

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EXPOSIÇÃO PERINATAL AO PRAGUICIDA FIPRONIL EM RATOS
WISTAR – ESTUDO DE EFEITOS TOXICOLÓGICOS SOBRE A
GERAÇÃO E O DESENVOLVIMENTO DA PROLE

FRANCISCO PIZZOLATO MONTANHA

Botucatu - SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EXPOSIÇÃO PERINATAL AO PRAGUICIDA FIPRONIL EM RATOS
WISTAR – ESTUDO DE EFEITOS TOXICOLÓGICOS SOBRE A
GERAÇÃO E O DESENVOLVIMENTO DA PROLE

FRANCISCO PIZZOLATO MONTANHA

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Noeme Sousa
Rocha

Co-Orientador: Prof. Dr. Antonio
Francisco Godinho

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

Montanha, Francisco Pizzolato.

Exposição perinatal ao praguicida fipronil em ratos Wistar : estudo de efeitos toxicológicos sobre a geração e o desenvolvimento da prole / Francisco Pizzolato Montanha.
- Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Noeme Sousa Rocha

Coorientador: Antonio Francisco Godinho

Capes: 50501062

1. Animais - Comportamento. 2. Pesticidas - Toxicologia. 3. Ratos Wistar. 4. Histopatologia veterinária. 5. Marcadores biológicos.

Palavras-chave: Comportamento animal; Fenilpirazol; Histopatologia; Marcadores bioquímicos; Pesticida.

Nome do Autor: Francisco Pizzolato Montanha

Título: EXPOSIÇÃO PERINATAL AO PRAGUICIDA FIPRONIL EM RATOS WISTAR – ESTUDO DE EFEITOS TOXICOLÓGICOS SOBRE A GERAÇÃO E O DESENVOLVIMENTO DA PROLE

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Noeme Sousa Rocha
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Julio Lopes Sequeira
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Simone Biagio Chiacchio
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a Claudia Turra Pimpão
Membro
Departamento de Farmacologia Veterinária
Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária – Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR – Curitiba-PR

Prof^a. Dr^a. Rosa Maria Barilli Nogueira
Membro
Departamento de Clínica Médica de Pequenos Animais
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE – Presidente Prudente-SP

Data da Defesa: 30 de Junho de 2015.

DEDICATÓRIA

À minha esposa que sempre me apoiou e que, durante a realização deste estudo, foi paciente e compreensiva com a minha ausência.

AGRADECIMENTO

À Deus, por estar sempre presente em minha vida. Por me dar força para lutar. Sem Ele, não sou nada! “O Senhor é o meu pastor, nada me faltará!”

À minha orientadora Noeme Sousa Rocha, pelos ensinamentos, pelas conversas e conselhos, pela confiança depositada em mim e pela atenção que teve para realização deste estudo.

Ao meu co-orientador Antonio Francisco Godinho, por toda a dedicação com o projeto. Pela sua paciência para ensinar, pela força de vontade em ajudar, por vivenciar todos os momentos junto com a equipe. Pela amizade que permanecerá! Tenho grande admiração e respeito por você!

À minha esposa Mariana Barbosa Nardelli Montanha! Só nós sabemos o quanto foi difícil e tudo o que passamos para que eu pudesse concluir o doutorado. Obrigado por ser tão especial! Você é um exemplo para mim!

Aos meus pais, Aliceu Montanha Junior e Maria Margareth Pizzolato Montanha; irmãos, Lúcia Pizzolato Montanha, Aliceo Montanha Neto e Antonio Pizzolato Montanha; e sobrinhos, Maria Fernanda, Victor e Isabella. Não há palavras para agradecer e expressar o meu amor por vocês! São muito importantes para mim!

Aos meus sogros, Silvio Nardelli e Fatima Barbosa Nardelli; cunhados, Lincoln Andrade, Letícia Ribeiro (Bia), Dayane Teixeira e Luiz Barbosa Nardelli; e a toda minha família e amigos que sempre me apoiaram. Pelas palavras de estímulo que me ajudaram a seguir em frente.

Aos amigos, Alaor Almeida, Caique Faria, Faber Machado, Fábio Anselmo, Fábio Silva, Hélio, Isamery M. Sarmiento, João Chaguri, Juliano Ottoni, Maria Valéria M. Dalanezi, Raquel B. Ferioli, Roberto Fernandez, Rômulo F. Estangari Lot, Sarah Setznagl, Tália M. Tremori, Tatiany Silveira e Thiago Gianeti, que também se dedicaram para a concretização deste estudo. Vocês foram fundamentais para colocar em prática o que antes era só um projeto. Com vocês, cada momento se tornou mais fácil e prazeroso. Obrigado!

Aos membros da lista da banca examinadora, Antonio Francisco Godinho, Bruno Cogliati, Claudia Turra Pimpão, Daisy Pontes Netto, Julio Lopes Sequeira, Lucia Helena O'Dwyer de Oliveira, Noeme Sousa Rocha, Roberto Calderon Gonçalves, Rosa Maria Barilli Nogueira e Simone Biagio Chiacchio, pelo tempo dedicado com a correção da tese, o que contribuiu muito para melhorar o meu trabalho.

Meu respeito aos animais usados para realização deste estudo!

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1.

TABELA 1. Classificação toxicológica dos agrotóxicos.....	9
--	---

Capítulo 2.

TABELA 1. Dosagem do fipronil e fipronil sulfona no cérebro.....	58
---	----

Capítulo 3.

TABELA 1-A. Alterações histopatológicas no cérebro da prole jovem.....	78
---	----

TABELA 1-B. Alterações histopatológicas no cérebro da prole adulta.....	78
--	----

Capítulo 4.

TABELA 1. Dosagem do fipronil e fipronil sulfona no cérebro.....	95
---	----

Capítulo 5.

TABELA 1-A. Alterações histopatológicas no fígado de ratos jovens.....	113
---	-----

TABELA 1-B. Alterações histopatológicas no fígado de ratos adultos.....	113
--	-----

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1.

FIGURA 1. Estrutura química do fipronil.....	5
FIGURA 2. Pesagem dos filhotes.....	25
FIGURA 3. Aparecimento de pelos.....	25
FIGURA 4. Erupção dos dentes incisivos.....	25
FIGURA 5. Descolamento de orelha.....	26
FIGURA 6. Abertura dos olhos.....	26
FIGURA 7. Descida dos testículos.....	26
FIGURA 8. Reflexo de preensão palmar.....	27
FIGURA 9. Reflexo postural/endireitamento.....	27
FIGURA 10. Reflexo geotaxia negativa.....	27
FIGURA 11. Reconhecimento de Novo Objeto.....	30
FIGURA 12. Labirinto Octogonal.....	31
FIGURA 13. Arena de Campo Aberto.....	32
FIGURA 14. Labirinto em Cruz Elevado.....	33
FIGURA 15. Hole-Board.....	34

Capítulo 2.

FIGURA 1. Número de entradas nos braços abertos – Jovens.....	54
FIGURA 2. Tempo de permanência nos braços abertos – Jovens.....	54
FIGURA 3. Tempo de permanência nos braços abertos – Adultos.....	55
FIGURA 4. Tempo de permanência nos braços fechados – Jovens.....	55
FIGURA 5. Tempo de permanência nos braços fechados – Adultos.....	56
FIGURA 6. Tempo de latência para primeiro ataque.....	56
FIGURA 7. Número total de ataques.....	57
FIGURA 8. Dosagem do cortisol sérico – Jovens.....	57

Capítulo 3.

FIGURA 1. Índice de reconhecimento de novo objeto – memória a longo prazo na prole jovem.....	75
--	----

FIGURA 2. Índice de reconhecimento de novo objeto – memória a curto prazo na prole adulta.....	75
FIGURA 3. Índice de reconhecimento de novo objeto – memória a longo prazo na prole adulta.....	76
FIGURA 4. Tempo para encontrar alimento.....	76
FIGURA 5. Número de visitas à braços incorretos.....	77
FIGURA 6. Número de revisitações à braços incorretos.....	77
FIGURA 7. Dosagem da acetilcolinesterase na prole adulta.....	78
FIGURA 8. Congestão vascular cerebral.....	79
FIGURA 9. Edema cerebral.....	79
FIGURA 10. Satelitose.....	80
FIGURA 11. Vacuolização.....	80

Capítulo 4.

FIGURA 1. Número de enfiadas de patas – Jovens.....	94
FIGURA 2. Número de enfiadas de patas – Adultos.....	94

Capítulo 5.

FIGURA 1. Ganho de peso dos filhotes de ratas expostas ao fipronil.....	109
FIGURA 2. Número de dias para a erupção dos dentes incisivos.....	109
FIGURA 3. Relação peso órgão/animal: fígado.....	110
FIGURA 4. Dosagem do cortisol sérico.....	110
FIGURA 5. Congestão vascular no fígado.....	111
FIGURA 6. Degeneração hidrópica no fígado.....	111
FIGURA 7. Infiltrado linfocítico no fígado.....	112
FIGURA 8. Degeneração gordurosa no fígado.....	112

ABREVIACÕES

%	Porcentagem
>	Maior
<	Menor
®	Registrado
°C	Grau célsius
µg	Micrograma
µg/g	Micrograma por grama
ACA	Arena de Campo Aberto
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cl ⁻	Cloreto
CL ₅₀	Concentração letal 50
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DL ₅₀	Dose letal 50
DPN	Dias pós-nascimento
EPA	Agência de proteção ambiental
EPM	Erro Padrão Médio
EUA	Estados Unidos da América
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	Grama
g L ⁻¹	Gramas por litro
g mol ⁻¹	Gramas de um mol
GABA	Ácido gama amino butírico
GGT	Gama glutamiltransferase
HB	Hole-Board
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
ia/ha	Ingrediente ativo por hectare

IP	Intraperitoneal
IRENOb	Índice de reconhecimento de novo objeto
LCE	Labirinto em cruz elevado
LDH	Lactato desidrogenase
LO	Labirinto octogonal
MCP	Memória a curto prazo
MCPJ	Memória a curto prazo em jovens
MCPA	Memória a curto prazo em adultos
MLP	Memória a longo prazo
MLPJ	Memória a longo prazo em jovens
MLPA	Memória a longo prazo em adultos
mg/Kg	Miligramas por quilograma
mg/Kg/d	Miligramas por quilograma por dia
mg/L	Miligramas por litro
mL	Mililitro
n	Número
NCP	Núcleos Cerebelares Profundos
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Parte por milhão
1ppm	1 mg/L
RNOb	Reconhecimento de novo objeto
rpm	Rotações por minuto
SDH	Sorbitol desidrogenase
SINDIVEG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal
SNC	Sistema nervoso central
t	Tonelada
T _{1/2}	Tempo de meia vida
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USA	United States of América
USEPA	United States Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)

SUMÁRIO

Página

**CAPÍTULO 1. EXPOSIÇÃO PERINATAL AO PRAGUICIDA FIPRONIL
EM RATOS WISTAR – ESTUDO DE EFEITOS
TOXICOLÓGICOS SOBRE A GERAÇÃO E O
DESENVOLVIMENTO DA PROLE.**

Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Praguicidas.....	2
2.1.1 Fipronil.....	4
2.1.1.1 Toxicocinética do fipronil.....	10
2.1.1.2 Toxicodinâmica do fipronil.....	12
2.1.1.3 Efeitos toxicológicos do fipronil.....	14
2.2 Toxicologia do desenvolvimento.....	16
2.3 Biomarcadores e bioindicadores.....	23
2.3.1 Desenvolvimento físico e sensorio-motor.....	24
2.3.2 Avaliação neurocomportamental.....	28
2.3.3 Perfil bioquímico.....	34
2.3.3.1 Acetilcolinesterase.....	35
2.3.3.2 Perfil hepático.....	35
2.3.3.3 Cortisol.....	36
2.3.4 Avaliação histopatológica.....	36

**CAPÍTULO 2. EXPOSIÇÃO PERINATAL AO FIPRONIL PROVOCA
SUSCEPTIBILIDADE AUMENTADA DE EFEITOS
COMPORTAMENTAIS AGRESSIVOS E DE
ANSIEDADE EM FILHOTES MACHOS DE RATOS.**

Resumo.....	38
Abstract.....	38
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
2.1 Animais.....	41
2.2 Procedimento experimental.....	41
2.3 Avaliação do comportamento.....	42
2.4 Análises bioquímica e cromatográfica.....	43
2.5 Análise estatística dos resultados.....	44
3. RESULTADOS.....	44
4. DISCUSSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	50

CAPÍTULO 3. COMPORTAMENTO DE MEMÓRIA DIMINUIDO EM FILHOTES DE RATOS EXPOSTOS AO PRAGUICIDA FIPRONIL NO PERÍODO PERINATAL.

Resumo.....	59
Abstract.....	59
1. INTRODUÇÃO.....	60
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
2.1 Animais.....	62
2.2 Procedimento experimental.....	62
2.3 Avaliação de comportamento.....	63
2.4 Testes bioquímico e histopatológico.....	65
2.5 Análise estatística dos resultados.....	65
3. RESULTADOS.....	66
4. DISCUSSÃO.....	67
5. CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS.....	72

CAPÍTULO 4. COORDENAÇÃO MOTORA AFETADA POR FIPRONIL EM FILHOTES DE RATAS EXPOSTAS AO PRAGUICIDA.

Resumo.....	81
Abstract.....	81
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO.....	82
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	84
2.1 Animais.....	84
2.2 Procedimento experimental.....	85
2.3 Avaliação de comportamento.....	85
2.4 Dosagem do fipronil.....	86
2.5 Análise estatística dos resultados.....	86
3. RESULTADOS.....	87
4. DISCUSSÃO.....	87
REFERÊNCIAS.....	90

CAPÍTULO 5. PARÂMETROS DO DESENVOLVIMENTO DE FILHOTES DE RATAS EXPOSTAS AO PRAGUICIDA FIPRONIL NO PERÍODO PERINATAL.

Resumo.....	96
Abstract.....	96
1. INTRODUÇÃO.....	97
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	98
2.1 Animais.....	99
2.2 Procedimento experimental.....	99
2.3 Desenvolvimento físico e sensório-motor.....	100
2.4 Comportamento.....	100

2.5 Relação peso órgão/animal.....	101
2.6 Análises bioquímicas.....	101
2.7 Avaliação histopatológica.....	101
2.8 Análise estatística dos resultados.....	101
3. RESULTADOS.....	101
Mães.....	101
Filhotes.....	102
Desenvolvimento físico e sensório-motor.....	102
Comportamento.....	102
Relação peso órgão/animal.....	102
Avaliação bioquímica.....	102
Avaliação histopatológica.....	103
4. DISCUSSÃO.....	103
REFERÊNCIAS.....	106

CAPÍTULO 6.

3.DISSCUSSÃO GERAL.....	114
4.CONCLUSÃO GERAL.....	116
5.BIBLIOGRAFIA.....	117
6.ANEXOS.....	126

MONTANHA, F.P. **Exposição perinatal ao praguicida fipronil em ratos Wistar – estudo de efeitos toxicológicos sobre a geração e o desenvolvimento da prole.** Botucatu, 2015. 151p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O presente estudo teve o objetivo de avaliar os efeitos toxicológicos em ratos Wistar expostos ao fipronil no período perinatal. Os animais utilizados foram adquiridos do Biotério Central da UNESP, campus de Botucatu e os testes foram realizados em seus descendentes. Foi avaliado o desenvolvimento físico e sensório-motor e aplicados testes de comportamento, como a Arena de Campo aberto, para avaliar atividade geral; o Labirinto em Cruz Elevado, para avaliação do comportamento de ansiedade; o Hole-Board, para coordenação motora; os testes Reconhecimento de Novo Objeto e Labirinto Octogonal, para avaliar memória cognitiva e espacial, respectivamente; e o teste de agressividade, de acordo com o paradigma do animal residente/intruso. Por espectrofotometria, foram dosados os níveis de Acetilcolinesterase, de Cortisol, de Alanina Aminotransferase e de Aspartato Aminotransferase, e quantificado, através de análise cromatográfica, o fipronil e seus metabólitos nos cérebros dos ratos. Fragmentos dos órgãos cérebro e fígado foram coletados e avaliados por técnica de histopatologia. De acordo com os resultados obtidos, o fipronil alterou o desenvolvimento físico, aumentou a ansiedade e agressividade, prejudicou a memória e a coordenação motora, induziu aumento na atividade da enzima acetilcolinesterase, causou alterações histopatológicas no cérebro e fígado dos animais. O fipronil é considerado tóxico para o sistema nervoso central e fígado de ratos, jovens e adultos, expostos ao praguicida no período perinatal.

Palavras-chave: Comportamento animal, Fenilpirazól, Histopatologia, Marcadores bioquímicos, Pesticidas.

MONTANHA, F.P. **Perinatal exposure of Wistar rats to fipronil - toxicological effects on the generation and development of offsprings.** Botucatu, 2015. 151p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the toxicological effects in rats Wistar exposed to fipronil in the perinatal period. The animals used were acquired from the Biotério Central of UNESP, Botucatu and the tests were performed on their offspring. Were evaluated the physical and sensory-motor development and applied behavioral tests, such as the Open Field test, to assess general activity; the Plus Maze Elevated to assess the anxiety behavior; Hole-Board for motor coordination; tests Recognition New Object and Octagonal Labyrinth, to assess cognitive and spatial memory, respectively; and Aggressivity test, according to the resident/intruder animal paradigm. Were measured levels of Acetylcholinesterase, Cortisol, Alanine aminotransferase and Aspartate aminotransferase by spectrophotometry, and quantified fipronil and metabolites in the brains of rats, by chromatographic analysis. Fragments of organs as brain and liver were collected and evaluated by histopathology technique. According to the results, fipronil alter the physical development, increased anxiety and aggression, impaired memory and motor coordination, induced increase in the Acetylcholinesterase activity, caused histological changes in the brain and liver of these animals. Fipronil is considered toxic to the central nervous system and liver of rats, young and adults, exposed to pesticide in the perinatal period.

Key words: Behavior animal, Biological markers, Phenylpyrazole chemical family, Pathology, Pesticides.

1. INTRODUÇÃO

Toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes da interação das substâncias químicas e agentes físicos com o organismo. A Toxicologia Veterinária é uma área do conhecimento que vem despertando grande interesse no meio científico (SPINOSA e SCHWARZ, 2008). O estudo dos efeitos nocivos causados por agentes tóxicos em seus descendentes pode ser definido como toxicologia do desenvolvimento (GÓRNIAK et al., 2008).

Praguicidas são amplamente utilizados para controlar insetos e pragas agrícolas que causam danos à saúde pública. Surto de intoxicações com inseticidas têm sido relatados, ocorrendo entre animais e humanos, geralmente por exposição direta ou indireta através dos alimentos ou água contaminados por esses produtos químicos (GILL e DUMKA, 2013).

Fipronil é um praguicida derivado quimicamente da família do fenilpirazol (MANDAL et al., 2014). As características do fipronil, como amplo espectro de ação sobre os insetos e praticamente atóxico para minhocas e diversas espécies de mariscos aquáticos, permitiu um aumento no uso deste inseticida, tanto no uso doméstico como na agricultura (AAJOUR et al., 2003).

No entanto, o fipronil é altamente tóxico para peixes e pássaros e moderadamente tóxico para pequenos mamíferos. Dessa forma, desenvolveu-se grande preocupação com a toxicidade do fipronil nos animais (AMARAL, 2012), uma vez que, impactos não intencionais dos praguicidas sobre organismos não-alvos têm sido amplamente registrados (GIBBONS et al., 2014).

A exposição de fêmeas a praguicidas durante a fase reprodutiva pode levar à alterações físicas no feto e posteriormente, à alterações comportamentais na prole. As consequências da exposição durante o desenvolvimento perinatal são alvo de preocupação porque os organismos jovens podem ser mais susceptíveis ao efeito desses produtos (CASTRO, 2006a).

Diante disto, este estudo teve como objetivo estudar em ratos Wistar, efeitos toxicológicos da exposição *in útero* e lactacional ao fipronil, avaliando a geração e o desenvolvimento físico, sensorio-motor e neurocomportamental da prole, e alterações morfológicas e bioquímicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Praguicidas

Praguicida, denominação utilizada para designar um grupo de agentes químicos tóxicos (POPPENGA e OEHME, 2010), também conhecidos por nomes como agrotóxicos e defensivos agrícolas, são substâncias ou misturas de substâncias que tem como objetivo prevenir, destruir ou combater qualquer tipo de praga presente em cultivo agrícola (AMARAL, 2012).

