antes da infusão de fipronil (6 a 10 minutos). Os resultados referentes ao fipronil foram representados em função das médias dos valores observados no final do período de sua infusão (66 a 70 minutos de

perfusão). A produção de glicose foi inibida significativamente já na menor concentração (10 µM) atingindo o efeito máximo inibitório na concentração 25 µM. A produção de piruvato aumentou com 10, 15 e 25 µM do inseticida (40,7%, 27,5% e 13,6%, respectivamente), porém, na concentração 50 µM houve uma queda significante na produção do metabólito (41,9%). Nas três primeiras concentrações do inseticida foram observados aumentos semelhantes na produção de lactato (19,9%, 28% e 24,2%, respectivamente), no entanto, na concentração 50 µM houve um aumento significante de 86% em relação ao controle.

A B

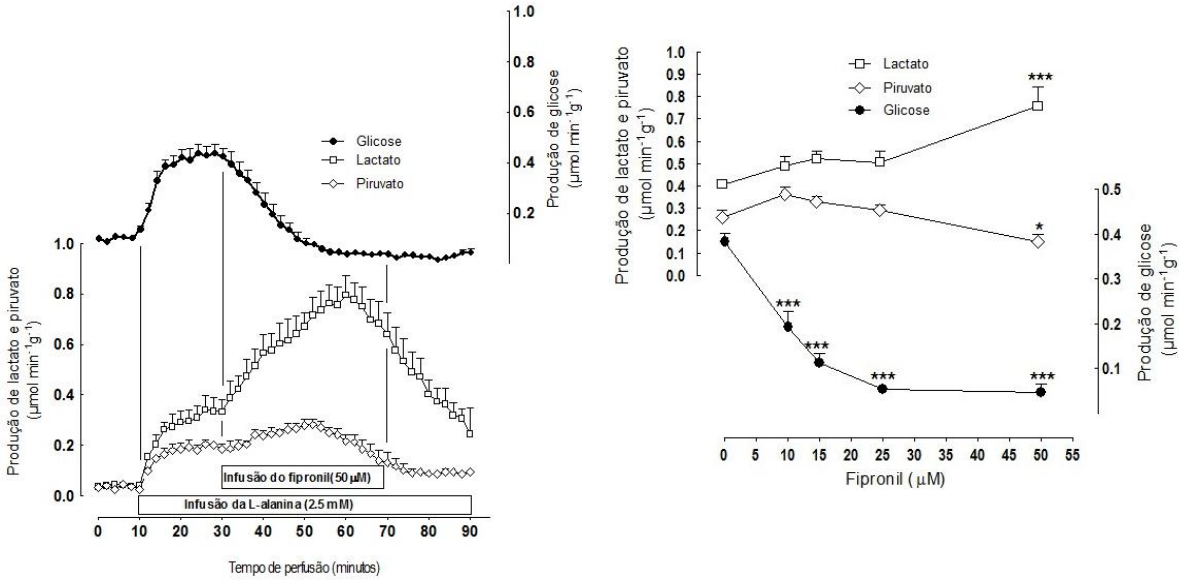

FIGURA 3- Efeito do fipronil sobre os fluxos metabólicos em fígados de ratos em jejum por 24 h. O fígado foi perfundido conforme descrito em Material e Métodos. Painel A: Período das alterações causadas pelo fipronil 50 µM na produção da glicose, lactato e piruvato. A L-alanina foi infundida entre 10 e 90 minutos e o fipronil entre 30 e 70 minutos, como indicado nas barras horizontais. Amostras do efluente da perfusão foram coletadas para os experimentos metabólicos. Painel B: Ação das diferentes concentrações do fipronil (10 a 50 µM) sobre o fígado após 40 minutos de perfusão. Os valores controle correspondem aos parâmetros encontrados na presença da L-alanine antes da infusão do fipronil. Os resultados representam a média dos valores ± EPM de 3 a 5 experimentos. Os asteriscos indicam a diferença estatística em comparação ao controle com a análise de variância e pós-teste Newman-Keuls (*p<0,05 e ***p<0,001).