São frequentemente utilizados no meio agropecuário para controlar uma variedade de insetos e pragas, e nos animais, por via tópica ou oral, no controle de parasitas (POPPENGA e OEHME, 2010).

Praga (do latim *plaga*) refere-se a tudo aquilo que ataca, lesa ou transmite enfermidade às plantas, aos animais e ao homem, como ervas daninhas, fungos, insetos, carrapatos, aracnídeos ou qualquer outra forma de vida vegetal ou animal considerada danosa à saúde e ao bem-estar do homem, à lavoura, à pecuária e aos seus produtos e matérias-primas alimentares (SPINOSA e XAVIER, 2008).

Já o termo praguicida (a terminação latina *cida* significa matar) refere-se à substância química, natural ou sintética, empregada para matar, repelir ou mitigar as pragas (SPINOSA e XAVIER, 2008).

O termo xenobiótico (*ksénos* = estranho; *bio* = vida) é empregado para indicar qualquer substância estranha ao organismo, qualitativa ou quantitativamente, não indicando, necessariamente, que provoca efeito nocivo. Quando o xenobiótico, por alguma razão (por exemplo, concentração excessiva), provoca algum efeito nocivo, ele é considerado também um toxicante ou agente tóxico. Porém, nem todo xenobiótico é um toxicante (SPINOSA e SCHWARZ, 2008).

Os praguicidas são amplamente utilizados na agricultura, com a finalidade de aumentar a produtividade agrícola e auxiliar no controle de vetores de várias doenças. Porém, seu uso excessivo e desordenado vem provocando diversos danos para o meio ambiente, como a contaminação das águas, solos e alimentos, e consequentemente trazendo intoxicações e doenças ao homem e animais (AMARAL, 2012).

O emprego de praguicidas trouxe grandes benefícios para a produção de alimentos e para a saúde humana e animal desde o início de sua utilização pela humanidade. Tanto que, ainda hoje, não é possível suspender a utilização desses agentes (SPINOSA e XAVIER, 2008).

As primeiras substâncias utilizadas como praguicidas foram agentes tóxicos de origem natural, tais como nicotina, piretro, além de substâncias inorgânicas como o mercúrio e o enxofre. O uso de praguicidas mais modernos teve seu início por volta de 1940, quando Paul Müller descobriu o inseticida dicloro-difenil-tricloroetano (DDT). O DDT era muito eficaz, transformando-se rapidamente no praguicida mais utilizado no mundo. Entretanto, na década de 1960, descobriu-se que o DDT provocava danos à saúde de diversas espécies de aves, prejudicando sua reprodução e oferecendo grandes riscos à biodiversidade (AMARAL, 2012).

Muitas são as substâncias químicas conhecidas em todo o mundo, cerca de onze milhões, das quais três mil são produzidas em larga escala. Anualmente, toneladas de substâncias sintéticas e naturais são lançadas no meio ambiente (UDO, 2012).

No Brasil, de acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG), no ano de 2013 houve um consumo de 235.133 toneladas (t) de inseticidas, 487.743t de herbicidas, 102.973t de fungicidas e 11.481t de acaricidas (SINDIVEG, 2014).

Surtos de intoxicações com inseticidas têm sido relatados, ocorrendo entre animais e humanos, geralmente por exposição direta aos praguicidas ou indiretamente através dos alimentos ou água contaminados por esses produtos químicos (GILL e DUMKA, 2013). Por isso, os praguicidas despertam grande interesse dentro da toxicologia (SPINOSA e XAVIER, 2008).

Os praguicidas podem exercer seus efeitos sobre organismos, quer diretamente ou indiretamente (UDO, 2012). Os efeitos diretos podem ocorrer através da ingestão de um produto formulado quando, por exemplo, uma ave se alimenta de uma semente tratada com inseticida ou através da absorção pela pele após um evento de pulverização ou ainda, pela ingestão de presas contaminadas (GIBBONS et al., 2014).

Quando se menciona a ação indireta, se refere aos efeitos em organismos não alvos e ações não esperadas, como, por exemplo, o impacto no aumento

da mortalidade de besouros, mudanças nos padrões alimentares de garças e mudanças na aprendizagem e memória, e consequentemente no comportamento, em abelhas produtoras de mel. Ainda, o homem pode ser exposto indiretamente, ao consumir leite de vacas alimentadas com sementes tratadas (UDO, 2012).

Nenhum praguicida é totalmente seguro, por isso, quando utilizado adequadamente, apresenta o potencial de exercer efeitos nocivos sobre a vida selvagem, solo e microflora, organismos aquáticos e sobre a saúde humana e animal, uma vez que parte dessa substância pode atingir e ser nociva para outros organismos não-alvo (SPINOSA e XAVIER, 2008).

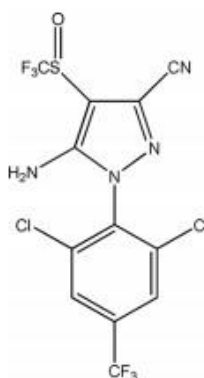
Praguicidas utilizados anteriormente, por exemplo, organoclorados, organofosforados e piretróides, foram substituídos mais recentemente por outros compostos, conhecidos como inseticidas de segunda geração, que trazem uma promessa de serem mais eficientes e seletivos no controle de pragas. Como exemplo, temos os derivados dos fenilpirazóis, cujo uso em organismos alvos provou ser eficiente, porém, pouco se sabe ainda sobre seus efeitos nos organismos não-alvos ou sobre o meio ambiente (FERREIRA, 2010; FERREIRA et al., 2012, 2012a).

2.1.1 Fipronil

Fipronil, $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$ - Figura 1 (ANVISA, 2005), cujo nome químico é 5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluormetil) fenil]-4-[(trifluorometil) sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitrila (MANDAL et al., 2014), e de sinonímia – MB 46030 (UDO, 2012), é uma substância sintética relativamente recente no mercado (FERREIRA, 2010; GILL e DUMKA, 2013).

É um praguicida derivado quimicamente da família do fenilpirazol (WILDE et al., 2001) ou fiproles (TERÇARIOL, 2007; UDO, 2012) e foi o primeiro praguicida deste grupo químico (IKEDA et al., 2001; SILVA, 2008).

Recentemente, foi designado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency* – USEPA) como de 2ª geração (WILDE et al., 2001; SILVA, 2008; MARTINS, 2009; UDO et al., 2014).

FIGURA 1. Estrutura química do fipronil.

Fonte: MANDAL et al., 2014.

Possui amplo espectro de ação (GILL e DUMKA, 2013), é extremamente ativo (TANG et al., 2004; AMARAL, 2012) e altamente eficaz (ZHAO et al., 2005; GILL e DUMKA, 2013), mesmo aplicado em baixas doses (UDO, 2012).

É classificado como inseticida, formicida e cupinicida (ANVISA, 2005). Foi descoberto e sintetizado a primeira vez pela transnacional Rhône-Poulenc Agro em 1987 (CID, 2012; MANDAL et al., 2014), conhecida, atualmente, como Bayer CropScience (GUNASEKARA et al., 2007), introduzido no mercado em 1993 (TINGLE et al., 2003; UDO et al., 2014) e registrado como um praguicida nos Estados Unidos da América em maio de 1996 (JACKSON et al., 2009; CID, 2012) pela USEPA (UDO, 2012).

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

Desde o seu desenvolvimento, este inseticida se tornou referência para utilização nos programas de controle de insetos em diferentes regiões do mundo, principalmente pela sua ampla eficácia, com resultados satisfatórios sobre uma gama de pragas em culturas, consideradas importantes economicamente (ZHAO e SALGADO, 2010), na higiene pública e sobre pragas na Medicina Veterinária (LI e AKK, 2008; FERREIRA, 2010).

Devido sua eficiência no combate a ectoparasitas, a utilização do fipronil dentro da medicina veterinária aumenta em escala global, visto que ao ser

administrado topicamente, apresenta excelente ação terapêutica e sua atividade é persistente no combate a pulgas e carrapatos de cães e gatos domésticos (FERREIRA, 2010). Pode ser aplicado em doses muito baixas para conseguir o controle efetivo de pragas (TINGLE et al., 2003).

O fipronil é conhecido em mais de 70 países e utilizado em mais de 100 diferentes tipos de culturas para o controle de pragas (ZHAO e SALGADO, 2010; AMARAL, 2012).

Foi introduzido na Europa e nos Estados Unidos em meados de 1990 (LI e AKK, 2008) e autorizado para comercialização na França em 1994 (BICHON et al., 2008), porém, por causa de sua possível implicação na mortalidade de abelhas, desde 2004, a sua utilização como produto fitossanitário foi suspensa neste país (OLIVEIRA, 2010).

Nos Estados Unidos, o fipronil não é registrado para uso na agricultura no estado da Califórnia (GUNASEKARA et al., 2007). Também teve seu uso proibido nos demais países da Europa pelo alto grau de toxicidade, comprovado pelos problemas sérios registrados em organismos expostos (OLIVEIRA, 2010).

No entanto, em alguns países não europeus, continua a ser um dos ectoparasiticidas mais utilizados para animais de estimação na medicina veterinária (LACROIX et al., 2010; ZHAO e SALGADO, 2010). No Brasil, o uso do fipronil é proibido somente nas lavouras de soja (OLIVEIRA, 2010). Até o momento, existem poucas avaliações de toxicidade do fipronil em organismos não-alvos (LACROIX et al., 2010).

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

Comercialmente, no Brasil, o fipronil pode ser encontrado como Frontline®, Fiprox®, Topline®, de uso veterinário, para administração em cães, felinos e bovinos, podendo ou não estar associado a outras moléculas, como por exemplo, o metopreno. O fipronil de uso agrícola é comercializado como Blitz®, Klap® e Regent® (MARTINS, 2009).

Está disponível sob forma de “spot-on” (Frontline® Top Spot e Fiprox® Drop Spot) e sob a forma de spray (Frontline® Spray). Também está disponível em associação com metopreno sob a forma de “spot-on” (Frontline® Plus Top Spot). Para aplicação em bovinos estão disponíveis duas formulações: uma na forma de “pour-on” (Topline®) com indicação contra carrapato (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*), mosca do chifre (*Haematobia irritans*) e berne (*Dermatobia hominis*) e outra na forma de spray (Topline® Spray) com indicação para o tratamento preventivo ou curativo de míases (*Cochliomya hominivorax*) (CID, 2012).

O fipronil é utilizado numa vasta gama de formulações e cada uma deve ser considerada separadamente na determinação e quantificação de riscos ambientais (TINGLE et al., 2003).

As formulações do fipronil no Brasil são variadas, indo desde iscas atrativas para o controle de formigas (Blitz®) até sprays utilizados no controle de carrapatos e pulgas (Frontline® e Top Spot®), além do controle de pragas da raiz do milho e do gorgulho aquático do arroz (Klap®) e também no controle de insetos e pragas na cultura de cana de açúcar (Regent® 800 WG), podendo ser empregado desde doses baixas até altas (AMARAL, 2012).

Fipronil tem sido recomendado para uso agrícola, fitossanitário e veterinário (CID et al., 2012), e designado como uma alternativa de praguicida para cupins e formigas, em vez de controle por fogo e organofosforados (DAS et al., 2006), bem como contra insetos resistentes aos organofosforados e outros inseticidas, como piretróides, carbamatos (GUNASEKARA et al., 2007; MANDAL et al., 2014) e ciclodienos (AAJOUD et al., 2003), sendo efetivo, mesmo assim, em baixas doses (UDO, 2012; GILL e DUMKA, 2013).

Está presente em produtos pecuários e agrícolas, principalmente em gramas e sementes. Domesticamente, o fipronil é utilizado para o controle de besouros (JACKSON et al., 2009), baratas, formigas (WILDE et al., 2001; UDO, 2012; CRAVEDI et al., 2013) e grilos; na medicina veterinária é utilizado contra carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*), pulgas (*Ctenocephalides felis felis*) (TINGLE et al., 2003; CID, 2012; CRAVEDI et al., 2013; GILL e DUMKA, 2013) e ácaros que infestam os animais domésticos, principalmente cães, gatos, equinos e bovinos (WILDE et al., 2001; TINGLE et al., 2003).

Ainda, é eficaz para o controle de cupins (CONNELLY, 2001) e, em ampla escala, contra gafanhotos (AAJOUD et al., 2003; CID, 2012), mosquitos, pulgas e carrapatos (CID, 2012), tanto para as larvas como para o estágio adulto (CONNELLY, 2001).

Pode ser utilizado em diversos tipos de cultura de alimentos (TANG et al., 2004), para controle de insetos de solo (AMARAL, 2012) em plantações de batata, cana de açúcar e milho; em sementes de arroz, cevada e feijão; na água para irrigação de arroz; e em folhas nas culturas de algodão, arroz, cana de açúcar, milho (COUTINHO et al., 2005), legumes e frutas (MANDAL et al., 2014). É utilizado ainda, como conservador de madeiras (COUTINHO et al., 2005; AMARAL, 2012).

Na saúde pública é utilizado para o combate de vetores de antroponozoonoses, como a larva do mosquito da dengue, o *Aedes aegypti* (FERREIRA et al., 2012).

A ampla utilização do fipronil tem exposto direta, ou indiretamente, à sua ação não só os organismos-alvo, mas também aqueles ditos não-alvos, como é o caso das algas, plantas aquáticas, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos, bem como o próprio ser humano (FERREIRA, 2010). Efeitos adversos também ocorrem em muitas situações agrícolas, onde a aplicação do fipronil no agro-ecossistema é muito comum (TINGLE et al., 2003).

Seu interesse como inseticida é que é eficaz em doses baixas a muito baixas, em comparação com outras substâncias ativas (GAUTHIER et al., 2008). Como exemplo, fipronil aplicado em sementes de arroz, na dose de 12,5 g de ingrediente ativo por hectare (ia/ha) é mais eficaz que o malation a 300 g ia/ha (GUNASEKARA et al., 2007).

Porém, por ser utilizado em aplicações domésticas e comercializado, preocupações recentes sobre seu potencial de causar efeitos adversos na saúde pública têm sido levantadas (DAS et al., 2006).

A exposição, por um pequeno intervalo de tempo, pode causar sérios efeitos sobre o desenvolvimento de fetos, tanto de animais como de humanos e, após o nascimento são observadas sequelas, como dificuldade de aprender, diminuição dos reflexos, esterilidade, além do aumento da suscetibilidade para câncer e outras doenças (AMARAL, 2012).

O fipronil é classificado toxicologicamente como classe II (Tabela 1) (ANVISA, 2005; SILVA, 2008; MARTINS, 2009; UDO, 2012).

TABELA 1. Classificação toxicológica dos agrotóxicos

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

Fonte: BRAIBANTE e ZAPPE, 2012.

É moderadamente tóxico para ratos e camundongos (HAINZL e CASIDA, 1996; UDO, 2012). A Dose Letal 50 (DL₅₀) oral para ratos Wistar é 97 mg/Kg (CONNELLY, 2001; TINGLE et al., 2003; GUNASEKARA et al., 2007; JACKSON et al., 2009; MARTINS, 2009; FERREIRA et al., 2012a; CID, 2012; MANDAL et al., 2014), podendo variar entre 40 e 100 mg/Kg (TANG et al., 2004; UDO, 2012).

Estudos realizados em ratos mostram a DL₅₀, oral, de 92 e 103 mg/Kg de peso corporal, em machos e fêmeas, respectivamente (UDO, 2012). Para camundongos, a DL₅₀ é de 91 (TINGLE et al., 2003) a 95 mg/Kg (MARTINS, 2009; CID, 2012).

A DL₅₀ do fipronil-dessulfinil (primeiro metabólito por fotodegradação) em ratos é 15 e 18 mg/Kg para fêmeas e machos, respectivamente (JACKSON et al., 2009).

Por via dérmica, o fipronil é levemente tóxico para ratos, com uma DL₅₀ superior a 2000 mg/Kg (CONNELLY, 2001; TINGLE et al., 2003; JACKSON et al., 2009; MARTINS, 2009; FERREIRA et al., 2012a; UDO, 2012) e 354 mg/Kg em coelhos (GUNASEKARA et al., 2007; MARTINS, 2009; CID, 2012; MANDAL et al., 2014).

Por via inalatória, apresenta alta toxicidade para ratos, com Concentração Letal 50 (CL₅₀) de 0,390 a 0,682 mg/L (CONNELLY, 2001; TINGLE et al., 2003; SILVA, 2008; CID, 2012).

Por via intraperitoneal (IP), ratos podem ir a óbito em doses acima de 50 mg/Kg. Em camundongos, a DL₅₀ do fipronil é de 41 mg/Kg de peso corporal

(SILVA, 2008; MARTINS, 2009) e, do composto fipronil sulfonado (metabólito), é de 50 mg/Kg (MARTINS, 2009).

Fipronil é altamente tóxico para abelhas (DL_{50} de 0,004 μ g/abelha), lagartos (DL_{50} para *Acanthodactylus dumerili* [Lacertidae] é de 30 μ g/g peso corporal) e galináceos (DL_{50} de 11,3 mg/Kg para codornizes do Norte) (TINGLE et al., 2003).

Embora seja considerado moderadamente tóxico para ratos e camundongos, estudos mostram que o fipronil pode ser classificado como tóxico de categoria II e III, dependendo da via de administração (UDO, 2012). Os sinais mais comuns de toxicidade nesta espécie são piloereção, postura arqueada, marcha anormal e diarreia (TINGLE et al., 2003; UDO, 2012).

Para organismos aquáticos invertebrados, peixes e para algumas espécies de aves o fipronil é altamente tóxico, porém não tóxico para aves aquáticas (DAS et al., 2006) com DL_{50} superior a 2150 mg/Kg de pato-real (TINGLE et al., 2003).

2.1.1.1 Toxicocinética do fipronil

Em ratos, após absorvido, o fipronil é rapidamente metabolizado (TINGLE et al., 2003; CID, 2012) e seus resíduos são amplamente distribuído para os tecidos e se deposita predominantemente em tecidos gordurosos (TINGLE et al., 2003; JACKSON et al., 2009; CID, 2012), onde permanecem em quantidades significativas, uma semana após a administração oral (TINGLE et al., 2003; CID, 2012).

Em estudo feito em ratos, após administração por via oral, o pico plasmático foi alcançado 5,5 horas após o tratamento; a meia-vida de eliminação foi de 183 horas em machos e 245 horas em fêmeas. O fipronil se distribuiu por todos os tecidos, com maior predomínio no tecido adiposo (MARTINS, 2009).

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

Devido às suas propriedades lipofílicas, o fipronil pode alcançar o sistema nervoso durante o desenvolvimento do feto (UDO et al., 2014).

Relativamente, pouco se sabe sobre a capacidade do fipronil ser metabolizado em vertebrados. Estudos *in vivo* de mamíferos indicam que a via metabólica principal para o fipronil envolve a formação oxidativa do metabólito sulfona (DAS et al., 2006; CID, 2012).

Estudos recentes com microssomas hepáticos humanos e isoformas do citocromo p450 (CYP) recombinantes demonstraram que a formação da sulfona é quase exclusivamente o resultado da atividade do CYP3A4. Embora limitado, o metabolismo por CYP2C19 também foi relatado. O metabólito sulfona, assim como produtos da fotodegradação, o fipronil-dessulfinil, foram relatados como sendo mais tóxicos para insetos, mamíferos, peixes e aves do que o próprio composto original (DAS et al., 2006; CID, 2012).

Tang et al. (2004), em seus estudos, concluíram que, o CYP3A4 é a principal enzima responsável pelo metabolismo do fipronil. Também constataram que a principal via metabólica ocorre por meio da oxidação do grupo tio éter para a formação do fipronil-sulfona e a enzima responsável pela oxidação é uma isoforma do citocromo p450.

In vitro, fipronil aumenta atividades de CYP1A1 e 3A4 em hepatócitos humanos. Em contraste, nenhum efeito claro de fipronil foi evidenciado nas atividades de microssomas de ratos e coelhos tratados com fipronil (1,2 e 5 mg/kg/d por 4 e 14 dias) (LEGHAIT et al., 2009).

Fipronil é metabolizado, principalmente, em sulfona (CABONI et al., 2003; SILVA, 2008; MARTINS, 2009; LACROIX et al., 2010), sulfeto, dessulfinil (CABONI et al., 2003; MARTINS, 2009) e amida por hidrólise (SILVA, 2008; MARTINS, 2009). Outro metabólito da transformação do fipronil resulta em ácido sulfônico, mas em menor grau (GAUTHIER et al., 2008).

A via predominante do metabolismo do fipronil é a oxidação, em sulfona correspondente. Esta reação, principalmente catalisada pelo citocromo p450 isoforma CYP3A4, pode ser considerada como uma via de bioativação uma vez que o metabólito sulfona é ativo (CRAVEDI et al., 2013).

A sulfona tem seis vezes mais afinidade do que o composto original para bloquear os receptores GABA no cérebro e vinte vezes maior potência em bloquear os canais de cloreto ativados pelo GABA em mamíferos (JACKSON et

al., 2009; CID, 2012; CRAVEDI et al., 2013) do que nos insetos (JACKSON et al., 2009), em comparação com o fipronil inalterado. Fipronil-sulfona também é suspeito de ser mais tóxico do que o fipronil em diferentes espécies. Além disso, o fipronil-sulfona persiste no sangue por muito mais tempo que o próprio fipronil (CRAVEDI et al., 2013).

Fipronil-dessulfinil, o primeiro metabolito ambiental (fotodegradação) do fipronil, é 9 a 10 vezes mais ativo sobre os canais de cloro de mamíferos do que o composto original, reduzindo a seletividade entre os insetos e humanos quando expostos para este metabólito (JACKSON et al., 2009; FERREIRA, 2010; FERREIRA et al., 2012, 2012a).

A concentração máxima do fipronil no sangue ocorre de 4 a 6 horas após sua ingestão (AMARAL, 2012), sendo metabolizado e excretado lentamente em ratos (CRAVEDI et al., 2013)..

O tempo de meia vida ($T_{1/2}$) longo do fipronil no sangue, de 150 a 245 horas em alguns casos, pode ser atribuído a liberação lenta de resíduos de gordura e pode sugerir potencial de bioacumulação de produtos metabólicos do fipronil (TINGLE et al., 2003; CID, 2012), pois, devido a intensa recirculação êntero-hepática, possui elevado tempo de meia-vida, tornando-se assim, um fator de acréscimo de sua toxicidade (SILVA, 2008).

Em uma pesquisa com ratos, o fipronil apresentou tempo de meia-vida em sangue total, após administração oral na dose de 4 mg/Kg, de 6,2 a 8,3 dias (JACKSON et al., 2009; CID, 2012).

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

2.1.1.2 Toxicodinâmica do fipronil

Os inseticidas utilizados nos últimos anos classificados como de segunda geração, são menos tóxicos e eles apresentam maior afinidade com receptores de insetos do que com os de mamíferos (SZEDEDI et al., 2005). Os

fenilpirazóis, como o fipronil, representam estes inseticidas de segunda geração (GAUTHIER et al., 2008).

A transmissão nervosa em vertebrados e invertebrados ocorre através da liberação de neurotransmissores. O ácido gama amino butírico (GABA) é o neurotransmissor inibitório mais comum do sistema nervoso central (SNC) e é derivado da descarboxilação do glutamato por glutamato descarboxilase. O GABA foi identificado e isolado nos mamíferos primeiramente em 1950 e está presente tanto no reino vegetal como no animal e em bactérias. No entanto, tem sido aceito como um neurotransmissor a partir da década de 1960, depois de um grande número de pesquisas, em lagostas e lombrigas (GAUTHIER et al., 2008).

O GABA regula a excitabilidade dos neurônios do SNC (IKEDA et al., 2004; SILVA, 2008; MARTINS, 2009) e por atuar em muitas vias diferentes do SNC e praticamente todos os neurônios serem sensíveis aos seus efeitos (UDO, 2012), tem sido associado a eventos fisiológicos e fisiopatológicos que envolvem a função e/ou a disfunção cerebral (SILVA, 2008; MARTINS, 2009; UDO, 2012).

O sistema receptor-GABA é responsável pela inibição da atividade neuronal anormal e previne o estímulo excessivo dos nervos. Quando a função desse sistema regulador é bloqueada, ocorre hiperexcitação neural e consequentemente morte do inseto (COUTINHO et al., 2005).

O fipronil é um potente desregulador do sistema nervoso central (SNC) (TINGLE et al., 2003; TERÇARIOL, 2007; UDO, 2012). Tem como principal efeito, atuar diretamente no SNC de mamíferos (OZOE et al., 2000) e insetos (OZOE et al., 2000; AMARAL, 2012) inibindo os receptores do GABA (COUTINHO et al., 2005), associados à canais de cloreto (SILVA, 2008).

O ingrediente ativo do fipronil tem um modo de ação único e exclusivo, devido à especificidade e precisão do local atingido no SNC. A transmissão do impulso nervoso nas células do SNC acontece em função da diferença de concentração de íons dentro e fora dessas células. O estabelecimento do equilíbrio iônico nas células do SNC é garantido graças ao GABA, que controla o fluxo de íons cloreto através da membrana da célula nervosa (AMARAL, 2012).

O fipronil age antagonizando o GABA (OZOE et al., 2000; AAJOURD et al., 2003; CID et al., 2012; CRAVEDI et al., 2013; GILL e DUMKA, 2013; UDO et al., 2014), através da interferência com a passagem de íons de cloreto (TINGLE et al., 2003; CID et al., 2012; GILL e DUMKA, 2013; UDO et al., 2014), alterando o equilíbrio iônico nas células do SNC (AMARAL, 2012). Ligam-se aos canais de cloreto inibindo o fluxo dos íons Cl^- para o interior da célula nervosa resultando na excitação excessiva do sistema nervoso, paralisia severa e morte do inseto (CID, 2012).

Os metabólitos sulfeto, sulfona e dessulfínil também atuam no receptor GABA e são biologicamente ativos (CID, 2012).

2.1.1.3 Efeitos toxicológicos do fipronil

Alguns estudos toxicológicos foram desenvolvidos com o fipronil. Ratos e camundongos expostos ao fipronil em dose única, por via oral ou inalação, apresentaram alterações de atividade ou marcha, aparência curvada, tremores e convulsões (JACKSON et al., 2009).

Ratos alimentados durante 52 semanas com o fipronil apresentaram apetite reduzido, redução do ganho de peso, convulsões e morte, alterações nos hormônios da tireóide, aumento de massas no fígado e tireóide, e, efeitos renais (JACKSON et al., 2009). A menor dosagem a apresentar efeito tóxico foi de 0,059 mg/Kg/d para machos e 0,078 mg/Kg/d para fêmeas (CID, 2012).

Outros estudos utilizando metabólitos do fipronil também foram realizados. Ratos foram alimentados com fipronil-dessulfínil nas doses 0, 0.5, 2.0, e 10 ppm por dois anos (0, 0.025, 0.098 e 0.050 mg/Kg/d para machos e 0, 0.032, 0.130, e 0.550 mg/Kg/d para fêmeas). A dose inicial de 10 ppm foi reduzida para 6 ppm nas fêmeas, após 26 semanas, devido ao aumento da mortalidade. Machos e fêmeas apresentaram aumento da incidência de agressividade e irritabilidade ao toque, na dose mais alta testada. Fêmeas também apresentaram aumento da salivação nas doses de 6 e 10, e convulsões, nas doses de 2, 6 e 10 ppm. Além disso, machos na dose de 10 ppm e fêmeas nas doses 2, 6 e 10 ppm, desenvolveram sinais clínicos de toxicidade, sem

evidência de carcinogenicidade. Nenhum efeito foi observado em doses abaixo de 0.5 ppm (0.025 mg/Kg/d) (JACKSON et al., 2009).

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

Em coelhos, a dose de 10 mg/Kg/dia, por um período acima de 21 dias causou diminuição do ganho de peso e consumo de alimento. Cães alimentados com fipronil na dose de 2,0 mg/Kg/dia apresentaram sinais clínicos de neurotoxicidade (JACKSON et al., 2009).

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

Além de causar efeitos neurotóxicos e reprodutivos quando aplicado em altas doses em espécies de laboratório e problemas nervosos leves em casos de intoxicação aguda de humanos, a exposição ao fipronil pode causar alteração na função da tireóide em ratos, produzindo neoplasia na glândula tireóide secundário ao desequilíbrio hormonal (CRAVEDI et al., 2013).

Isso ocorre, provavelmente, como resultado da sua capacidade de melhorar o metabolismo hepático dos hormônios tireoidianos e sua excreção (HURLEY et al., 1998; TINGLE et al., 2003; DAS et al., 2006; MARTINS, 2009). É possível que a indução de enzimas microsossomais possa desempenhar um papel no desenvolvimento de tumores (HURLEY et al., 1998; DAS et al., 2006).

A capacidade de produtos químicos induzirem enzimas metabólicas, incluindo o citocromo p450 (CYP), tem sido considerada uma das respostas bioquímica celulares mais sensíveis à agressão tóxica. Estudos recentes com hepatócitos humanos e ratos têm demonstrado que os praguicidas são capazes de induzir muitas enzimas metabólicas nestas células (DAS et al., 2006).

Além destes efeitos, o fipronil também provoca efeitos de toxicidade reprodutiva (U.S.EPA, 1996), hepatotoxicidade (SOUSA et al., 1997), alterações comportamentais (TERÇARIOL e GODINHO, 2011) e desregulação endócrina (U.S.EPA, 1998; UDO, 2012).

O fipronil foi associado a efeitos reprodutivos em 95,4% dos ratos alimentados continuamente com 300 ppm de fipronil na dieta. Redução do tamanho da ninhada, diminuição do peso corporal, diminuição da percentagem de acasalamento dos animais, redução no índice de fertilidade, redução da sobrevivência pós-implantação e sobrevivência dos descendentes pós-parto e atraso no desenvolvimento físico foram observados (CID, 2012).

Em vertebrados, em geral, além da sua atuação no sistema nervoso, o fipronil interfere também, na morfologia de outros órgãos, como é o caso do fígado e hipófise, porém, poucos estudos demonstraram estes tipos de efeitos do fipronil (FERREIRA, 2010).

Tendo em vista a ação tóxica do fipronil sobre o GABA levando as alterações do funcionamento do sistema nervoso central promovendo neurotoxicidade e, que avaliação neurocomportamental tem sido utilizada como indicador biológico de função para estudar neurotoxicidade por agentes químicos, estudos que avaliem o comportamento de animais expostos ao fipronil são fundamentais (TERÇARIOL, 2007).

2.2 Toxicologia do desenvolvimento

A toxicologia do desenvolvimento é um termo relativamente recente encontrado dentro da toxicologia reprodutiva (UDO, 2012). No entanto, ela tem suas raízes relacionadas à teratologia, termo utilizado antigamente para denominar alterações de ordem estrutural no conceito (GÓRNIK et al., 2008), ligadas a perturbações do desenvolvimento embrionário ou fetal, estudando suas anomalias e malformações (UDO, 2012).

De modo geral, a toxicologia reprodutiva dedica-se ao estudo de fatores que possam alterar o sistema reprodutor, o desenvolvimento do embrião e feto e o desenvolvimento pós-natal da prole (SANTOS, 2011).

Portanto, toxicologia do desenvolvimento é a área que estuda os efeitos nocivos causados por agentes tóxicos no conceito em desenvolvimento (UDO, 2012) decorrentes da exposição à substâncias químicas antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal ou pós-natal, até a puberdade. Os efeitos gerados pela exposição pré e perinatal podem levar a distúrbios irreversíveis, pois as alterações são produzidas durante a formação ou diferenciação dos órgãos (GEHLEN, 2003).

De acordo com a toxicologia, toda substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição (GEHLEN, 2003; RIGHI et al., 2008), como a dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição (dose única ou múltipla) e via de aplicação (BRANCO, 2009), incluindo ainda, as propriedades físico-químicas e suscetibilidade individual (RIGHI et al., 2008). O nível de ação de um teratogênio está ancorado em três princípios: período crítico do desenvolvimento; dosagem da droga ou do composto químico; e constituição gênica do embrião (FERNANDES, 2009).

Uma substância teratogênica é definida como aquela que aumenta a ocorrência de anormalidades funcionais ou estruturais da prole, em decorrência da administração de uma substância química às mães antes da concepção, durante a prenhez ou diretamente no organismo fetal em desenvolvimento (RIGHI et al., 2008).

Sabe-se que o tipo de efeito teratogênico produzido pelos agentes químicos deve-se, em parte, à quantidade do agente ao qual o organismo é exposto, principalmente no período da gestação e, conseqüentemente, no estágio de evolução do feto quando se administra esse composto (RIGHI et al., 2008).

A toxicidade de uma substância a um organismo vivo pode ser considerada como a capacidade de lhe causar algum desequilíbrio, dano grave ou morte (GEHLEN, 2003; BRANCO, 2009), ou seja, o efeito promovido por um agente tóxico em um determinado animal está basicamente relacionado com a concentração do tóxico no sítio de ação ou tecido (FLÓRIO e SOUSA, 2008).

Os efeitos de um agente ambiental sobre o embrião ou o feto dependem da natureza física ou química do agente, além de vários outros fatores, como a dose, via e período de exposição e da gestação, a susceptibilidade genética

materna ou embriofetal e a presença e natureza de exposições simultâneas (ROMAN, 2011).

As manifestações do desenvolvimento anormal podem ir desde um distúrbio funcional até a morte (FAVERO, 2006). Malformações não significam apenas anormalidades em tecidos, mas também anormalidades bioquímicas. Atualmente a teratologia também abrange as manifestações no retardo do crescimento, alterações funcionais e comportamentais e/ou morte da prole (UDO, 2012).

Entre os efeitos tóxicos no desenvolvimento de animais após exposição às diferentes substâncias teratogênicas, estão: malformações geniturinárias, criptorquidismo, hipoplasia dos dígitos, baixo peso ao nascer, fenda palatina, anormalidades esqueléticas, malformações oculares, exoftalmia, microftalmia, anomalias faciais, anomalias do crânio, defeitos no tubo neural, dano no VIII par de nervos cranianos (surdez, desequilíbrio – antibióticos aminoglicosídeos – ototoxicidade), retinopatia, icterícia neonatal, malformação mandibular, hemorragias cerebrais, hidrocefalia, microcefalia, anormalidades do sistema nervoso central, abortos ou reabsorções, anormalidades cardíacas, hemorragias, braquignatia, retardo de crescimento e embriofetalidade (GEHLEN, 2003).

As anomalias do sistema nervoso central, dos órgãos reprodutivos e do sistema imune ocorrem com frequência decorrente da exposição à teratógenos. Neste sentido, o defeito observado seria, por exemplo, de distúrbios comportamentais ou mentais, deficiência motora, queda na fertilidade e imunodeficiência ou aparecimento de doenças autoimunes (GORNIK et al., 2008).

A presença das anomalias ósseas é bem provável, pois o período de organogênese do esqueleto é longo (GEHLEN, 2003).

A resposta ao teratógeno é amplamente dependente do genótipo do embrião. A talidomida, por exemplo, é teratogênica para humanos, coelhos e macacos e não ao rato. Outro exemplo é metotrexato, sendo este teratogênico para ratos e não para macacos e humanos (GEHLEN, 2003).

Nem todas as espécies animais são igualmente suscetíveis ou sensíveis ao efeito tóxico de determinada substância química. Neste sentido, deve-se considerar que uma substância que atua causando malformação em uma

espécie pode ter pouco ou nenhum efeito deletério em outra (GÓRNIAK et al., 2008).

Considera-se, ainda, que a substância química pode produzir efeitos similares em diferentes espécies animais, embora essas alterações variem na frequência. Além disso, uma substância que produz determinada alteração em uma espécie animal pode acarretar alterações completamente diferentes em outras (GÓRNIAK et al., 2008).

A exposição materna a agroquímicos durante a fase reprodutiva pode levar a alterações no desenvolvimento animal. Embora o organismo materno possa transformar o químico ou pelo menos reduzir sua concentração, a grande maioria das substâncias pode atravessar a barreira placentária (CASTRO, 2006).

Antigamente, acreditava-se que o útero era intransponível a agentes externos e que a placenta constituía-se em verdadeira barreira entre o organismo materno e o organismo fetal. O conceito de que o feto estaria pouco exposto a substâncias utilizadas pela gestante foi abalado apenas no início da década de 60, pela “tragédia da talidomida”, sedativo usado para diminuir as náuseas em mulheres grávidas. Quantidades pequenas, como as referentes a uma simples dose, foram suficientes para causar defeitos significativos ao nascimento. Os fetos apresentaram intestinos malformados, defeitos na audição, agenesia de orelhas, anomalias renais e oculares (FAVERO, 2006).

No entanto, o fenótipo que mais chamou a atenção foi a focomelia, síndrome caracterizada pela aproximação ou encurtamento dos membros junto ao tronco do feto. Como seu uso havia se mostrado seguro em várias espécies animais, foram necessários vários anos e altas taxas de malformações (20 a 30%) para a confirmação dos seus efeitos adversos em humanos (FAVERO, 2006).

Atualmente, sabe-se que compostos tóxicos, presentes no sangue materno, facilmente atravessam a barreira placentária e atingem a corrente sanguínea do feto (FAVERO, 2006; ROMAN, 2011).

Embora o organismo materno seja capaz de alterar uma substância química ou pelo menos, reduzir sua concentração, sabe-se que as funções protetoras da placenta são limitadas. Neste sentido, determinados xenobióticos,

além de afetarem diretamente o desenvolvimento pré-natal, podem causar sequelas que só serão detectadas na vida adulta do animal (ROMAN, 2011).

A placenta, constituída por membrana lipídica, permite a transferência de substâncias de maneira bidirecional entre o compartimento fetal e o materno. Embora existam diferenças significantes nos tipos de placenta, considerando-se as várias espécies animais, essas diferenças parecem não exercer papel preponderante na passagem das diferentes substâncias químicas através da placenta (GORNIAK et al., 2008).

Dessa forma, a maior importância nesse aspecto reside na possibilidade dessas substâncias serem transportadas e chegarem até o feto, devendo ser considerado as propriedades físico-químicas dos toxicantes, como lipossolubilidade, peso molecular, ligação proteica, enzimas placentárias que realizam biotransformação do xenobiótico, entre outras (GORNIAK et al., 2008).

Por mais que a placenta forneça proteção ao feto, produtos químicos industriais como praguicidas, podem atravessá-la e concentrar-se no sistema nervoso fetal, por vezes, em concentrações ainda mais elevadas do que no organismo materno. Alguns destes produtos químicos são lipofílicos e, por conseguinte, tendem a ser mantidos em órgãos com elevada concentração de lipídios, tais como o encéfalo (JULVEZ e GRANDJEAN, 2009).

Quando uma gestante ingere ou recebe qualquer medicamento, dois organismos serão afetados, sendo que um deles, o organismo embriofetal, ainda não tem a mesma capacidade de metabolizar as substâncias que a mãe, pois não possui os sistemas corporais plenamente desenvolvidos, estando, portanto, sujeito a efeitos negativos não esperados (FAVERO, 2006).

Embora os embriões de mamíferos estejam bem protegidos no útero, agentes ambientais teratogênicos podem causar perturbações no seu desenvolvimento após a exposição da mãe a eles (FERNANDES, 2009).

A avaliação dos possíveis efeitos decorrentes da exposição aos agroquímicos é importante de ser realizada em diferentes períodos de desenvolvimento, devido a possível influência na morfologia e conexão sináptica nos alvos neuronais (CASTRO, 2006a).

Atualmente, nos estudos de toxicologia do desenvolvimento é importante também considerar a teratologia comportamental, segundo a qual, a exposição a diversos fatores ambientais durante o desenvolvimento ou maturação cerebral

do indivíduo, pode ocasionar alterações comportamentais tardias, manifestadas no decorrer da vida pós-natal. Por isso, avalia-se também o desenvolvimento físico, sensorial e comportamental do indivíduo (UDO, 2012).

A suscetibilidade a alterações morfológicas aumenta à medida que as camadas germinativas começam a se diferenciar, ocorrendo com maior probabilidade no início da organogênese, fim do primeiro terço da gestação (GEHLEN, 2003).

As alterações funcionais afetam processos homeostáticos ou metabólicos, como exemplo, o desenvolvimento e ativação de uma enzima específica, e ocorre após o final da organogênese. As alterações funcionais podem acontecer sem alterações morfológicas detectáveis (GEHLEN, 2003).

Como todos os efeitos tóxicos, os efeitos teratogênicos geralmente são dose-dependentes (GEHLEN, 2003), logo, aumentando a dose, deve-se verificar um aumento da toxicidade. Dessa forma, o feto pode não demonstrar nenhum efeito ou apresentar um efeito mais grave, como o óbito (efeito letal) (GORNIAK et al., 2008).