A Figura 4A mostra as alterações no consumo de oxigênio, na produção de ureia e amônia no fígado de ratos em jejum submetidos à perfusão com o fipronil 50 µM. Os valores controle correspondem às médias das taxas na presença da $_{L}$-alanina antes da infusão do fipronil (26 a 30 minutos de perfusão). Na ausência de substrato exógeno (10 primeiros minutos), a produção de amônia e ureia foi praticamente nula. Após o início da infusão do substrato ($_{L}$-alanina) o consumo de oxigênio e a produção de ureia aumentaram progressivamente e atingiram a estabilidade aos 25 minutos, enquanto a produção de amônia teve um aumento imediato, porém, mantendo-se constante até a introdução do fipronil. Na presença do inseticida, tanto a produção de ureia quanto o consumo de oxigênio foram reduzidos. No entanto, aos 20 minutos após a infusão do fipronil, o consumo de oxigênio voltou a subir chegando a valores próximos do controle em aproximadamente 70 minutos de perfusão. A produção de amônia aumentou lentamente nos primeiros 20 minutos de infusão do fipronil seguindo de forma acelerada após esse período.

A Figura 4B mostra a ação das diferentes concentrações do fipronil (10 a 50 µM) infundido em experimentos iguais aos ilustrados na Figura 4A. A introdução do fipronil inibiu significativamente a produção de ureia de maneira dose dependente (26,4%, 52,7%, 70,9% e 86,6%, respectivamente para as concentrações 10, 15, 25 e 50 µM). A produção de amônia aumentou significativamente, também de forma dose dependente, representando um aumento de 147% na menor concentração e de 297% na maior concentração do inseticida. O consumo de oxigênio foi inibido significativamente apenas nas concentrações 15 e 25 µM de fipronil (29,4% e 25,1%, respectivamente).