O toxicante deve produzir seus efeitos embriotóxicos em níveis de doses que não provoquem toxicidade para a mãe, pois se houver toxicidade materna, a dismorfogênese poderá decorrer do efeito primário tóxico materno, o que não é considerado teratogenicidade (GORNIAK et al., 2008).

Os agentes químicos podem afetar o ciclo reprodutivo em qualquer fase podendo causar alterações parentais e também efeitos teratogênicos na prole (UDO, 2012). O período de desenvolvimento do embrião e do feto consiste em diversas mudanças, sendo estas, marcadas por fases (GEHLEN, 2003).

É fundamental o conhecimento das etapas do desenvolvimento embrionário, pois alguns estágios do desenvolvimento são mais vulneráveis que outros. É importante salientar que normalmente os agentes atuam não apenas em uma estrutura específica, mas em um grande número de estruturas que estão se definindo durante determinado momento (FAVERO, 2006).

A exposição a agentes tóxicos durante poucas horas após a fertilização pode produzir malformação fetal. Há casos em que a exposição ao toxicante durante a fase de pré-implantação leva às malformações. São exemplos, a administração de metilnitrosurea a camundongos, entre os dias dois e quatro de

gestação, e a administração de ciproterona, no segundo dia de prenhez (GORNIAK et al., 2008).

A gestação do rato dura aproximadamente 21 a 23 dias, sendo dividido em três períodos: pré-implantação, abrange do 1° ao 5° dias de gestação, caracterizado pela formação do blastocisto e início da implantação; organogênico, do 6° ao 15° dias de gestação, havendo o término da implantação e período de formação dos tecidos e órgãos; fetal, do 16° ao 21° dias de gestação, no qual o feto já com os órgãos formados, inicia seu crescimento intrauterino, com maturação funcional dos órgãos (GRANCE, 2007).

O período crítico do desenvolvimento para o aparecimento de malformações é o período da organogênese, quando tecidos e órgãos estão se diferenciando rapidamente, ficando susceptíveis à interferência de agentes externos capazes de alterar seu desenvolvimento (GRANCE, 2007).

Para cada estrutura formada, existem picos de susceptibilidade ao aparecimento das malformações (UDO, 2012). No rato, por exemplo, o ácido acetilsalicílico só é capaz de produzir fenda palatina se o feto for exposto entre o 10° e 16° dias de gestação, período em que se forma o palato. Quanto maior for o período de formação de um determinado sistema maior será o risco de seu desenvolvimento ser afetado por um determinado agente (GEHLEN, 2003).

Na organogênese ocorre a formação da placa neural, diferenciação das camadas de células e a formação de órgãos (UDO, 2012). Os medicamentos, quando utilizados no período de organogênese, podem levar à teratogênese, se a lesão for compatível com a vida do animal; ou à embrioletalidade, caso não seja (GEHLEN, 2003).

Neste período podem ocorrer as anormalidades maiores (olhos, cérebro, coração e arcos aórticos, esqueleto axial, palato, sistema urogenital). Elas exigem tratamento cirúrgico ou deixam sequelas funcionais importantes (GEHLEN, 2003).

No período fetal podem ocorrer defeitos estruturais ou defeitos funcionais provocados pela lesão (GORNIAK et al., 2008). Neste período podem ocorrer anormalidades morfológicas menores e funcionais, pois os órgãos já estão formados. Este é o período de maturação e diferenciação do cérebro, que vai do final da organogênese até o período neonatal (GEHLEN, 2003).

Nos ratos, no período neonatal, que ocorre após o nascimento e se estende do 1º ao 21º dia (lactação) ocorrem a maturação de receptores, diferenciação sexual do encéfalo, formação de sistemas enzimáticos (GEHLEN, 2003) e ganho de peso corporal, os quais podem sofrer prejuízos com a exposição a substâncias químicas. O período mais importante do desenvolvimento cerebral do rato ocorre nas duas primeiras semanas pós-natais (CASTRO, 2006).

Apesar da diversidade de estudos existentes, os efeitos dos agroquímicos na saúde nem sempre são bem conhecidos. Muitos desses agentes afetam o sistema reprodutor, efeitos esses confirmados em testes experimentais incluindo gestação, parto, lactação, desmame, crescimento e desenvolvimento da prole. Sabe-se, por exemplo, que a exposição da fêmea a agroquímicos durante a prenhez e a lactação pode causar alterações refletidas em aspectos físicos e comportamentais, de acordo com o período do desenvolvimento animal (TERÇARIOL, 2007).

As manifestações de toxicidade, quando organismo são expostos a agentes químicos durante o seu desenvolvimento, ou seja, no período perinatal, podem ser observadas em qualquer momento da vida do animal (UDO, 2012).

2.3 Biomarcadores e bioindicadores

O biomarcador compreende toda substância ou seu produto de biotransformação ou qualquer alteração bioquímica precoce cuja determinação possa ser realizada nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado (CASTRO, 2006). Já os estudos de alterações fisiológicas, comportamentais ou de sobrevivência em um organismo, ou em uma população, constituem-se como bioindicadores (JONSSON e CASTRO, 2005). Esta determinação deve estabelecer a relação entre a exposição a agentes químicos e o efeito tóxico refletida em alterações pré-clínicas e agravos à saúde ou ainda permitir entender os mecanismos relacionados à ação tóxica e o grau de resposta nos indivíduos (CASTRO, 2006).

Os organismos, quando expostos a situações de ameaça e perigo, respondem com uma série de respostas adaptativas, físicas e mentais que se opõe aos estímulos estressores na tentativa de manter a homeostasia (BENETTI, 2005).

2.3.1 Desenvolvimento físico e sensório-motor

Segundo dados prévios da literatura, a exposição de fêmeas aos praguicidas durante a prenhez e a lactação pode causar alterações refletidas em aspectos físicos e comportamentais, de acordo com o período do desenvolvimento animal (KIMMEL, 1998; CHELONIS et al., 2004; COSTA et al., 2004).

O período neonatal representa a fase final do período perinatal, tem seu início ao nascimento da prole e é finalizado com o término da lactação. Nesse período ocorre o ganho de peso corporal (Figura 2), peso este que pode sofrer redução com a exposição às substâncias químicas (CASTRO, 2006a).

A observação da presença ou ausência dos parâmetros de desenvolvimento físico e sensório-motor são importantes em estudos toxicológicos. São observados, por filhote, os dias respectivos em que ocorrerem, por exemplo, aparecimento de pelo (Figura 3), erupção dos dentes incisivos (Figura 4), descolamento de orelha (Figura 5), abertura dos olhos (Figura 6) e descida dos testículos (Figura 7) (CASTRO 2006). Efeitos pós-natais mediados por agentes químicos encontrados no leite materno podem provocar desenvolvimento físico alterado nos filhotes (SALVATORI et al., 2004).

A preensão palmar (Figura 8) é um reflexo medular que tende a desaparecer no decorrer da vida pós-natal dos filhotes. Por sua vez, os ajustes posturais são regulados por três sistemas: o vestibular, exteroceptivo e proprioceptivo. O reflexo postural (Figura 9) e a geotaxia negativa (Figura 10) de ratos jovens refletem o desenvolvimento motor e atividades controladas pelo sistema vestibular. A integridade do sistema vestibular também pode ser avaliada por meio da atividade motora geral do animal (UDO, 2012).

FIGURA 2. Pesagem dos filhotes.



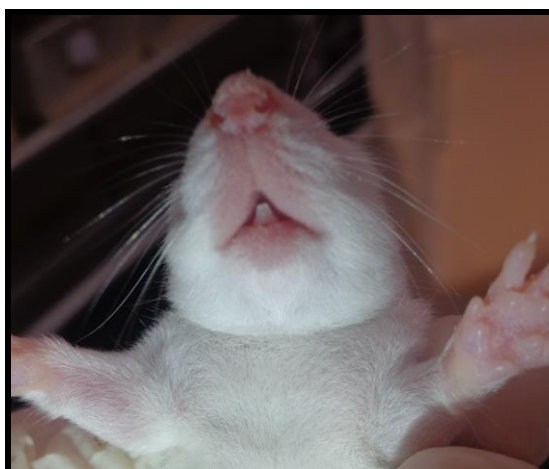
Fonte: Arquivo pessoal.

FIGURA 3. Aparecimento de pêlos.



Fonte: Arquivo pessoal.

FIGURA 4. Erupção dos dentes incisivos.



Fonte: Arquivo pessoal.

FIGURA 5. Descolamento de orelha.



Fonte: Arquivo pessoal.

FIGURA 6. Abertura dos olhos.



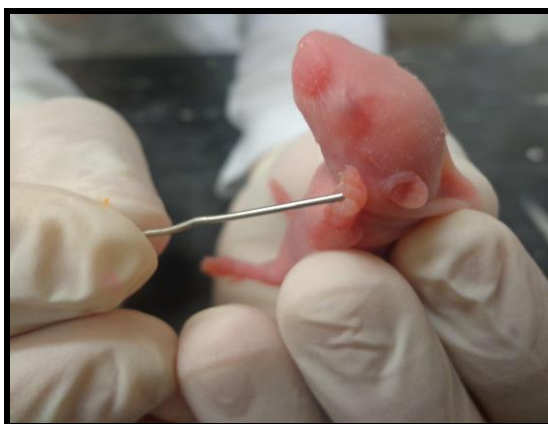
Fonte: Arquivo pessoal.

FIGURA 7. Descida dos testículos.



Fonte: Arquivo pessoal.

FIGURA 8. Reflexo de preensão palmar.



Fonte: Arquivo pessoal.

FIGURA 9. Reflexo postural/endireitamento.



Fonte: Arquivo pessoal.

FIGURA 10. Reflexo geotaxia negativa.



Fonte: Arquivo pessoal.

2.3.2 Avaliação neurocomportamental

Investigações neurofisiológicas podem ser importantes, nos casos em que os animais ou os seres humanos são expostos quer a baixas doses de produtos químicos para um longo período de tempo, ou para uma única dose elevada, durante um acidente (SZEDEDI et al., 2005).

A avaliação neurocomportamental é realizada através de métodos para avaliar as funções cognitivas como a aprendizagem e a memória. Há várias evidências experimentais mostrando que, na progressão de doenças neurotóxicas, os eventos bioquímicos precedem as alterações estruturais e danos permanentes ao sistema nervoso central (CASTRO, 2006).

O estudo do desenvolvimento comportamental dos filhotes permite a avaliação da maturidade dos sistemas que controlam os diversos reflexos (UDO, 2012).

Comportamento tem sido utilizado como um bioindicador de função para estudar efeitos tóxicos de agentes químicos. Alterações do comportamento em animais expostos a um determinado agente químico podem servir como indicativo de que a substância provoca neurotoxicidade. A importância de estudos neurocomportamentais reside no fato de que comportamento é considerado como um produto final funcional de vários processos sensoriais, motores e integrativos, que ocorrem no sistema nervoso (TERÇARIOL, 2007).

Embora vários estudos procurem compreender os mecanismos da toxicidade neuronal dos praguicidas em mamíferos, há poucos relacionados aos efeitos neurocomportamentais e estes podem ser úteis para avaliar os efeitos das exposições às substâncias químicas (MARTINS, 2009).

Um dos comportamentos estudados relacionados à neurotoxicidade por agentes químicos é o de aprendizagem-memória. Aprendizagem é o processo através do qual o organismo adquire conhecimento sobre o mundo. Já memória é o processo pelo qual o conhecimento é codificado, retido e, posteriormente, recuperado (AZEVEDO, 2010). A capacidade de formar, manter e utilizar as memórias é uma propriedade fundamental do cérebro (BAVARESCO, 2008).

Evidências na literatura apontam para o envolvimento do glutamato, GABA, bem como de proteínas cinases nos processos iniciais de formação da memória, seguidos de mecanismos hormonais e neuro-humorais. Lesões em

estruturas centrais, como, o estriado, podem alterar as fases de aquisição, consolidação e evocação da memória (BAVARESCO, 2008).

O sistema GABAérgico está envolvido em processos cognitivos como aprendizado e memória. Assim, drogas que atuam no sistema GABAérgico promovem prejuízo na formação da memória, quando administradas diretamente no ventrículo lateral, prosencéfalo basal, hipocampo e amígdala (AZEVEDO, 2010).

Prejuízos cognitivos como deficiência no aprendizado e memória espacial são frequentemente atribuídos a danos em estruturas diencefálicas e corticais, como tálamo, hipocampo e córtex pré-frontal. Além disso, a severidade da deficiência de aprendizado e memória espacial são dependentes do grau de lesão diencefálica e cortical. O córtex pré-frontal possui papel fundamental na memória, pois em modelos animais, lesões nesta estrutura ocasionam piora na recuperação e ordenamento temporal de memórias. O hipocampo, estrutura do lobo temporal medial, é uma área que desempenha função importante no processo de memória dos mamíferos e torna-se especialmente relevante quando é necessário combinar e relacionar informações de múltiplas fontes para tarefas de memória espacial. Em humanos, macacos e roedores, danos na região hipocampal provocam prejuízos no desempenho em uma variedade de tarefas de aprendizado e memória (AZEVEDO, 2010).

Para estudar os mecanismos envolvidos com a memória, diversas tarefas experimentais têm sido propostas (BAVARESCO, 2008), tais como teste de reconhecimento de objetos e teste do labirinto octogonal.

O teste de reconhecimento de objetos (Figura 11) é um teste de memória com base na propensão natural dos roedores para explorar novidade, que confere aos animais a capacidade de discriminar entre o que é familiar e o que é novo. A consolidação da memória ocorre principalmente no hipocampo, embora outras estruturas do cérebro e uma variedade de neurotransmissores desempenham um papel no processamento da memória (SILVEIRA et al., 2013).

Este teste é muito usado para avaliar a capacidade de memorizar e reconhecer objetos novos e já conhecidos (NEVES, 2010). É especialmente adequado para testar os efeitos de intervenções farmacológicas sobre a aprendizagem e memória (SILVEIRA et al., 2013).

FIGURA 11. Reconhecimento de Novo Objeto.



Fonte: Arquivo pessoal.

A formação do hipocampo medeia vários aspectos da função cognitiva, incluindo a aprendizagem espacial, a formação e a recuperação de memórias. Estudos têm mostrado que, quando as lesões que englobam o hipocampo forem superior a 75%, o reconhecimento é significativamente prejudicado, confirmando assim que o hipocampo desempenha um papel crucial no reconhecimento de objetos (STANLEY et al., 2012).

Glutamato, GABA e acetilcolina (ACh) desempenham um papel importante na formação da memória no hipocampo, como é evidenciado pelo comprometimento da aprendizagem após a administração de antagonistas para os seus respectivos receptores (STANLEY et al., 2012).

No teste do labirinto octogonal (Figura 12) onde a utilização pelo animal, de pistas visuais colocadas estrategicamente na sala, permite-lhe aprender e memorizar espacialmente como reconhecer um trajeto para um braço onde está colocado determinado tipo de reforço, como um alimento, por exemplo (OLTON, 1987). Os animais são treinados a reconhecer o aparelho e, numa segunda etapa, induzidos a encontrar o reforço. Os ratos apresentam relativo aprendizado em diferenciar os braços já visitados daqueles não visitados (memória de trabalho) enquanto aprendem a localizar o braço onde sempre está a comida (memória de referência) (STOLBERG, 2005).

FIGURA 12. Labirinto Octogonal.



Fonte: Arquivo pessoal.

Outro dos aspectos da neurotoxicidade que podem ser estudados através dos testes comportamentais é o da ansiedade/emocionalidade. Algumas tarefas experimentais têm sido utilizadas para estudar este componente comportamental.

A arena de campo aberto (Figura 13) é o mais antigo dos testes de ansiedade que são baseados na exploração espontânea de um novo ambiente (BEHR et al., 2009). O campo aberto foi criado em 1934 e é utilizado para avaliar a atividade locomotora, exploração e emocionalidade de roedores (MARTINS, 2009). Nele, o animal com ansiedade elevada demora para utilizar o centro do aparelho, já que deambular junto às paredes lhe traz maior sentido de proteção (MARTINS, 2009).

Um dos fatores relevantes na observação do comportamento do animal é a sua tendência a movimentar-se, conhecida como atividade geral. A quantificação dessa locomoção pode refletir o comportamento, uma vez que o animal permanecerá imóvel (*freezing*) quando apresentar alto grau de ansiedade. Nesse sentido, a exploração do roedor é inversamente proporcional ao medo ou emocionalidade (UDO, 2012).

Além da locomoção, o comportamento de levantar (animal apoiado nas patas traseiras, eleva o tronco para farejar o ambiente verticalmente) é a manifestação de um processo exploratório de aproximação das regiões modificadas do ambiente (SILVA, 2008; MARTINS, 2009; UDO, 2012).

FIGURA 13. Arena de Campo Aberto.



Fonte: Arquivo pessoal.

O comportamento de auto-limpeza (*grooming*) observado no campo aberto, tem sido tomado como a expressão de um decréscimo na emocionalidade e mostra independência das situações de medo (MARTINS, 2009; UDO, 2012).

O teste de campo aberto é considerado como um indicador do estado emocional do animal e é comumente utilizado para triagem farmacológica de drogas que atuam sobre o sistema nervoso central (TERÇARIOL, 2007).

O teste de labirinto em cruz elevado (LCE) (Figura 14) foi criado por Montgomery em 1955 e é um dos principais modelos usados no estudo da ansiedade. Esse teste é baseado no comportamento exploratório de locais novos e na observação de respostas comportamentais em situações que poderiam ou não provocar perigo; ele consiste em analisar o grau de aversão do animal aos braços abertos, em conflito com o comportamento exploratório (UDO, 2012), já que ambientes abertos, sem proteção lateral, são naturalmente aversivos para o roedor (MARTINS, 2009).

A exposição aos braços abertos do LCE produz significativamente mais ansiedade quando comparada à exposição aos braços fechados. Drogas ansiolíticas elevam o tempo gasto pelos roedores nos braços abertos quando comparados com o tempo gasto nos braços fechados e, em contraste, drogas ansiogênicas diminuem o tempo gasto nos braços abertos (SILVA, 2008; MARTINS, 2009).

FIGURA 14. Labirinto em Cruz Elevado.



Fonte: Arquivo pessoal.

O LCE é um excelente modelo para avaliar as drogas com ação GABAérgica e via glutamato (MARTINS, 2009). O GABA tem sido associado com amplo espectro de funções fisiológicas e em estados de doenças incluindo ansiedade e depressão (SILVA, 2008; MARTINS, 2009). O labirinto foi validado farmacologicamente por Pellow em 1985 (MARTINS, 2009).

Os comportamentos ofensivos e defensivos de ratos têm elos comuns com a agressão humana, sendo utilizados tanto em estudos de neurofisiologia e neurofarmacologia da agressão, como em modelos de transtornos psiquiátricos (PÓVOA, 2007).

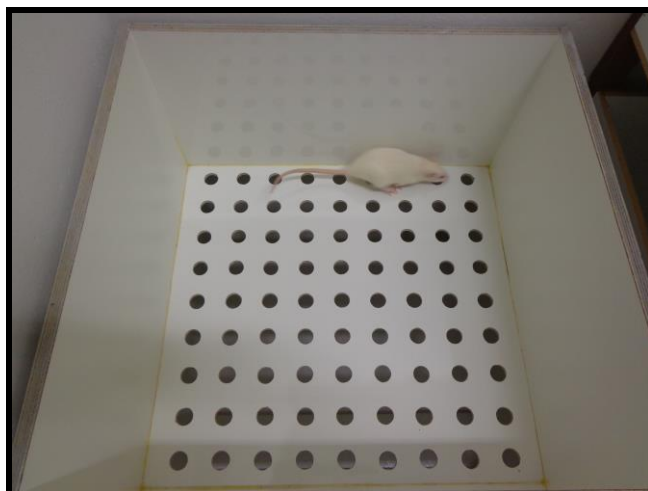
Os comportamentos agressivos de ratos podem ser induzidos por estimulação do hipotálamo lateral ou lesões do bulbo olfatório, núcleo amigdalóide, região septal e hipotálamo. Os efeitos das lesões sobre comportamentos agressivos variam conforme a localização da lesão (PÓVOA, 2007).