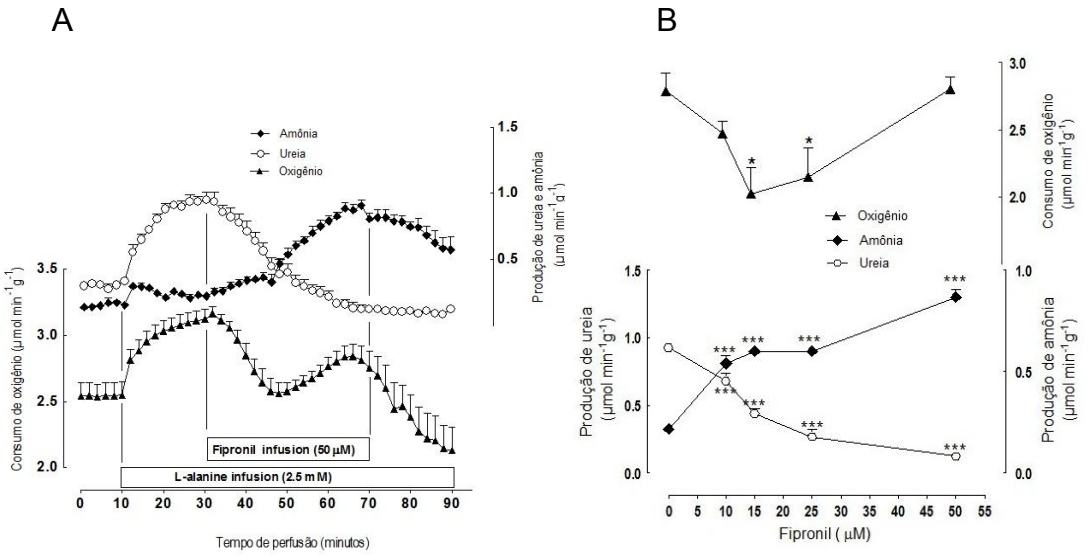

FIGURA 4- Efeito do fipronil sobre os fluxos metabólicos no fígado de ratos em jejum por 24 h. O fígado for perfundido conforme descrito em Material e Métodos. Painel A: Período das alterações causadas pelo fipronil 50 µM na produção da amônia, ureia e no consumo do oxigênio. A L-alanina foi infundida no período entre 10 e 90 minutos e o fipronil dos 30 aos 70 minutos, como indicado nas barras horizontais. Amostras do efluente da perfusão foram coletadas para as determinações metabólicas e o consumo de oxigênio foi monitorado polarograficamente. Painel B: Ação das diferentes concentrações do fipronil (10 a 50 µM) sobre o fígado após 40 minutos de perfusão. Os valores controle correspondem aos parâmetros encontrados na presença da L-alanina antes da infusão do fipronil. Os resultados representam a média dos valores ± EPM de 3 a 5 experimentos. Os asteriscos indicam a diferença estatística em comparação ao controle com a análise de variância e pós-teste Newman-Keuls (*p<0,05 e ***p<0,001).

A Figura 5 indica os resultados da média de quatro experimentos para avaliar a gliconeogênese, estes foram semelhantes aos ilustrados nas figuras 3A e 4A, porém, com diferentes concentrações de fipronil (10, 15, 25 e 50 μM). A infusão do inseticida provocou inibição significante, de forma dose dependente, na liberação de glicose já a partir da menor concentração. O consumo de oxigênio foi inibido de forma significativa apenas nas concentrações intermediárias.

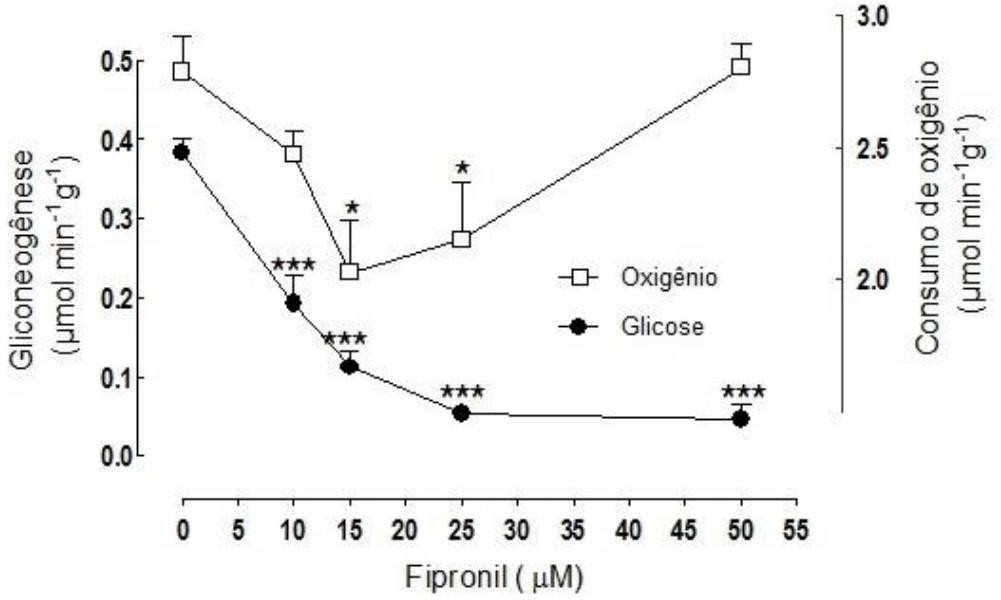

FIGURA 5- Efeito das diferentes concentrações de fipronil na gliconeogênese a partir da $_{L}$-alanina e no consumo de oxigênio no fígado de ratos em jejum. Os dados foram obtidos a partir dos experimentos ilustrados nas Figuras 3 e 4. Os controles correspondem aos valores encontrados na presença da $_{L}$-alanina antes do início da infusão do fipronil (aos 30 minutos de perfusão). As taxas na presença do fipronil foram avaliadas aos 70 minutos de perfusão. Cada ponto de referência representa a média dos valores ± EPM de 3 a 5 experimentos. Os asteriscos indicam significância estatística em comparação com a condição controle, como revelada pela análise de variância e pós-teste Newman-Keuls (*$p<0,05$ e ***$p<0,001$).