O comportamento agressivo pronunciado de ratos de laboratório é acompanhado por um elevado nível de atividade neuronal dentro do núcleo paraventricular (BEIDERBECK et al., 2012). De acordo com estes autores, os maiores níveis de agressão em ratos de laboratório machos são acompanhados por uma atividade neuronal excessiva. Além disso, de acordo com Serra (2010), com o aumento no nível de cortisol ocorre também um aumento da agressividade. O modelo do paradigma do rato residente-intruso foi utilizado

para avaliação da agressividade de acordo com o descrito em Terçariol et al. (2011). Esse método permite a observação da interação social e comportamento ofensivo do animal residente bem como elementos defensivos do intruso refletindo a agressão intraespecífica (KOOLHAAS e BOHUS, 1991).

O aparelho Hole-Board (Figura 15) oferece um método simples de medir as respostas de um rato a um ambiente novo e tem sido amplamente utilizado para avaliar os efeitos de drogas (FILE e WARDILL, 1975). Trata-se de um aparelho que tem sido utilizado para avaliar comportamentos de coordenação motora e comportamento exploratório frente à exposição de agentes químicos neurotóxicos (KUC et al., 2006; GODINHO et al. 2014).

FIGURA 15. Hole-Board.



Fonte: Arquivo pessoal.

2.3.3 Perfil bioquímico

Com frequência, a avaliação bioquímica sérica é utilizada para avaliar a saúde de pacientes mamíferos não domésticos (THRALL, 2006). Na experimentação animal, esta avaliação pode ajudar a entender e às vezes caracterizar a relação de processos danosos que compõem o quadro geral de intoxicação.

2.3.3.1 Acetilcolinesterase (AChE)

A AChE é a enzima envolvida na hidrólise de acetilcolina, localizada preferencialmente em neurônios e axônios. A atividade da AChE tem sido relacionada com ações colinérgicas e não colinérgicas tais como, por exemplo, o crescimento axonal e a sinaptogênese, bem como em processos neurodegenerativos (BAVARESCO, 2008). Além disso, modificações nas funções colinérgicas parecem estar associadas a prejuízos na memória/aprendizado (BAVARESCO, 2008; GONÇALVES, 2012).

As concentrações de acetilcolina (ACh), como os inibidores da acetilcolinesterase (AChE), são ferramentas terapêuticas conhecidas para melhorar deficiências cognitivas associadas com doenças neurodegenerativas (SILVEIRA et al., 2013).

2.3.3.2 Perfil hepático

As enzimas presentes em amostras séricas ou de plasma comumente utilizadas no diagnóstico de doença hepática em roedores incluem Fosfatase Alcalina (ALP), γ -glutamilttransferase (GGT), Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT) Lactato Desidrogenase (LDH) e Sorbitol Desidrogenase (SDH). A concentração sérica ou plasmática dessas enzimas aumenta quando há maior produção, maior liberação ou menor *clearance* da enzima (THRALL, 2006).

AST é uma enzima citosólica e mitocondrial com alta atividade no fígado, no coração, no músculo esquelético e nos rins. O aumento da atividade plasmática ou sérica de AST geralmente está associado à lesão de fígado, músculo cardíaco ou músculo esquelético (THRALL, 2006).

A ALT é utilizada como marcadora da função hepática. O aumento da atividade sérica desta enzima é considerado indicador de danos nas células do fígado de mamíferos (SILVA, 2010).

Na maioria dos roedores, a atividade sérica ou plasmática de ALT aumenta com lesão hepatocelular; a enzima parece ser específica de fígado de ratos e camundongos. Em ratos, existe correlação entre o aumento da atividade

sérica de ALT e o grau de necrose hepática. Como curiosidade, verifica-se o aumento de três vezes na atividade plasmática de ALT de camundongos contidos manualmente pelo corpo, em comparação com aqueles seguros pela cauda (THRALL, 2006).

2.3.3.3 Cortisol

A resposta primária de estresse é a ativação dos centros cerebrais, o que resulta em liberação de catecolaminas e corticosteroides, este último representado pelo cortisol. A elevação do cortisol no sangue pode ser considerada um indicador de estresse (SERRA, 2010).

A presença de estresse agudo leva a alteração na concentração plasmática do cortisol. Em resposta a este estímulo ocorre aumento na secreção deste hormônio, e os seus níveis plasmáticos podem atingir valores até seis vezes superiores em relação ao valor basal, sendo que esta elevação é proporcional à gravidade do desequilíbrio da homeostase (MELLO, 2007).

De acordo com Dietrich et al. (2013), em crianças níveis maiores de cortisol estão relacionados com a ansiedade e níveis mais baixos de cortisol associados com a agressão.

2.3.4 Avaliação histopatológica

A análise histológica é uma importante ferramenta nos estudos toxicológicos, uma vez que alterações na estrutura e organização das células, tecidos e órgãos permitem a identificação da lesão tissular e orgânica, essencial na definição dos padrões morfológicos e clínicos da doença (GRANCE, 2007).

A utilização de técnicas de histopatologia na verificação de alterações causadas pela ação de produtos tóxicos tem se mostrado muito eficaz e uma importante ferramenta na avaliação dos danos causados por esses produtos nos sistemas dos organismos estudados. Conforme o aumento da concentração do produto químico utilizado, maiores são os danos causados no organismo; como exemplo, em estudos realizados previamente, as alterações

ultraestruturais dos hepatócitos expostos ao fipronil foram proporcionais ao aumento da concentração do produto (FERREIRA, 2010).

Existe associação entre histopatologia hepática e alterações séricas de ALT. A interação entre o estudo histológico e a avaliação bioquímica é particularmente uma vantagem para o toxicologista, colaborando efetivamente na identificação da intoxicação (GRANCE, 2007).

CAPÍTULO 2.

Trabalho a ser submetido à revista *Pesticide Biochemistry and Physiology*

Exposição perinatal ao fipronil provoca susceptibilidade aumentada de efeitos comportamentais agressivos e de ansiedade em filhotes machos de ratos

(Perinatal fipronil exposure provoke an increased susceptibility of aggressivity and anxiety behavioral effects in male offspring rats)

Francisco Pizzolato Montanha^{a*}, Caique Aparecido Faria^b, Faber Daniel Machado^b, Fábio Anselmo^c, Antonio Francisco Godinho^d, Noeme Sousa Rocha^e

^a *Doutorando na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. chicopm28@yahoo.com.br.*autor para correspondência*

^b *Iniciação científica na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. caiquefaria32@hotmail.com; faber.machado@hotmail.com*

^c *Mestrando na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. anselmof_unesp@yahoo.com.br.*

^d *Docente na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. godinho@ibb.unesp.br*

^e *Docente na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. rochanoeme@fmvz.unesp.br*

RESUMO

Exposição perinatal a praguicidas tem sido associada com alterações no desenvolvimento neurocomportamental da prole. Este estudo teve como objetivo avaliar os comportamentos de ansiedade e agressividade em filhotes de ratas Wistar expostas ao fipronil no período perinatal. Para isto, ratas gestantes foram distribuídas em cinco grupos (n=15) assim constituídos: controle (Ct) e expostas - gestação (G), lactação (L), gestação mais lactação (G+L) 7-14 e gestação mais lactação (G+L) 1-21. Ansiedade foi avaliada utilizando-se o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e agressividade, utilizando-se o paradigma do animal residente/intruso. Foram quantificados o nível do cortisol no sangue e o fipronil e metabólitos (sulfona e dessulfenil) no cérebro dos filhotes dos diferentes grupos. Os resultados obtidos mostram que houve aumento nos comportamentos de ansiedade e agressividade principalmente no grupo lactação; a dosagem de cortisol aumentou na prole jovem, mas não na adulta; fipronil e fipronil sulfona foram detectados no cérebro da prole jovem e não no da adulta. Conclui-se que a exposição perinatal ao fipronil aumentou os comportamentos de agressividade e ansiedade, confirmando sua toxicidade sobre o neurodesenvolvimento da prole, principalmente na fase jovem da vida dos animais.

Palavras-chave: Cortisol, Fenilpirazól, Labirinto em Cruz Elevado, Metabólitos, Sulfona, Dessulfenil.

ABSTRACT

Perinatal exposure to pesticides has been associated with changes in neurobehavioral development of the offspring. This work aimed to evaluate anxiety and aggressive behavior in Wistar rat offspring, exposed to fipronil in the perinatal period. For this, pregnant rats were distributed into five groups (N = 15) constituted as follows: control (Ct) and exposed - gestation (G), lactation (L), gestation and lactation (G + L) 7-14, gestation and lactation (G + L) 1-21. Anxiety was assessed using the Elevated Plus Maze (LCE) and aggression, using the paradigm of rat resident/intruder. The level of cortisol in the blood and fipronil and their metabolites (sulfone and dessulfenil) were quantified in the brain of the offspring of different groups. The results show that there was an increase in anxiety and aggression behaviors, especially in the lactation group; the cortisol increased in young offspring, but not in adults; fipronil and fipronil sulfone were detected in the brains of young pups and not in adults. It is concluded that perinatal exposure to fipronil increased anxiety and aggression behavioral, confirming the toxicity on offspring neurodevelopment, especially in the young stage of life of the animals.

Keywords: Cortisol, Phenylpyrazole, Elevated Plus Maze, Metabolites, Sulfone, Dessulfenil.

1. Introdução

Recentemente, relatos científicos têm evidenciado que é elevado o potencial de toxicidade dos praguicidas para animais e humanos e a associação do uso indiscriminado destas substâncias com alterações do neurodesenvolvimento em crianças, tem chamado a atenção para os vários problemas decorrentes da sua utilização e as exposições que ocorrem no período perinatal [1-3].

A exposição a praguicidas por um pequeno intervalo de tempo pode causar sérios efeitos sobre o desenvolvimento de fetos, tanto de animais como de humanos e, após o nascimento tem sido observados sequelas como dificuldade de aprender, diminuição dos reflexos, esterilidade, além do aumento da suscetibilidade para câncer e outras doenças [4,5].

Fipronil (5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]- 4-[(trifluoromethyl) sulfinyl] -1H-pyrazole -3-carbonitrile) é um praguicida, derivado quimicamente da família do fenilpirazol ou fiproles que tem como alvo o receptor do ácido gama amino butírico (GABA) [6]. Possui amplo espectro de ação [7], é extremamente ativo [8] e altamente eficaz [7,9].

É usado na agricultura contra uma grande variedade de pragas que infestam alimentos [6,10,11], controle das pragas veterinárias [12], tendo sido designado pela agência de proteção ambiental (EPA) como alternativa ao uso de organofosforados para o controle de cupins e formigas. No entanto, várias questões foram levantadas sobre os efeitos adversos do fipronil na saúde pública, por ser largamente comercializado e utilizado no ambiente doméstico [12,13].

Apesar de sua propaganda seletividade contra insetos [14-16], o fipronil também se liga a receptores GABAérgicos de mamíferos [15,17-19]. O principal metabólito sulfona, bem como seu produto de fotodegradação dessulfinil, são considerados mais tóxicos a insetos, mamíferos, peixes e pássaros, do que o composto original [20].

Apesar da neurotoxicidade dos fenilpirazóis ser bem caracterizada e seu mecanismo de ação em mamíferos ser conhecido, seu potencial para provocar efeitos comportamentais ainda é desconhecido. Recentemente, foi demonstrado que fipronil pode interferir com a atividade neurocomportamental

em animais experimentais [21,22]. Como uma das funções neurológicas para a qual os efeitos adversos de praguicidas neurotóxicos tem sido mostrado repetidamente é a comportamental, conhecer os efeitos do fipronil sobre esta função do sistema nervoso, em animais e humanos, torna-se uma necessidade frente ao seu uso hoje em larga escala.

Comportamento é considerado parâmetro de avaliação funcional de vários processos sensoriais, motores e integrativos, que ocorrem no sistema nervoso e tem sido utilizado modernamente como bioindicador para avaliar efeitos tóxicos de agentes químicos. Alterações comportamentais em animais e humanos, expostos de forma aguda ou crônica às substâncias químicas, podem servir como indicativo do seu caráter de neurotoxicidade [21,23].

A função de neurotransmissores como moléculas sinalizantes depende de receptores específicos nos quais cada um deles age na fenda sináptica. Essas moléculas são fatores chave relacionados a vários tipos de comportamentos, incluindo os comportamentos de agressão e ansiedade. Exemplos de neurotransmissores incluem serotonina, dopamina, GABA, norepinefrina e acetilcolina, entre outros [24-27].

Dados de literatura, apresentados por Adams et al. [28] e Greg e Siegel [29], discutem as estruturas cerebrais e os neurotransmissores envolvidos no comportamento agressivo, sugerindo ambos, um papel do GABA neste comportamento. Adicionalmente Miczeck et al. [30] propõem uma relação entre a atividade do receptor GABA_A e o comportamento agressivo. Tendo em vista estas informações e, como o praguicida fipronil atua através da inibição da atividade gabaérgica, é possível aventar que ele possa influenciar os comportamentos de agressividade e ansiedade.

Relatos de alterações bioquímicas por ação de praguicidas em peixes e mamíferos, incluindo alterações do nível de cortisol, têm sido descritos na literatura [31]. E sinalizam sobre uma relação entre o cortisol e desordens emocionais, incluindo agressividade e ansiedade [32-34]. Segundo Dietrich et al. [35], alterações nos níveis de cortisol em crianças, podem causar desvios de comportamento relacionados à ansiedade e à agressão, sendo que níveis maiores de cortisol estão relacionados com a ansiedade e níveis mais baixos de cortisol associados com a agressão.

O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento de ansiedade e de agressividade na prole de ratas Wistar, expostas ao praguicida fipronil em diferentes fases do período perinatal e uma possível relação com o nível do cortisol sérico.

2. Materiais e métodos

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FMVZ-UNESP (protocolo número 59/2012).

2.1 Animais

Os animais utilizados foram ratos Wistar fêmeas e machos, obtidos da colônia do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu, os quais foram retirados do Biotério Central logo após o desmame (22 dias) e alocados no biotério do Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX), sob condições controladas de temperatura ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa (55 ± 5), ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, exaustão contínua, recebendo água e ração sem restrição, até atingirem a idade necessária para acasalamento. Durante todo o experimento, as gaiolas de polipropileno foram higienizadas a cada 3 dias, com troca da forragem de maravalha e lavagem da caixa.

2.2 Procedimento experimental

Os animais com 80 dias de idade foram acasalados colocando-se, numa mesma gaiola, 3 fêmeas com um macho. Permaneceram assim, até confirmação gestacional ou num prazo máximo de 5 dias.

Para a confirmação gestacional, a cada 24 horas, foi realizado um lavado vaginal para identificação das gestantes. Um cotonete de algodão embebido em solução fisiológica foi utilizado para coletar a secreção vaginal das fêmeas. Posteriormente foi feito um esfregaço em lamina para leitura em microscópio e a observação da possível presença de espermatozoides no material; se detectados, a rata foi considerada prenhe.

As fêmeas confirmadas gestantes foram separadas em caixas isoladas, sendo este considerado o dia zero do período de gestação. As gestantes foram separadas aleatoriamente em 5 grupos de 15 animais, denominados respectivamente: controle (Ct), gestação (G), lactação (L), gest/lact 7-14 (G+L 7-14) e gest/lact 1-21 (G+L 1-21). A cada três dias, as ratas prenhes de cada grupo foram pesadas.

Para os experimentos o fipronil foi utilizado na forma de um dos seus produtos comerciais, o Topline[®] (fipronil a 1% - Merial do Brasil). A dose de exposição utilizada foi a de 1 mg/kg/dia, por via dermal (tópica), na região dorsal do pescoço próxima à cabeça, após tricotomia da região. Os animais controle receberam 0,2 mL de óleo de milho durante os períodos de gestação e lactação do 7º ao 14º dias; os grupos G, L e G+L 7-14 foram expostos ao fipronil do 7º ao 14º dias da gestação e/ou lactação; o grupo G+L 1-21 foi exposto ao fipronil do 1º ao 21º dias da gestação e lactação.

Para todos os grupos, imediatamente após o nascimento dos filhotes foi feito a sexagem selecionando-se oito filhotes do sexo masculino, de cada rata, para padronização do tamanho das ninhadas. Os filhotes permaneceram com suas respectivas mães até o DPN21, quando foi feito o desmame.

Para a formação dos grupos dos animais utilizados para o experimento propriamente dito, um filhote macho, de cada mãe/ninhada foi utilizado, totalizando 15 animais para cada grupo experimental.

2.3 Avaliação do comportamento

A avaliação da ansiedade nos animais foi realizada na prole jovem (DPN 25-30) e adulta (DPN 75-80) segundo metodologia descrita em Trombini et al. [36], utilizando-se o labirinto em cruz elevado, aparelho construído conforme especificado por Pellow e Chopin [37], convalidado por Pellow e File [38], para o estudo de drogas ansiolíticas e ansiogênicas em ratos. Este teste comportamental fundamenta-se na aversão dos roedores à espaços abertos e altos, o que acarreta estimulação tanto dos centros do medo como da exploração, sendo interpretado como indutor da ansiedade. O aparelho consiste em um labirinto em cruz, com dois braços fechados (50x10x40 cm), e este elevado a 50 cm do chão.

O animal foi colocado no espaço central do labirinto com a cabeça voltada para o espaço aberto e foram registrados através de filmagem, o número de vezes e o tempo em segundos em que o animal entrou e permaneceu nos braços abertos e fechados, por um período de 5 minutos. Após o teste o animal foi retirado do aparelho e neste foi passado algodão embebido em álcool etílico a 5% para limpeza e para disfarçar o cheiro do animal precedente.

A avaliação do comportamento de agressividade foi realizada nos animais adultos (DPN 80), utilizando o paradigma do rato residente/intruso. Os animais intrusos não receberam nenhum tratamento e permaneceram durante todo o momento pré-teste naturalmente agrupados nas gaiolas, sendo utilizados uma única vez ao dia para os testes e nunca voltavam ao mesmo animal residente. Os animais residentes foram os animais expostos (controle e fipronil).

Ao atingirem a idade de 50 dias, os filhotes controle e os expostos foram separados em caixas isoladas, permanecendo assim por 30 dias e, após isso, foi realizado o teste de agressividade. Neste período, a higienização das caixas, foi realizada sem lavagem, fazendo apenas a troca da cama de maravalha, sendo que na última semana antecedente ao teste, não foi realizada a higienização das gaiolas.

Para a avaliação da agressividade, um animal intruso foi colocado na gaiola do residente e durante 15 minutos foram observados, o tempo de latência para o primeiro ataque, o número total de ataques e o tempo total de episódios de ataque (compreendendo desde explosões de mordida, ameaças laterais, dominar o outro animal com as patas ou o corpo e limpeza mais intensa). Todos os testes foram filmados para posterior avaliação.

2.4 Análises bioquímica e cromatográfica

Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados (solução de xilazina – 10mg/Kg, mais cetamina – 80mg/Kg, IP) para coleta de sangue através de punção cardíaca direta e em seguida eutanasiados (excesso de anestésico) para coleta do cérebro.

O sangue foi centrifugado a 2.500 rpm por 5 minutos e o soro coletado foi utilizado para dosagem do nível de cortisol, através de kit comercial (Cortisol – ELISA–DRG, USA), em espectrofotômetro Ultrospec 2000 – Pharmacia Biotech.

Para a comprovação da exposição da prole e sua relação com possíveis efeitos tóxicos, a dosagem dos níveis de fipronil e seus principais metabólitos (sulfona e dessulfenil) no cérebro foi realizada por cromatografia de alta eficiência (HPLC Shimadzy, modelo Prominence – Espectrômetro de Massas do tipo Triploquadrupolo, MS/MS AB Sciex, modelo 4500), utilizando padrões Sigma-Aldrich de referência, a partir de metodologia preconizada por Xavier et al. [39]. O limite de detecção (ppb) do aparelho é respectivamente: para o fipronil=0,051, para o fipronil sulfona=0,013 e para o fipronil dessulfenil=0,050.

2.5 Análise estatística dos resultados

Os dados coletados foram analisados estatisticamente utilizando análise de variância (One-Way ANOVA) através de software Instat 3.0 (*Graph Pad Software*). O teste de Tukey-Kramer Multiple Comparisons foi utilizado para identificar diferenças entre os grupos. A comparação entre os grupos foi considerada significativamente diferente quando $p < 0,05$.

3. Resultados

Não foram observados nas mães gestantes sinais de intoxicação pelo fipronil.

A prole jovem exposta ao fipronil no período de lactação apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no número de entradas nos braços abertos do LCE, em relação aos animais controle (Figura 1). A prole adulta não apresentou alterações significativas ($p > 0,05$) no número de entradas nos braços abertos do LCE. Não houve alterações significativas ($p > 0,05$) no número de entradas nos braços fechados do LCE, tanto para a prole jovem quanto para a adulta, em relação ao controle.