4 Discussão

Os resultados apresentados neste estudo mostram os que o fipronil altera vários fluxos metabólicos do fígado relacionados ao metabolismo de carboidratos e de aminoácidos. O composto ativou a glicogenólise (produção de glicose) e a glicólise (produção de lactato mais piruvato) no fígado de animais alimentados e inibiu a gliconeogênese (produção de glicose a partir de L-alanina) e a ureagênese (produção de ureia) nos animais em jejum. A redução do consumo de oxigênio observada em paralelo durante a infusão do fipronil é um forte indicador de que a velocidade do fluxo de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial foi reduzida, comprometendo, assim, a fosforilação do ADP e todos os processos celulares dependentes de energia como a gliconeogênese e ureagênese (COLTURATO et al., 2012). Por outro lado, o aumento significativo da produção de lactato a partir da glicose (glicólise), bem como da glicogenólise em fígados de animais alimentados são respostas características do chamado efeito Pasteur, o qual consiste no aumento da glicólise anaeróbica para gerar ATP e aumentar de forma compensatória o aporte energético quando a fosforilação oxidativa mitocondrial está reduzida (DICKMAN; MANDEL, 1990; WILLIAMS et al., 2007).

Esses resultados indicam que o efeito do fipronil em mitocôndrias isoladas, relatado por Palma et al. (2013), de inibição do complexo I da cadeia respiratória também manifesta-se no órgão intacto. Inibidores clássicos da cadeia respiratória como o KCN ou antimicina quando infundidos no fígado em perfusão exercem inibição da respiração, estímulo da glicogenólise e da glicólise e inibição da gliconeogênese e ureagênese (CONSTANTIN et al., 1995; PAGADIGORRIA et al., 1996; YOUNES; STRUBELT, 1988). Parece provável, portanto, que o mecanismo primário do efeito citotóxico do fipronil em fígados de rato é de inibição do metabolismo energético mitocondrial.

As consequências desta ação para o animal são inúmeras. A glicogenólise e a gliconeogênese são as principais fontes de glicose circulante no organismo e qualquer distúrbio nesses processos pode levar a danos em

outros órgãos (RUDERMAN, 1975). O glicogênio hepático é reabastecido no período pós-prandial para armazenar o excesso de glicose presente na circulação sanguínea. Nos períodos entre as refeições, quando a glicemia é menor, ocorre uma diminuição da relação insulina: glucagon, estimulando, assim, a glicogenólise para manter a glicemia (PARK; EXTON, 1972).

Com o decréscimo da reserva do glicogênio hepático, outro mecanismo para a manutenção da glicemia circulante é acionado, a gliconeogênese, realizada a partir de compostos que não carboidratos à custa de ATP (RUDERMAN, 1975). O fipronil inibiu significativamente a gliconeogênese a partir da $_{L}$-alanina de maneira dose-dependente, provavelmente, devido ao seu efeito inibidor sobre a fosforilação oxidativa. Desta forma seria esperado que a gliconeogênese fosse comprometida independente do substrato gliconeogênico. Para os bovinos, em especial, a inibição deste processo é de extrema relevância, isso porque esses animais obtêm a maior parte da glicose que necessitam por meio da gliconeogênese, principalmente durante a lactação, onde a demanda por essa hexose é grandemente ampliada, além disso, apenas uma pequena fração de toda glicose requerida por esses animais é absorvida no trato gastrointestinal (LINDSAY, 1970). A inibição da ureagênese nos mamíferos é também crítica, pois este processo está intimamente ligado à remoção da amônia, que é potencialmente tóxica e resulta da degradação das proteínas da dieta, por meio do ciclo da ureia (HUNTINGTON; ARCHIBEQUE, 1999).

A inibição no metabolismo energético causada pelo fipronil é evidente, porém, não é possível afirmar se o agente tóxico é o próprio fipronil ou algum de seus metabólitos. A biotransformação do fipronil ocorre pela ação do citocromo P450, mais especificamente, pelo citocromo 3A4 (CYP3A4), embora o CYP2C19 também tenha uma pequena participação, e, a partir de sua S-oxidação, surge o fipronil sulfona (TANG et al., 2004). Das et al. (2006) mostraram que o processo de biotransformação do fipronil não elimina sua toxicidade e que tanto o fipronil quanto o fipronil sulfona em concentrações micromolares induziram a morte em células HepG2 e hepatócitos humanos.

Oliveira (2010) demonstrou a ocorrência de hipertrofia dos hepatócitos em ratos tratados com fipronil. Segundo a autora, essa hipertrofia ocorre provavelmente devido ao aumento no número das organelas envolvidas na degradação de produtos tóxicos, principalmente o retículo endoplasmático rugoso que é capaz de sintetizar as isoformas do citocromo P450.

Este processo de biotransformação é relativamente demorado, e os efeitos do fipronil observados neste trabalho ocorreram no período máximo de infusão de 40 minutos, sendo que as alterações metabólicas foram observadas logo nos primeiros minutos da infusão do fipronil, sugerindo um efeito agudo que deve ser possivelmente da molécula inalterada. Não se pode descartar, entretanto, que o metabólito gerado possa ter contribuído para os efeitos observados especialmente ao final da infusão. Esta hipótese é corroborada pela lentidão do restabelecimento dos fluxos metabólicos após o término da infusão do fipronil. Alguns parâmetros foram irreversíveis como a produção de glicose a partir de $_{L}$-alanina em animais em jejum ou do consumo de oxigênio dos animais alimentados. Este fenômeno pode representar um acúmulo do fipronil nos compartimentos celulares ou de seus metabólitos ativos.

Pode ser também creditado a um eventual acúmulo de metabólitos o efeito de ativação da respiração celular em fígados de animais em jejum que nitidamente passa a ocorrer somente após 20 minutos do início da infusão do fipronil e que passa a ser o efeito predominante nas suas concentrações mais elevadas. Esse mesmo comportamento foi observado em fígados de animais alimentados, mas de forma menos expressiva, como pode ser percebido ao final da infusão do fipronil. Isso pode indicar o efeito também dos metabólitos do fipronil sobre a respiração mitocondrial. O trabalho de Palma et al. (2013), em experimentos *in vitro*, mostra que o fipronil inibe a cadeia de transporte de elétrons, mais especificamente no complexo I, e Vidal et al. (2011) demonstraram que ele atua também como desacoplador de forma dose dependente ambos trabalhando com concentrações entre 5 e 25 μM. Em consonância a esses estudos, a citotoxicidade do fipronil nos modelos celulares Caco-2 e SHSY5Y foi relacionada à capacidade desacopladora da cadeia de

transporte de elétrons do inseticida, levando ao comprometimento da produção de energia das células e, como é de se esperar, aumentou o consumo de oxigênio (VIDAU et al., 2009 e VIDAU et al., 2011). Em ambos os trabalhos as concentrações usadas foram a partir de 5 μM do fipronil. Em experimentações paralelas ao presente estudo realizadas em nosso laboratório com mitocôndrias isoladas, verificamos que o metabólito fipronil sulfona foi capaz de desacoplar as mitocôndrias nas concentrações entre 0,5 e 5 μM, e o fipronil dessulfinil na faixa de concentração entre 5 e 25 μM apresentou o mesmo efeito (resultados não publicados).

Os efeitos encontrados na literatura sobre o fipronil indicam que ele induz a morte celular por apoptose. Células de fígado expostas a concentrações baixas de fipronil (0,1 μM), além da diminuição do ATP, tiveram a ativação de enzimas conhecidas por participarem do processo de apoptose, as caspases 3 e 7 (DAS et al., 2006). Estudos histológicos também mostram o núcleo de hepatócitos desorganizados e modificados, com condensação e marginalização da cromatina, indicando a ocorrência de apoptose (FERREIRA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012). No fígado intacto o fipronil exerceu efeitos significativos em concentrações maiores do que as relatadas em mitocôndrias ou em hepatócitos isolados. Este é um fenômeno comum, considerando que as concentrações intracelulares do fipronil ou de seus metabólitos na organela ou enzima alvo pode ser muito menor do que a concentração arterial.