Em relação ao tempo de permanência nos braços abertos do LCE, observa-se que houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da prole jovem do grupo lactação quando comparado ao controle (Figura 2), enquanto a prole adulta do grupo G+L 7-14 teve um aumento significativo ($p < 0,05$) da permanência nos braços abertos do LCE, em relação ao controle (Figura 3). A figura 4 mostra que a prole jovem do grupo lactação aumentou significativamente ($p < 0,001$) a permanência nos braços fechados do LCE em

relação aos filhotes controle. Prole adulta do grupo G+L 7-14 permaneceu significativamente menos tempo ($p<0,05$) nos braços fechados do LCE, quando comparado aos controles (Figura 5).

No experimento para avaliação de agressividade foi observado que os filhotes do grupo lactação apresentaram uma diminuição significativa ($p<0,05$) no tempo de latência para o primeiro ataque, no comportamento de agressividade, em relação ao controle (Figura 6) enquanto que a duração total de ataques e o número total de ataques não apresentaram alteração significativa ($p>0,05$) em relação ao controle (Figura 7).

A Figura 8 mostra que o nível sérico do cortisol aumentou significativamente ($p<0,01$) na prole jovem do grupo G+L 7-14. Não houve diferença significativa no nível sérico do cortisol analisado na prole adulta.

A Tabela 1 mostra os valores da quantificação do fipronil e seu metabólito fipronil sulfona nos cérebros dos filhotes dos vários grupos experimentais. Observa-se que houve um aumento significativo ($p<0,05$) da quantidade do fipronil e do fipronil sulfona no cérebro dos filhotes, em relação ao controle, que é relacionado ao período de exposição e que confirma a exposição da prole por exposição perinatal parental. O metabólito dessulfenil não foi detectado no cérebro da prole jovem nem adulta.

4. Discussão

O conjunto dos resultados obtidos nos experimentos demonstram que a exposição ao fipronil, no período perinatal, provoca alterações no comportamento de agressividade e ansiedade da prole jovem e adulta. Estes resultados sugerem que o desenvolvimento neurocomportamental dos descendentes foi alterado pela exposição *in útero* e principalmente durante a lactação.

Um dos óbvios sinais de toxicidade materna é a perda de peso [40] e, alterações na homeostase materna, poderia indiretamente interferir com o desenvolvimento dos filhotes [41,42]. A não ocorrência de sinais de toxicidade materna nos leva a supor que qualquer alteração ocorrendo com os filhotes foi, portanto exclusivamente devido à exposição ao fipronil.

Segundo dados prévios da literatura, a exposição da fêmea a agroquímicos durante a prenhez e a lactação pode causar alterações refletidas em aspectos físicos e comportamentais, de acordo com o período do desenvolvimento animal [43-45]. A exposição perinatal pode envolver efeitos latentes que só são observados tardiamente, mesmo nos casos em que a exposição ocorra em doses menores que aquelas que promovem efeitos evidentes em adultos, já que o organismo em formação não possui o mesmo nível de defesas do organismo adulto.

O comportamento do animal no LCE é considerado um modelo experimental de ansiedade e um excelente modelo para avaliar as drogas com ação GABAérgica e via glutamato [46]. GABA é o principal neurotransmissor inibitório e tem sido associado com amplo espectro de funções fisiológicas e em estados de doenças incluindo ansiedade e depressão [27]. Nos presentes resultados obtidos no LCE, a prole jovem, exposta ao fipronil no período de lactação, entrou menos vezes e permaneceu menos tempo nos braços abertos e ainda, permaneceu mais tempo nos braços fechados. Como aversão pelos braços abertos demonstra um efeito ansiogênico [47] é possível afirmar que o efeito da exposição ao fipronil durante a lactação aumentou o comportamento de ansiedade da prole jovem.

De outro modo a prole adulta do grupo Gest/Lact 7-14, permaneceu mais tempo nos braços abertos e menos tempo nos braços fechados do LCE, sugerindo que a exposição perinatal ao fipronil pode ter influenciado diferentemente os filhotes quando na idade adulta. Este efeito bifásico não foi descrito na literatura para agentes do tipo do fipronil e não existe uma explicação plausível para ele, a não ser a de que a presença do fipronil e seu metabólito sulfona no cérebro da prole jovem e a ausência na adulta, sejam os responsáveis por esta inversão de efeitos, sendo que no adulto funcionaria como uma sequela ou alguma forma de *imprinting*, da presença anterior do agente químico no tecido cerebral.

Silva [48], ao expor ratos Wistar, machos adultos, ao fipronil por via oral (gavagem), durante 28 dias, às doses 0,1; 1; e 10 mg/Kg de peso corpóreo, não observou diferenças significativas entre os grupos controle e tratados em relação ao número de entradas nos braços fechados e abertos do labirinto em cruz elevado. As diferenças com os presentes resultados podem ser, além da

dose e do produto comercial utilizado, também por causa da via de administração já que na administração oral, devido ao efeito de primeira passagem, a cinética do agente químico é diferente.

Nossos resultados parecem corroborar com os de Udo [49], que ao expor ratas Wistar ao fipronil, nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg/Kg, por gavagem, do 6º ao 20º dia de gestação, observou na prole, quando estes estavam com 75 dias de idade, que os animais expostos à dose de 10 mg/Kg apresentaram uma diminuição no número de entradas nos braços abertos, e em todas as doses, para os filhotes machos, houve uma diminuição significativa na permanência nos braços abertos.

Adicionalmente resultados obtidos por Terçariol e Godinho [21], ao exporem ratos Wistar machos adultos à dose de 280 mg/Kg de fipronil, por via tópica, observaram que não houve diferença significativa entre os grupos, na avaliação do número de entradas e na permanência em braços abertos e fechados, mas sim na emocionalidade, medo e atividade locomotora. A diferença poderia ser por causa do perfil experimental e da dose utilizada, já que a via de exposição é a mesma.

O conjunto dos resultados aqui obtidos com o LCE evidenciando que o fipronil pode influenciar no estado de ansiedade dos animais corrobora com resultados obtidos nos estudos desenvolvidos pela U.S.EPA [50], mostrando que o fipronil é capaz de provocar aumento do comportamento de ansiedade.

Em estudo realizado com ratos, que foram alimentados com um dos metabólitos do fipronil, o fipronil-dessulfinil, nas doses de 0; 0,5; 2 e 10 ppm (0; 0,025; 0,098 e 0,050 mg/Kg/d para machos e 0; 0,032; 0,130 e 0,550 mg/Kg/d para fêmeas), durante dois anos, foi observado que tanto os machos, como as fêmeas, apresentaram aumento da incidência de agressividade na dose mais alta testada [51]. Os presentes resultados corroboram com este estudo da influência do fipronil sobre a agressividade, uma vez que aqui os filhotes expostos no período da lactação apresentaram uma diminuição significativa no tempo de latência para o primeiro ataque e um aumento, embora não significativo, do número total de ataques. As presentes observações podem ser inéditas uma vez que até agora não foram encontrados dados da literatura sugerindo efeito da exposição perinatal do fipronil sobre o comportamento agressivo de filhotes.

Os comportamentos ofensivos e defensivos de ratos têm elos comuns com a agressividade em humanos, sendo utilizados tanto em estudos de neurofisiologia e neurofarmacologia da agressão, como em modelos de transtornos psiquiátricos [52]. De acordo com Beiderbeck et al. [53], os maiores níveis de agressão em ratos machos de laboratório são acompanhados por uma atividade neuronal excessiva dentro do núcleo paraventricular. Podem ser induzidos também, por estimulação do hipotálamo, hipotálamo lateral ou lesões do bulbo olfatório, núcleo amigdalóide e região septal. Os efeitos das lesões sobre comportamentos agressivos variam conforme a localização da lesão [54]. O efeito bloqueador Gabaérgico pelo fipronil poderia se traduzir, nesta região, por um efeito estimulante e estar assim envolvido com um maior estado de agressividade.

Segundo a hipótese serotoninérgica da agressão proposta por Nelson e Chiavegato [55], o neurotransmissor serotonina pode ser o principal mediador endógeno central envolvido com o comportamento de agressividade. Aqui não é possível excluir que o fipronil possa influenciar os mecanismos neurofisiológicos que controlam a serotonina no sistema nervoso central, o que pode ser o objetivo de estudos futuros.

Por outro lado, Adams et al. [28] demonstraram que o antagonista de GABA picrotoxina provoca agressão quando injetado na mesma área hipotalâmica onde a estimulação elétrica promove comportamento de ataque em ratos, sugerindo um papel deste neurotransmissor no comportamento de agressão animal. Adicionalmente, Greg e Siegel [29] também apresentaram elementos e discutiram as estruturas cerebrais e os neurotransmissores envolvidos no comportamento agressivo, sugerindo um papel do GABA neste comportamento. Mais recentemente, Lee e Gammie [56] discutiram o envolvimento do GABA na agressão maternal em camundongos.

Como o fipronil age como antagonista do GABA, não é possível excluir, portanto, uma ação sobre este mediador central no efeito sobre a agressividade aqui observado. Como a ação tóxica do fipronil ocorre por bloqueio competitivo do GABA, uma desregulação do equilíbrio entre excitação/inibição do sistema nervoso central através da ação em neurotransmissores envolvidos, poderia estar ocorrendo e ser a responsável por tais efeitos.

Um papel do neurotransmissor GABA no comportamento de agressividade ainda é controverso. Estudos manipulando diretamente os níveis de GABA apontam para uma correlação inversa com comportamento agressivo [30]; contudo, estudos utilizando moduladores alostéricos positivos de GABA, tais como o álcool, tem relatado comportamento agressivo aumentado [57].

De outro modo, de acordo com Dietrich et al. [35], níveis maiores de cortisol em crianças estão relacionados com a ansiedade e níveis mais baixos de cortisol associados com a agressão. Estas informações não se confirmam com os resultados encontrados no presente estudo, onde os animais que apresentaram nível de cortisol elevado (prole jovem do grupo Gest/Lact 7-14), não se apresentaram mais ansiosos; os animais que se apresentaram mais ansiosos (prole jovem do grupo lactação), não apresentaram o nível de cortisol aumentado; nos animais que se apresentaram mais agressivos (lactação), não houve diminuição no nível de cortisol; e nos animais menos ansiosos (prole adulta do grupo G+L 7-14), não se observou diminuição no nível de cortisol.

Finalmente, o fato de não se encontrar o fipronil ou metabólitos na prole adulta e, ainda assim existir alguma alteração de comportamento, leva-nos a supor que a presença do agente químico e/ou metabólitos no período perinatal pode deixar marcas (*imprinting*) no neurodesenvolvimento da prole, que permanecem e que necessitam ser mais bem estudadas, talvez através de estudos epigenômicos.

Os presentes resultados juntos sugerem que a exposição perinatal de ratas Wistar ao fipronil, principalmente no período da lactação, aumenta os comportamentos de agressividade e ansiedade na prole, mais especificamente durante a fase jovem da vida destes animais; sugere-se que este efeito ocorra devido à presença e a interferência do fipronil e seu metabólito sulfona, no cérebro dos filhotes. O nível do cortisol sérico aumentado na prole jovem pode não estar relacionado à maior agressividade observada já que a avaliação ocorreu na prole adulta, quando o nível de cortisol já estava normal. O fato de algumas alterações no comportamento terem sido observadas nos ratos adultos na ausência do fipronil ou seu metabólito sulfona pode sugerir uma possível ação por *imprinting*, cuja causa merece ser melhor investigada.

Referências

- [1] Shafer, T.J.; Meyer, D.A.; Crofton, K.M. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environmental Health Perspectives*. 113 (2005) 123-136.
- [2] Bouchard, M.F.; Chevrier, J.; Harley, K.G.; Kogut, K.; Vedar, M.; Calderon, N.; Trujillo, C.; Johnson, C.; Bradman, A.; Barr, D.B.; Eskenazi, B. Prenatal exposure to organophosphate pesticides and IQ in 7-year-old children. *Environ Health Perspect*. 119 (2011) 1189-1195.
- [3] Shelton, J.F.; Geraghty, E.M.; Tancredi, D.J.; Delwiche, L.D.; Schmidt, R.J.; Ritz, B.; Hansen, R.L.; Picciotto, I.H. Neurodevelopmental disorders and prenatal residential proximity to agricultural pesticides: the CHARGE study. *Environmental Health Perspectives*. 122 (2014) 1103-1109.
- [4] Cock, J.; Westveer, K.; Heederik, D.; Velde, E.; Van Kooij, R. Time to pregnancy and occupational exposure to pesticides in fruit growers in The Netherlands. *Occupational and Environmental Medicine*. 51 (1994) 693-699.
- [5] Lyons, G. Mixed messages: pesticides that confuse hormones. *Pesticide Action Network UK. Briefing 2*, 2000.
- [6] Wilde, G.E.; Whitworth, 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*. 18 (2001) 1-11.
- [7] Gill, K.K.; Dumka, V.K. Biochemical alterations induced by oral subchronic exposure to fipronil, fluoride and their combination in buffalo calves. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 36 (2013) 1113-1119.
- [8] Tang, J.; Usmani, A.; Hodgson, E.; Rose, R.L. In vitro metabolismo of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam. *Chemico-Biological Interactions*. 147 (2004) 319-329.
- [9] Zhao, X.; Yeh, J.Z.; Salgado, V.L.; Narahashi, T. Sulfone metabolite of fipronil blocks γ -aminobutyric acid and glutamate-activated chloride channels in mammalian and insect neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 314 (2005) 363-373.
- [10] Scharf, M.E.; Siegfried, B.D. Toxicity and neurophysiological effects of fipronil and fipronil sulfone on the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 40 (1999) 150-156.
- [11] Ngim, K.K.; Crosby, D.G. Abiotic process influencing fipronil and desthiofipronil dissipation in California, USA, rice fields. *Environ. Toxicol. Chem*. 20 (2001) 972-977.
- [12] Jennings, K.A.; Canerdy, T.D.; Keller, R.J.; Atieh, B.H.; Doss, R.B.; Gupta, R.C. Human exposure to fipronil from dogs treated with frontline. *Vet. Hum. Toxicol*. 44 (2002) 301-303.
- [13] Tingle, C.C.D.; Rother, J.A.; Dewhurst, C.F.; Lauer, S.; King, W.J. Fipronil: Environmental Fate, Ecotoxicology, and Human Health Concerns. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 176 (2003) 1-66.
- [14] Cole, L.M.; Nicholson, R.A.; Casida, J.E. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-Gated chloride channel. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 46 (1993) 47-54.
- [15] Hainzl, D.; Casida, J.E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy Sciences, U.S.A.* 93 (1996) 12746-12767.
- [16] Matsuda, K.; Buckingham, S.D.; Kleier, D.; Rauh, J.J.; Grauso, M.; Sattelle, D.B. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci*. 22 (2001) 573-580.
- [17] Hainzl, D.; Cole, L.M.; Casida, J.E. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chem. Res. Toxicol*. 11 (1998) 1529-1535.

- [18] Ikeda, T.; Zhao, X.; Nagata, K.; Kono, Y.; Shono, T.; Yeh, J.Z.; Narahashi, T. Fipronil modulation of gamma-aminobutyric acid_A receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 296 (2001) 914-921.
- [19] Ratra, G.S.; Erkkila, B.E.; Weiss, D.S.; Casida, J.E. Unique insecticide specificity of human homomeric rho 1 GABA(C) receptor. *Toxicol. Lett.* 129 (2002) 47-53.
- [20] Das, P.C.; Cao, Y.; Cherrington, N.; Hodgson, E.; Rose, R.L. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chemico Biological Interactions*. 164 (2006) 200-214.
- [21] Terçariol, P.R.; Godinho, A.F. Behavioral effects of acute exposure to the insecticide fipronil. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 99 (2011) 221-225.
- [22] Udo, M.S.B.; Sandini, T.M.; Reis, T.M.; Bernardi, M.M.; SPINOSA, H.S. Prenatal exposure to a low fipronil dose disturbs maternal behavior and reflex development in rats. *Neurotoxicology and Teratology*. p.1-7, 2014.
- [23] Barone, S.; Das, K.P.; Lassiter, T.L.; White, L.D. Vulnerable processes of nervous system development: a review of markers and methods. *Neurotoxicology*. 21 (2001) 15-36.
- [24] Davis, M.; Rainnie, D.; Cassell, M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends Neurosci.* 17 (1994) 208-214.
- [25] Cook, C.J. Stress induces CRF release in the paraventricular nucleus, and both CRF and GABA release in the amygdala. *Physiology & Behavior*. 82 (2004) 751-762.
- [26] Penland, S.N.; Morrow, A.L. 3 α ,5 β -Reduced cortisol exhibits antagonist properties on cerebral cortical GABA_A receptors. *European Journal of Pharmacology*. 506 (2004) 129-132.
- [27] Narvaes, R.; Almeida, R.M.M. Aggressive behavior and three neurotransmitters: dopamine, GABA, and serotonin – a review of the last 10 years. *Psychology & Neuroscience*. 7 (2014) 601-607.
- [28] Adams, D.B.; Boudreau, W.; Cowan, C.W.; Kokonowski, C.; Oberteuffer, K.; Yohay, K. Offense produced by chemical stimulation of the anterior hypothalamus of the rat. *Physiol Behav.* 53 (1993) 1127-1132.
- [29] Greg, T.R.; Siegel, A. Brain structures and neurotransmitters regulating aggression in cats: implications for human aggression. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* 25 (2001) 91-140.
- [30] Miczek, K.A.; Fish, E.W.; De Bold, J.F. Neurosteroids, GABA_A receptors, and escalated aggressive behavior. *Hormones and Behavior*. 44 (2003) 242-257.
- [31] Ezemonye, L.I.N.; Ikpesu, T.O. Evaluation of sub-lethal effects of endosulfan on cortisol secretion, glutathione S-transferase and acetylcholinesterase activities in *Clarias gariepinus*. *Food and Chemical Toxicology*. 49 (2011) 1898-1903.
- [32] Putman, P.; Hermans, E.J.; Koppeschaar, H.; Schijndel, A.V.; Honk, J.V. A single administration of cortisol acutely reduces preconscious attention for fear in anxious young men. *Psychoneuroendocrinology*. 32 (2007) 793-802.
- [33] Wirth, M.M.; Scherer, S.M.; Hoks, R.M.; Abercrombie, H.C. The effect of cortisol on emotional responses depends on order of cortisol and placebo administration in a within-subject design. *Psychoneuroendocrinology*. 36 (2011) 945-954.
- [34] Muller, M.B.; Zimmermann, S.; Sillaber, I.; Hagemeyer, T.P.; Deussing, J.M.; Timpl, P.; Kormann, M.S.D.; Droste, S.K.; Kuhn, R.; Reul, J.M.H.; Holsboer, F.; Wurst, W. Limbic corticotropin releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress. *Nature Neuroscience*. 6 (2003) 1100-1107.
- [35] Dietrich, A.; Ormel, J.; Buitelaar, J.K.; Verhulst, F.C.; Hoekstra, P.F.; Hartman, C.A. Cortisol in the morning and dimensions of anxiety, depression, and aggression in children from a general population and clinic-referred cohort: an integrated analysis. *The trails study. Psychoneuroendocrinology*. 38 (2013) 1281-1298.