Cid et al. (2012), ao administrarem 1 mg/kg em dose única por via subcutânea em bovinos, encontraram um pico de aproximadamente 1 μM de fipronil no plasma sanguíneo 10 horas após sua administração. Em outro estudo, Leghait et al. (2009) utilizando uma dose de 3 mg/kg/dia em ratos durante 14 ou 28 dias encontraram doses plasmáticas de fipronil menores que 0,2 μM, porém, foram encontradas doses do metabólito sulfona cerca de 20 vezes maiores. Portanto, o uso do fipronil nas doses recomendadas é seguro, no entanto, observa-se que a aplicação em doses excessivas ou prolongadas pode causar danos a animais e humanos expostos ao inseticida.

5 Conclusão

A inibição do metabolismo energético apresentada pelo fipronil afeta de forma severa processos de grande importância para a manutenção da célula, podendo assim contribuir para a toxicidade apresentada pelo inseticida no fígado.

6 Referências

BERGMEYER, H. U. Determination of urea with glutamate dehydrogenase as indicator enzyme. In: BERGMEYER, H.U. (Ed.), **Methods of Enzymatic Analysis,** New York: Academic Press, 1974. p. 1794-1801.

BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. Determination of glucose with glucose oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H.U. (Ed.), **Methods of Enzymatic Analysis**, New York: Academic Press, 1974. p. 1205-1215.

CID, Y. P.; FERREIRA, T. P.; MEDEIROS, D. M. V. C.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA N. C. C. Determination of fipronil in bovine plasma by solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet detection. **Quimica Nova**, v. 35, n. 10, p. 2063-2066, 2012.

COLTURATO, C. P.; CONSTANTIN, R. P.; MAEDA JUNIOR, A. S.; CONSTANTIN, R. P.; YAMAMOTO, N. S.; BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; CONSTANTIN, J. Metabolic effects of silibinin in the rat liver. **Chemico-Biological Interactions**, v. 195, p. 119-132, 2012.

CONSTANTIN, J.; IWAMOTO, E. L. I.; KEMMELMEIER, F. S.; YAMAMOTO, N. S.; BRACHT, A. The action of glucagon infused via the hepatic artery in anterograde and retrograde bivascular perfused of rat liver is not a function of

the accessible cellular spaces. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1244, p. 169-178, 1995.

COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.

CZOK, R.; LAMPRECHT, W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate 2- phosphate. In: BERGMEYER, H.U. (Ed.), **Methods of Enzymatic Analysis,** New York: Academic Press, 1974. p. 1446-1451.

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

DICKMAN, K. G.; MANDEL, L. J. Differential effects of respiratory inhibitors on glycolysis in proximal tubules. **American Journal of Physiology**, v. 258, p. 1608-1615, 1990.

FERREIRA, M.; OLIVEIRA, P. R.; DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; MATHIAS, M. I. C. Action of the Chemical Agent Fipronil (Active Ingredient of Acaricide Frontline1) on the Liver of Mice: An Ultrastructural Analysis. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 197-205, 2012.

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

GUNASEKARA, A. S.; TROUNG, T. Environmental fate of fipronil. **California Environmental Protection Agency**, 2007. 28 p.

GUTMANN, I.; WAHLEFELD, A. W. L (+) lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD^+. In: BERGMEYER, H.U. (Ed.), **Methods of Enzymatic Analysis**, New York: Academic Press, 1974. p. 1464-1466.

HAINZL, D.; CASIDA J. E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 12746-12767, 1996.

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.

HOLECEK, M. Adverse effects of chronic intake of glutamine- supplemented diet on amino acid concentrations and protein metabolism in rat: effect of short-term starvation. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 6, p. 190-196. 2011.