- [36] Trombini, T.V., Pedroso, C.G., Ponce, D. Almeida, A.A., Godinho, A.F. Developmental lead exposure in rats: is a behavioral sequel extended at F2 generation? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 68 (2001) 743-751.
- [37] Pellow, S.; Chopin, M. The effect of putative anxiogenic compounds (FG 7142, CGS 8216 and Ro 15-1788) on the rat corticosterone response. *Physiol. Behav.* 35 (1985) 587-590.
- [38] Pellow, S.; File, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24 (1986) 525-529.
- [39] Xavier, G.; Chandran, M.; George, T.; Beevi, S.N.; Mathew, T.B.; Paul, A.; Arimboor, R.; Vijayasree, V.; Pradeepkumar, G.T.; Rajith, R. Persistence and effect of processing on reduction of fipronil and its metabolites in chilli pepper (*Capsicum annum* L.) fruits. *Environ. Monit. Assess.* DOI 10.1007/s10661-014-3792-8, 2014.
- [40] Chernoff N, Rogers EH, Gage MI, Francis BM. The relationship of maternal and fetal toxicity in developmental toxicology bioassays with notes on the biological significance of the “no observed adverse effect level”. *Repr. Toxicol.*, 25 (2008) 192–202.
- [41] Smart JL, Dobbing J. Vulnerability of developing brain: II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour on the rat. *Brain Res.* 28 (1971) 85-95.
- [42] Salvatori F, Talasi CB, Salzgeber, SA, Spinosa HS, Bernardi, MM. Embryotoxic and long-term effects of cadmium exposure during embryogenesis in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 26 (2004) 673-680.
- [43] Kimmel, C. Current Approaches to Risk Assessment for Developmental Neurotoxicology. In Slikker, W.; Chang, L. *Handbook of Developmental Neurotoxicology*. San Diego: Academic Press. 1998. pp. 675–685.
- [44] Chelonis, J.; Flake, R.; Baldwin, R.; Blake, B.; Paule, M. Developmental Aspects of Timing Behavior in Children. *Neurotoxicology and Teratology.* 26 (2004) 461–476.
- [45] Costa, L.; Ascher, M.; Vitalone, A.; Syversen, T.; Soldin, O. Developmental Neuropathology of Environmental Agents. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 44 (2004) 87-110.
- [46] Carobrez, A.P.; Bertoglio, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 29 (2005) 1193-1205.
- [47] Terçariol, S.G.; Almeida, A.A.; Godinho, A.F. Cadmium and exposure to stress increase aggressive behavior. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 32 (2011) 40-45.
- [48] Silva, A.S. Efeitos neurocomportamentais da exposição prolongada de ratos ao fipronil. São Paulo, 2008. 108f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- [49] Udo, M.S.B. Avaliação dos efeitos tóxicos da exposição pré-natal ao fipronil na prole de ratas Wistar. São Paulo, 2012. 146f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas da Universidade de São Paulo, 2012.
- [50] U.S. EPA. Fipronil Pesticide fact sheet. EPA 737-F-96-005. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, USA. (1996) pp.7. <http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/199ay-12/pr736DIR/Facts/Factsheet.txt.html>
- [51] Jackson, D.; Cornell, C.B.; Luukinen, B.; Buhl, K.; Stone, D. Fipronil Technical Fact Sheet; National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. 2009. <http://npic.orst.edu/factsheets/fiptech.pdf>.
- [52] Coccaro, E.F.; Kavoussi, R.J. Fluoxetine and impulsive aggressive behavior in personality-disordered subjects. *Arch Gen Psychiat.* 54 (1997) 1081-1088.
- [53] Beiderbeck, D.I.; Reber, S.O.; Havasi, A.; Bredewold, R.; Veenema, A.H.; Neumann, I.D. High and abnormal forms of aggression in rats with extremes in trait

- anxiety – Involvement of the dopamine system in the nucleus accumbens. *Psychoneuroendocrinology*. 37 (2012) 1969-1980.
- [54] Ho, Y.J.; Chen, K.H.; Tai, M.Y.; Tsai, Y.F. MK-801 suppresses muricidal behavior but not locomotion in olfactory bulbectomized rats: involvement of NMDA receptors. *Pharmacol Biochem Behav*. 77 (2004) 641-646.
- [55] Nelson, R.J.; Chiavegatto, S. Molecular basis of aggression. *Neurosciences*. 24 (2001) 713-719.
- [56] Lee, G.; Gammie, S.C. GABAA receptor signaling in caudal periaqueductal gray regulates maternal aggression and maternal care in mice. *Behav. Brain Res.*, 213 (2010) 230–237.
- [57] Almeida, R.M.M.; Ferrari, P.F.; Parmigiani, S.; Miczek, K.A. Escalated aggressive behavior: dopamine, serotonin and GABA. *European Journal of Pharmacology*. 526 (2005) 51-64.

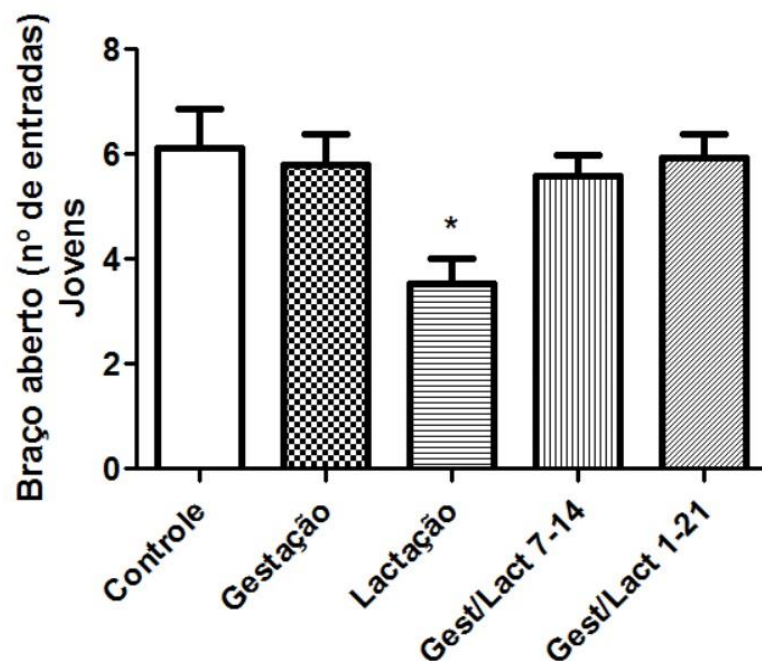


Figura 1. Número de entradas nos braços abertos, do Labirinto em Cruz Elevado, pela prole jovem, de ratas expostas ao fipronil no período perinatal. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (n=15). * $p < 0,05$ em relação ao Controle.

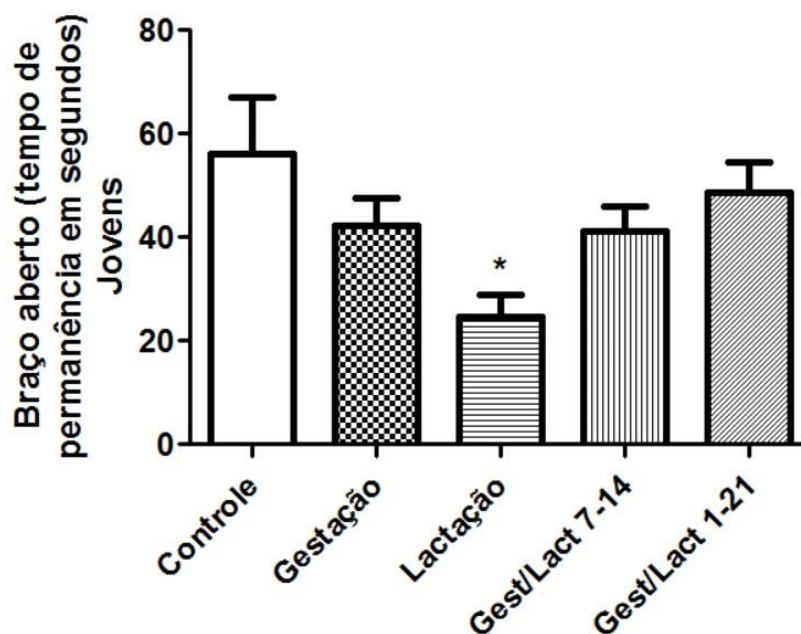


Figura 2. Tempo de permanência nos braços abertos, do Labirinto em Cruz Elevado, da prole jovem, de ratas expostas ao fipronil no período perinatal. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (n=15). * $p < 0,05$ em relação ao Controle.

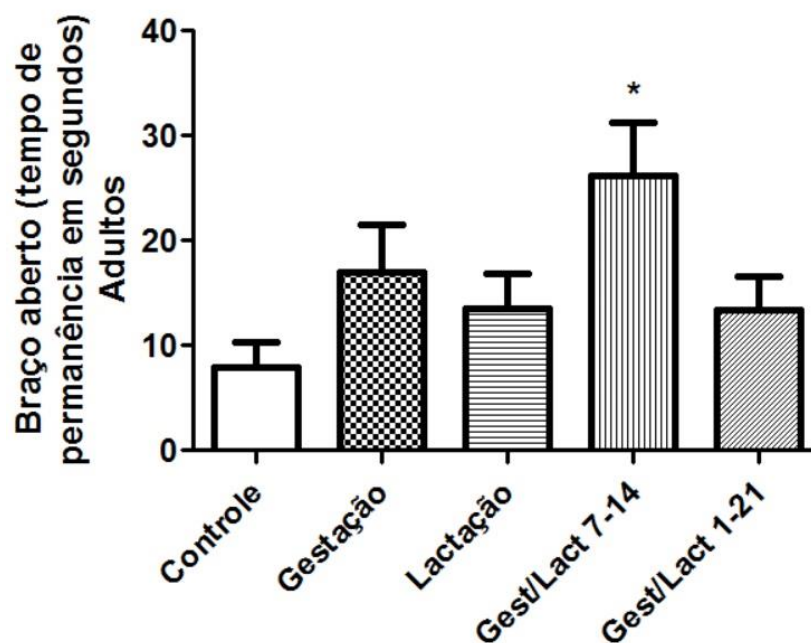


Figura 3. Tempo de permanência nos braços abertos, do Labirinto em Cruz Elevado, da prole adulta, de ratas expostas ao fipronil no período perinatal. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (n=15). * $p < 0,05$ em relação ao Controle.

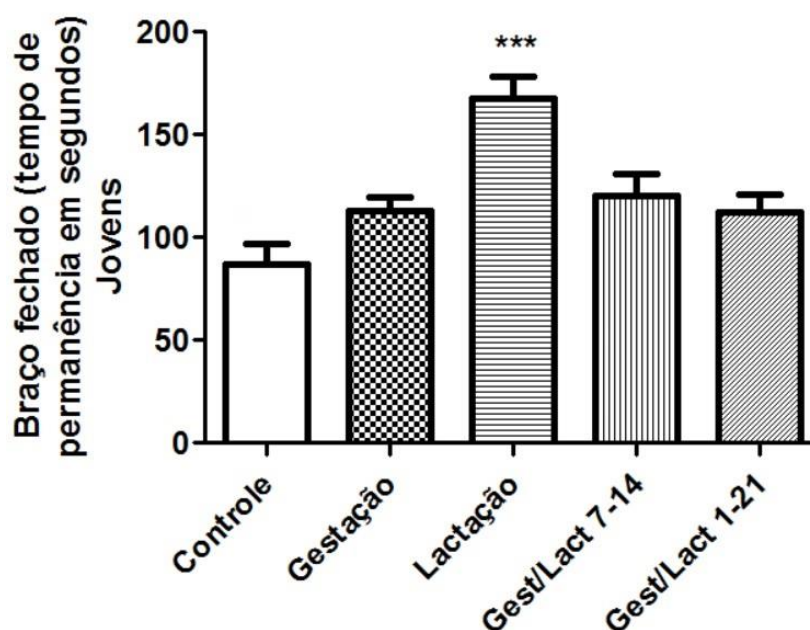


Figura 4. Tempo de permanência nos braços fechados, do Labirinto em Cruz Elevado, da prole jovem, de ratas expostas ao fipronil no período perinatal. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (n=15). *** $p < 0,001$ em relação ao Controle.

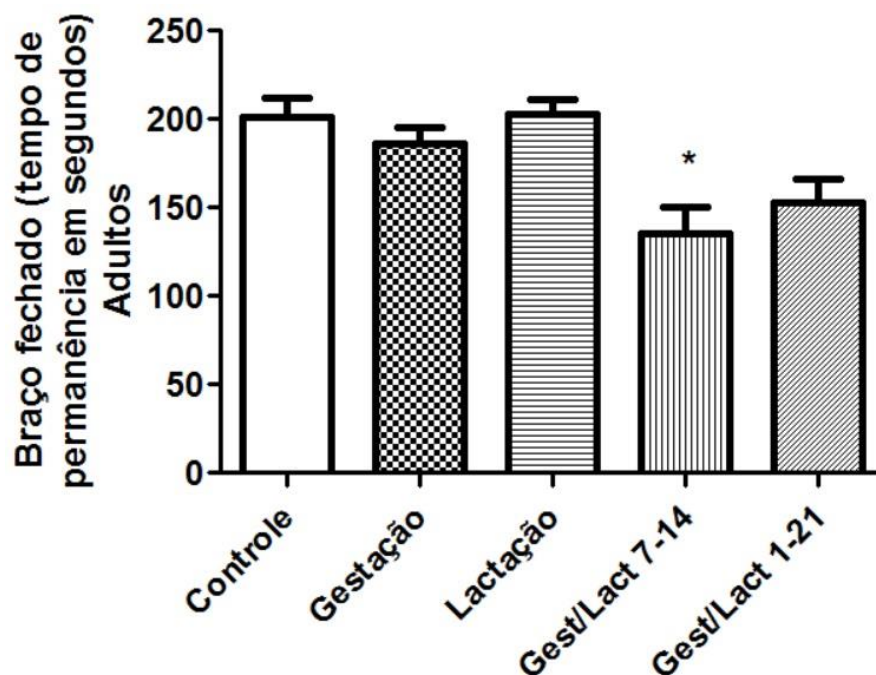


Figura 5. Tempo de permanência nos braços fechados, do Labirinto em Cruz Elevado, da prole adulta, de ratas expostas ao fipronil no período perinatal. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (n=15). * $p < 0,05$ em relação ao Controle.

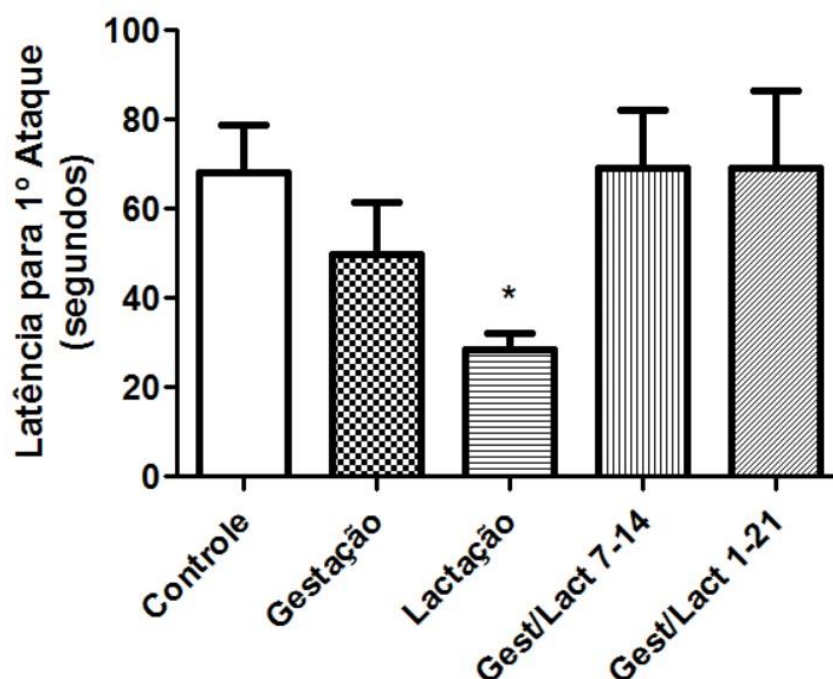


Figura 6. Tempo de latência para o primeiro ataque, no comportamento de agressividade, em filhotes de mães expostas ao fipronil no período perinatal. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (n=15). * $p < 0,05$ em relação ao controle.

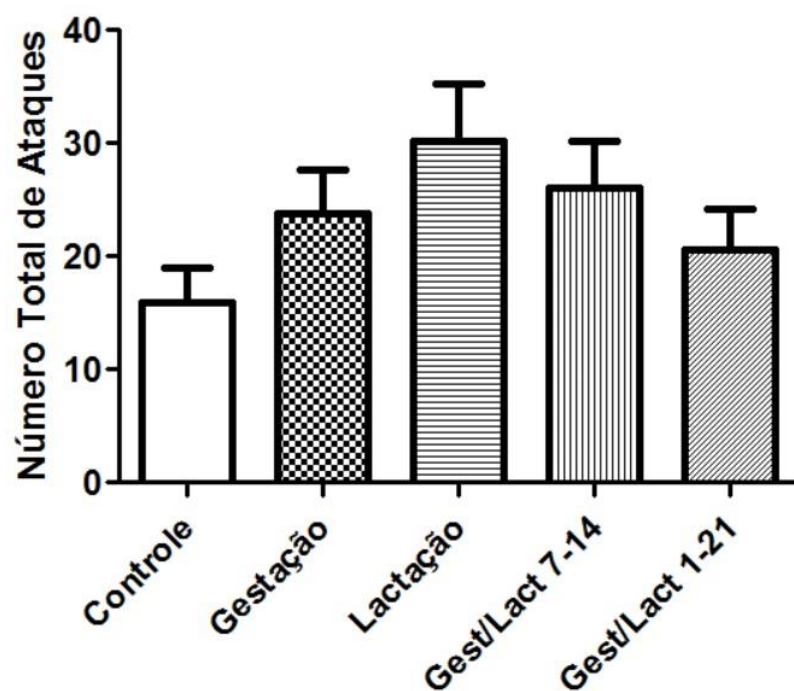


Figura 7. Número total de ataques, no comportamento de agressividade, em filhotes de mães expostas ao fipronil no período perinatal. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (n=15).

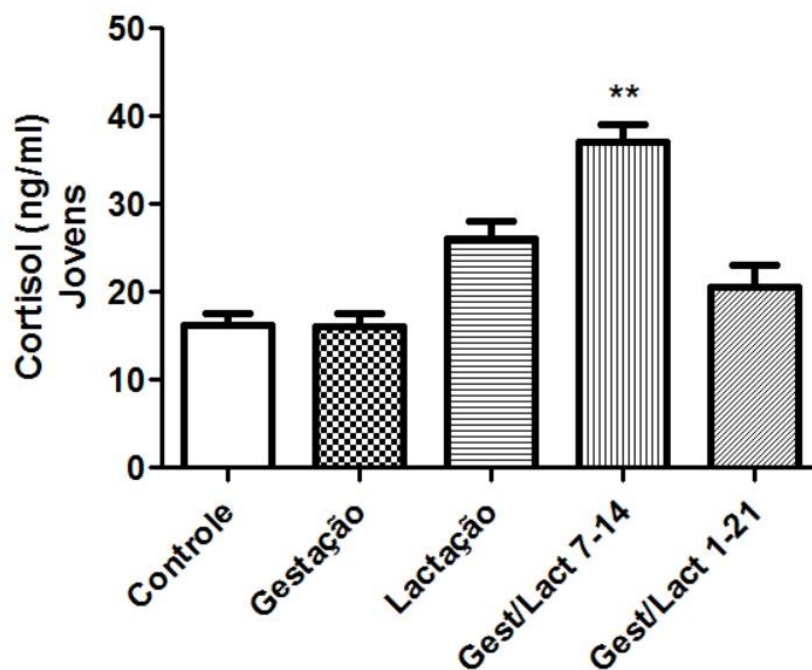


Figura 8. Dosagem do cortisol sérico na prole jovem de mães expostas ao fipronil no período perinatal. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (n=8). ** $p < 0,01$ em relação ao controle.

Tratamento	Ct	G	L	G+L 7-14	G+L 1-21
Fipronil	0,00	0,33±0,18*	0,65±1,30*	0,15±0,08*	2,67±0,24*
Fipronil Sulfona	0,00	314,3±14,00*	331,4±36,90*	560,6±95,00*	1.105,4±119,2*

Tabela 1. Dosagem do fipronil ($\mu\text{g/g}$ de tecido) e de seu metabólito fipronil sulfona, no cérebro de filhotes expostos ao praguicida no período perinatal.

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (n=8). * $p < 0,05$ em relação ao Controle.

NOTA: Nos ratos adultos não foi detectada a presença de fipronil e seus metabólitos. O metabólito dessulfenil não foi detectado nas amostras de cérebros dos filhotes, jovens e adultos. Ct – Controle; G – Gestação; L – Lactação; G+L 7-14 – Gest/Lact 7-14; G+L 1-21 – Gest/Lact 1-21.

CAPÍTULO 3.

Trabalho a ser enviado para a revista *Environmental Toxicology and Pharmacology*

Comportamento de memória diminuído em filhotes de ratos expostos ao praguicida fipronil no período perinatal

(Decreased memory behavior in rats offsprings exposed to fipronil pesticide in the perinatal period)

Francisco Pizzolato Montanha^{a*}, Faber Daniel Machado^b, Caique Aparecido Faria^b, Fábio Anselmo^c, Rômulo Francis Estangari Lot^d, Raquel Beneton Ferioli^e, Antonio Francisco Godinho^f, Noeme Sousa Rocha^g

^a Doutorando na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. chicopm28@yahoo.com.br. *autor para correspondência.