HUNTINGTON, G. B.; ARCHIBEQUE, S. L. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminant. **Proceedings of the American Society of Animal Science**, p. 1-11, 1999.

IOANNIDES, C.; LEWIS, D. F. V. Cytochromes P450 in the bioactivation of chemicals. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 1767-1788, 2004.

KIMMIG, R.; MAUCH, T. J.; KERZL, W.; SCHWABE, U.; SCHOLZ, R. Actions of glucagon on flux rates in perfused rat liver. Kinetics of the inhibitory effect on glycolysis and the stimulatory effect on glycogenolysis. **European Journal of Biochemistry**, v. 136, p. 609-616, 1983.

KREBS, H. A.; HENSELEIT, H. Untersuchungen uber die Harnstoffbildung im Tier-korper. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie**, v. 210, p. 33, 1932.

KUN, F.; KEARNEY, E. B. Ammonia. In: BERGMEYER, H.U. (Ed.), **Methods of enzymatic analysis**, New York: Academic Press, 1974. p. 1802-1806.

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.

LINDSAY, D. B. Carbohydrate metabolism in ruminants, In: PHILLIPSON, A.T. (Ed.), **Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant**, Newcastle upon Tyne, England: Oriel Press, 1970. p. 438-541,

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 insecticide fipronil – a $GABA_A$ – gated chloride channel blocker. **Journal of Toxicology** - **Clinical Toxicology**, v. 42, n. 7, p. 955-963, 2004.

MINGATTO, F. E.; MAIOLI, M. A.; BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. Effects of monocrotaline on energy metabolism in the rat liver **Toxicology Letters**, v. 182, p. 115-120, 2008.

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. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, UNESP, 2010.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; OLIVEIRA, R. J.; MATHIAS, M. I. C. Cytotoxicity of fipronil on mice liver cells. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 28-35, 2012.

PAGADIGORRIA, C. L. S.; BRACHT, A.; CONSTANTIN, J.; NASCIMENTO, E. A. Effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug piroxicam on energy metabolism in the perfused rat liver. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Comparative Pharmacology and Toxicology**, v. 113C, p. 93-98, 1996.

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: 21 jul. 2014.

PARK, C. R.; EXTON, J. H. Glucagon and the metabolism of glucose. In: LEFEBVRE, P.J.; UNGER, R. H. (Ed), Glucagon, Oxford: Pergamon, 1972. p. 77-108.

RUDERMAN, N. B. Muscle amino acid metabolism and gluconeogenesis. **Annual Review of Medicine**, v. 26, p. 245-258, 1975.

SCHOLZ, R.; BUCHER, T. Hemoglobin-free perfusion of rat liver. In: CHANCE, B.; ESTABROOK, R. W.; WILLIANSON, J. R. (Eds.). **Control of Energy Metabolism**, New York: Academic Press, 1965. p. 393-414.

SILVA, A. S. **Efeitos neurocomportamentais da exposição prolongada de ratos ao fipronil.** São Paulo, 2008. Dissertação (Mestrado em Toxicologia experimental) - Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, 2008.

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

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

VIDAU, C.; BRUNET, J. L.; BADIOU, A.; BELZUNCES, L. P. Phenylpyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell model Caco-2. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 589-597, 2009.

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.

WILLIAMS, Z. R.; GOODMAN, C. B.; SOLIMAN, K. F. Anaerobic glycolysis protection against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) toxicity in C6 glioma cells. **Neurochemical Research**, v. 32 p. 1071-1080, 2007.

YOUNES M.; STRUBELT, O. Cyanide-Induced Injury to the Isolated Perfused Rat Liver. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 63, p. 382-385, 1988.

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. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 1, p. 192-201, 2004.

ZHAO, X.; YEH, J. Z.; SALGADO, V. L.; NARAHASHI, T. Sulfone metabolite of fipronil blocks γ-aminobutyric acid and glutamate-acivated chloride channels in mammalian and insect neurons. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, p. 363-373, 2005.