^b Iniciação científica na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. faber.machado@hotmail.com; caiquefaria32@hotmail.com

^c Mestrando na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. anselmof_unesp@yahoo.com.br.

^d Docente na Universidade de Marília, Marília-SP, Brasil. romulovet@yahoo.com.br

^e Doutoranda na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. rbf.patologia@gmail.com

^f Docente na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. godinho@ibb.unesp.br

^g Docente na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. rochanoeme@fmvz.unesp.br

RESUMO

Exposição perinatal a praguicidas tem sido associada com alterações neurotóxicas que podem ocorrer durante o desenvolvimento da prole. Este estudo teve como objetivo avaliar o comportamento de memória na prole jovem e adulta, de ratas Wistar expostas ao fipronil no período perinatal. Para isto, ratas gestantes foram distribuídas em cinco grupos (n=15) assim constituídos: controle (Ct) e expostas - gestação (G), lactação (L), gestação mais lactação (G+L) 7-14 e gestação mais lactação (G+L) 1-21. O comportamento de memória foi avaliado utilizando-se os testes de Reconhecimento de Novo Objeto (RNOB) e do Labirinto Octogonal (LO). Adicionalmente foi quantificada a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) sérica e feita a análise morfológica do tecido cerebral. Os resultados obtidos mostram que houve prejuízo na memória cognitiva e espacial dos filhotes expostos ao fipronil associado com alteração na atividade da AChE sérica e alterações morfológicas no tecido cerebral dos animais. Conclui-se que exposição ao fipronil no período perinatal promove danos ao sistema nervoso central incluindo diminuição do comportamento de memória cognitiva e espacial, alteração da AChE sérica e lesões teciduais.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase, Fenilpirazól, Labirinto Octogonal, Morfologia do cérebro, Reconhecimento de Novo Objeto.

ABSTRACT

Perinatal exposure to pesticides has been associated with neurotoxic changes that may occur during the development of the offspring. This work aimed to evaluate the memory behavior in young and adult offspring from Wistar rats exposed to fipronil in the perinatal period. For this, pregnant rats were distributed into five groups (N = 15) constituted as follows: control (Ct) and exposed - gestation (G), lactation (L), gestation and lactation (G + L) 7-14, gestation and lactation (G + U) 1-21. The memory behavior was assessed using the new object recognition (RNOB) and octagonal labyrinth (LO) tests. Additionally was quantified the activity of the blood acetylcholinesterase enzyme (AChE) in blood and made the morphological analysis of brain tissue. The results show that was decrease of cognitive and spatial memory of offspring exposed to fipronil associated with changes in the activity of blood AChE and morphological changes in the brain tissue of animals. It is concluded that exposure to fipronil during perinatal period promote damage to the central nervous system including decreased cognitive and spatial memory performance, impaired AChE and tissue injury.

Keywords: Acetylcholinesterase enzyme, Phenylpyrazole, Octagonal Labyrinth, Brain morphology, New Object Recognition.

1. Introdução

Nas últimas décadas as novas tecnologias utilizadas visando aumento de produtividade, tanto na agricultura quanto na pecuária, têm estimulado o uso de um grupo de agentes químicos, denominados praguicidas, que são potencialmente perigosos à saúde do meio ambiente, animal e humana (Ecobichon, 2001).

Se por um lado os praguicidas têm beneficiado a vida humana melhorando os produtos da agricultura e controlando doenças infecciosas, por outro lado, seu uso extensivo tem prejudicado a saúde humana com a contaminação ambiental e exposições ocupacionais. O contato em longo prazo com os praguicidas pode prejudicar a vida humana e pode perturbar a função de diferentes sistemas orgânicos no corpo, incluindo o nervoso, o endócrino, o imune, o reprodutivo, o renal, o cardiovascular e o respiratório (Souza et al., 2011; Mostafalou e Abdollahi, 2012).

Recentemente, relatos científicos têm evidenciado que é elevado o potencial de toxicidade dos praguicidas para animais e humanos e a associação do uso indiscriminado destas substâncias com alterações do neurodesenvolvimento em crianças, tem chamado a atenção para os vários problemas decorrentes da sua utilização e as exposições que ocorrem no período perinatal (Shafer et al., 2005; Bouchard et al., 2011).

O praguicida fipronil (5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-[(trifluoro-methyl) sulfinyl] -1H-pyrazole -3-carbonitrile), derivado da família química fenilpirazol tem como alvo de ação o receptor do ácido gama amino butírico (GABA) (Wilde et al., 2001). Possui amplo espectro de ação (Gill e Dumka, 2013), é extremamente ativo (Tang et al., 2004) e altamente eficaz (Zhao et al., 2005; Gill e Dumka, 2013).

É usado na agricultura contra uma grande variedade de pragas que infestam alimentos (Scharf e Siegfried, 1999; Ngim e Crosby, 2001; Wilde et al., 2001) e no controle das pragas veterinárias (Jennings et al., 2002). Foi designado pela agência de proteção ambiental (EPA) como alternativa ao uso de organofosforados para o controle de cupins e formigas, porém, várias questões sobre efeitos adversos do fipronil na saúde pública foram levantadas

por ser largamente comercializado e utilizado inclusive no ambiente doméstico (Jennings et al., 2002; Tingle et al., 2003).

Apesar de sua propaganda seletividade contra insetos (Cole et al., 1993; Hainzl e Casida, 1996; Matsuda et al., 2001) o fipronil também se liga a receptores GABAérgicos de mamíferos (Hainzl e Casida, 1996; Hainzl et al., 1998; Ikeda et al., 2001; Ratra et al., 2002). O principal metabólito sulfona bem como seu produto de fotodegradação dessulfínil foram relatados serem mais tóxicos a insetos, mamíferos, peixes e pássaros, do que o composto original (Das et al., 2006).

Apesar da neurotoxicidade dos fenilpirazóis ser bem caracterizada e seu mecanismo de ação em mamíferos ser conhecido, seu potencial para provocar efeitos comportamentais ainda é desconhecido. Recentemente, foi demonstrado que fipronil pode interferir com a atividade neurocomportamental em ratos (Terçariol e Godinho, 2011; Udo et al., 2014). Como uma das funções neurológicas para a qual os efeitos adversos de praguicidas neurotóxicos tem sido mostrado repetidamente é a comportamental, conhecer os efeitos do fipronil sobre esta função do sistema nervoso, em animais e humanos, torna-se uma necessidade frente ao seu uso hoje em larga escala.

Comportamento é o produto da integração de vias como a sensorial, a motora e de várias funções associadas ao sistema nervoso, e a hipótese é que as substâncias neurotóxicas podem adversamente afetar uma ou mais destas funções, desregulando processos de aprendizagem e memória, ou causar outros efeitos comportamentais prejudiciais (IPCS/WHO, 2001).

Evidências na literatura apontam o envolvimento do GABA nos processos iniciais de formação da memória, seguidos de mecanismos hormonais e neuro-humorais. Lesões no sistema nervoso central podem alterar as fases de aquisição, consolidação e evocação da memória (Cammarota et al., 2005).

O glutamato, o ácido gama amino butírico (GABA) e a acetilcolina (ACh) desempenham um papel importante na formação da memória no hipocampo, como é evidenciado pelo comprometimento da aprendizagem após a administração de antagonistas para os seus respectivos receptores (Stanley et al., 2012). Apesar da sugestão de que o GABA poderia estar relacionado com processos de formação da memória ainda há poucos estudos sobre a

relevância do GABA para os processos de aprendizado e memória (Menzies et al., 2007). Recentemente foi demonstrado que a diminuição do GABA no cortex pré-frontal causou um atraso nas tarefas feitas por macacos (Michels et al., 2012). Como o fipronil inibe o sistema gabaérgico, torna-se importante investigar se sua ação neurotóxica teria relação com o comportamento de memória.

Assim, a proposta do presente estudo foi avaliar comportamentos de memória cognitiva e espacial em filhotes de ratas Wistar expostas ao praguicida fipronil, em diferentes fases do período perinatal e se há relação com a atividade da AChE sérica e com a morfologia.

2. Materiais e métodos

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FMVZ-UNESP (protocolo número 59/2012).

2.1 Animais

Ratos Wistar fêmeas e machos foram adquiridos da colônia do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu, retirados do Biotério Central logo após o desmame (22 dias) e alocados no biotério do Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX), sob condições controladas de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa (55 ± 5), ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, exaustão contínua, recebendo água e ração sem restrição, até atingirem 80 dias de vida, idade necessária para acasalamento. Durante todo o experimento, foram feitas higienizações a cada 3 dias das gaiolas de polipropileno, com troca da forragem de maravalha e lavagem da caixa.

2.2 Procedimento experimental

Os animais foram acasalados colocando-se, numa mesma gaiola, três fêmeas e um macho. Fêmeas com presença do espermatozoide no lavado vaginal foram consideradas prenhes e separadas em caixas isoladas, sendo este considerado o dia zero do período de gestação. As gestantes foram separadas aleatoriamente em 5 grupos de 15 animais, denominados

respectivamente: controle (Ct), gestação (G), lactação (L), gest/lact 7-14 (G+L 7-14) e gest/lact 1-21 (G+L 1-21). Foi realizada a pesagem das gestantes a cada três dias.

Para os experimentos, foi utilizado o Topline[®], produto comercial da Merial do Brasil, contendo o fipronil como princípio ativo na concentração de 1%. A dose utilizada foi 1 mg/kg/dia, por via dermal (tópica), na região dorsal do pescoço após tricotomia. Os animais controle receberam 0,2 mL de óleo de milho durante os períodos de gestação e lactação do 7º ao 14º dias; os grupos G, L e G+L 7-14 foram expostos ao fipronil do 7º ao 14º dias da gestação e/ou lactação; o grupo G+L 1-21 foi exposto ao fipronil do 1º ao 21º dias da gestação e lactação.

Após o nascimento dos filhotes, foram selecionados oito filhotes do sexo masculino de cada rata para padronização do tamanho das ninhadas. Os filhotes permaneceram com suas respectivas mães durante todo o período de amamentação, até o DPN21. Para a formação dos grupos dos animais utilizados para o experimento propriamente dito, um filhote macho, de cada mãe/ninhada foi utilizado, totalizando 15 animais para cada grupo experimental.

2.3 Avaliação de comportamento

Para a avaliação do comportamento de memória foi utilizado o teste de reconhecimento de novo objeto (RNOB), segundo Dix e Aggleton (1999), em animais jovens (DPN23) e adultos (DPN80) e o labirinto radial octogonal, de acordo com Olton (1987), em animais no DPN65.

Para a realização do RNOB foi utilizada uma arena de campo aberto construído de madeira impermeabilizada, medindo para os filhotes 40x25x15 cm e para os adultos 58x43x39 cm. Para os experimentos os ratos foram submetidos a uma sessão de habituação à arena, por 5 minutos. No dia seguinte os ratos retornaram à arena para uma sessão de treinamento de 5 minutos sendo apresentados agora a dois objetos idênticos, de madeira (A1 e A2), semelhantes em tamanho, cor e textura, e tendo formas iguais. Os objetos foram posicionados em dois cantos adjacentes e a 9 cm das paredes.

No teste de retenção de memória em curto prazo (MCP), 1,5 horas após a sessão de treinamento, os ratos foram colocados a explorar a arena por 5 minutos na presença de dois objetos: o objeto familiar A e um objeto diferente

B, colocados nos mesmos locais como no treinamento. No teste de retenção de memória a longo prazo (MLP), realizado 24 horas após sessão de treinamento, os ratos foram colocados a explorar a arena por 5 minutos na presença do objeto familiar A e de um terceiro objeto C diferente. Exploração foi definida como o tempo gasto em cheirar ou tocar o objeto com o nariz; sentar sobre o objeto não foi considerado exploração. Os mesmos animais foram usados para os testes de MCP e MLP. Os testes foram filmados para posterior quantificação de cada comportamento exibido pelos animais. Após o teste, o animal foi retirado do aparelho e neste foi passado algodão embebido em álcool etílico a 5% para limpeza e para disfarçar o cheiro do animal precedente.

Utilizando os dados obtidos, um índice de reconhecimento do novo objeto (IRNOB), para cada animal, foi calculado, como a taxa: $TN/(TF + TN)$, onde TF = tempo gasto explorando o objeto familiar (A), TN = tempo gasto explorando o objeto novo (B ou C) (Dix e Aggleton, 1999).

O labirinto octogonal utilizado nos experimentos foi construído em madeira impermeabilizada e consiste de uma plataforma central circular (20 cm de altura x 47 cm de diâmetro) acoplada, a oito braços idênticos, do mesmo tamanho (47x11x18 cm), distribuídos simetricamente à sua volta, todos recobertos com acrílico transparente.

No primeiro dia os animais foram colocados durante cinco minutos diretamente na plataforma central do aparelho para fazer seu reconhecimento. A partir do segundo dia e por três dias, os animais fizeram treinos de reconhecimento dos braços. No primeiro dia de treinamento os animais ficaram por 15 minutos no aparelho independentemente do número de braços frequentados; nos dias subsequentes de treino o animal foi retirado do labirinto assim que completou pelo menos uma entrada em cada braço ou tendo ficado 15 minutos no aparelho. Por último, o rato colocado previamente de jejum, foi estimulado a procurar uma porção de alimento colocada no final de um dos braços do aparelho (sempre o mesmo).

Na sala onde foi mantido o aparelho havia várias pistas à volta que serviram de orientação espacial aos animais para entrada preferencial em algum dos braços. Uma entrada num braço se refere à caminhada da plataforma circular central até o final da extensão daquele braço.

Para o teste da memória, o animal foi colocado na extremidade de um braço prefixado, diferente daquele em que esteve no período de treinamento, e deveria encontrar e interagir com o alimento. Toda a movimentação dos animais foi monitorada através de filmagem e foram registrados: a) número de braços visitados incorretamente; b) número de braços revisitados; c) tempo gasto para encontrar o alimento.

Ao final de cada sessão com cada animal no labirinto octogonal o aparelho foi higienizado com algodão embebido em álcool etílico (5%) para eliminar os vestígios do animal antecessor.

2.4 Testes bioquímico e histopatológico

Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados com solução de xilazina, dose de 10mg/Kg, e cetamina, dose de 80mg/Kg, por via IP para coleta de sangue por meio de punção cardíaca direta e em seguida eutanasiados (excesso de anestésico) para coleta do cérebro.

O sangue foi centrifugado a 2.500 rpm por 5 minutos e o soro coletado foi utilizado para dosagem espectrofotométrica (Espectrofotômetro Ultrospec 2000–Pharmacia Biotech) da atividade da enzima AChE (Kit Biotécnica-Brasil).

Para avaliação histopatológica os cérebros foram fixados em solução de formalina tamponada a 10%, durante 72 horas e em seguida processados dentro de cassetes, em histotécnica, para confecção dos blocos de parafina. Destes foram obtidos cortes de 4µm de espessura consecutivamente e montados em lâminas de vidro histológicas para esta finalidade. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e avaliadas ao microscópio.

2.5 Análise estatística dos resultados

Os dados coletados foram analisados estatisticamente utilizando-se análise de variância (One-Way ANOVA) através de software Instat 3.0 (*Graph Pad Software*). O teste de Tukey-Kramer Multiple Comparisons foi utilizado para identificar diferenças entre os grupos. A comparação entre os grupos foi considerada significativamente diferente quando $p < 0,05$.

3. Resultados

Nas mães gestantes não foram observados sinais de intoxicação pelo fipronil.

A avaliação da prole jovem no teste RNOB, demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os grupos analisados para a memória a curto prazo – MCP, porém, quanto à memória a longo prazo - MLP, os filhotes do grupo lactação apresentaram uma diminuição significativa ($p<0,05$) em relação ao controle (Figura 1).

A avaliação da prole adulta no teste RNOB, demonstrou que houve uma diminuição significativa ($p<0,05$) na MCP para os filhotes do grupo lactação em relação ao controle (Figura 2). Adicionalmente, a Figura 3 mostra que os filhotes do grupo lactação apresentaram uma diminuição significativa ($p<0,001$) na MLP em relação ao controle.

Os filhotes do grupo lactação tiveram um aumento significativo ($p<0,05$) no tempo para encontrar alimento no LO, em relação ao grupo Controle (Figura 4), demonstrando uma falha no comportamento de memória espacial. A Figura 5 mostra que os filhotes dos grupos lactação e G+L 7-14 apresentaram um aumento significativo ($p<0,05$ e $p<0,001$, respectivamente) no número de visitas incorretas aos braços do LO, em relação ao controle, confirmando a falha na memória, observada anteriormente. Na Figura 6 observa-se que houve um aumento significativo ($p<0,05$) no número de revisitações do grupo lactação em relação ao controle, resultado este que vai ao encontro aos dois anteriores.

Na dosagem da atividade da AChE não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os grupos analisados na prole jovem. A Figura 7 mostra os valores da dosagem da atividade da AChE para a prole adulta; observa-se que os filhotes dos grupos gestação, lactação e gest/lact 1-21 apresentaram um aumento estatisticamente significativo ($p<0,05$) na atividade da AChE, em relação ao controle.

A Tabela 1 e as Figuras 8-11 representam as observações obtidas na avaliação morfológica do cérebro dos filhotes dos vários grupos. A prole jovem do grupo Gest/Lact 7-14 apresentaram congestão vascular (Figura 8), no cérebro, de moderada à intensa. O grupo gestação apresentou a mesma alteração com intensidade leve à moderada, enquanto que os grupos Controle e

Gest/Lact 1-21 apresentaram a alteração de forma leve. O grupo Lactação não apresentou esta alteração histopatológica (Tabela 1-A). Na prole adulta, a congestão vascular ocorreu nos grupos gestação, lactação e gest/lact 7-14 de moderada à intensa. Já os grupos controle e gest/lact 1-21 não apresentaram esta alteração (Tabela 1-B).

Houve a presença de edema (Figura 9) nos cortes histológicos dos cérebros de ratos jovens e adultos expostos ao fipronil. Nos jovens, os grupos Lactação e Gest/Lact 1-21 apresentaram esta alteração de moderada à intensa (Tabela 1-A). Nos adultos (Tabela 1-B), o grupo Gestação apresentou edema intenso, enquanto os demais grupos apresentaram de modo leve à moderada.

O grupo Gest/Lact 7-14, jovens, apresentou satelitose de moderada à intensa (Tabela 1-A – Figura 10).

Com exceção do grupo Controle (jovens), todos os grupos apresentaram vacuolização (Figura 11) no sistema nervoso central, sendo que, nos ratos jovens (Tabela 1-A), no grupo Gestação a alteração foi intensa e nos demais grupos moderada à intensa. Nos adultos (Tabela 1-B), o grupo Controle apresentou a alteração de modo leve à moderada, o grupo Gestação de moderada à intensa e os demais grupos, intensa.

4. Discussão

Num experimento de exposição perinatal a agentes químicos, um dos óbvios sinais de toxicidade materna é a perda de peso (Chernoff et al., 2008), além de alterações na homeostase materna, o que poderia interferir indiretamente com o desenvolvimento dos filhotes (Smart e Dobbing, 1971; Salvatori et al., 2004). A não ocorrência de sinais de toxicidade materna no presente experimento nos leva a supor que, qualquer alteração ocorrendo com os filhotes foi, portanto exclusivamente devido à exposição ao fipronil.

Os resultados obtidos nos experimentos demonstraram que a exposição ao fipronil, no período perinatal, provocou alterações no comportamento de memória dos ratos jovens e adultos, sugerindo que o desenvolvimento neurocomportamental dos descendentes foi alterado pela exposição *in útero* e durante a lactação.

Segundo dados prévios da literatura, a exposição da fêmea a agroquímicos durante a prenhez e a lactação pode causar alterações refletidas em aspectos físicos e comportamentais, de acordo com o período do desenvolvimento animal (Kimmel, 1998; Chelonis et al., 2004; Costa et al., 2004). A exposição perinatal pode envolver efeitos latentes que só são observados tardiamente, mesmo nos casos em que a exposição ocorra em doses menores que aquelas que promovem efeitos evidentes em adultos.

Os testes no LO mostrando aumento no tempo para encontrar o alimento, no número de visitas incorretas e no número de revisitações, demonstram claramente um prejuízo ao comportamento de memória dos filhotes expostos através das mães. Os resultados mostram ainda que o período da lactação parece ser o mais crítico para estes efeitos observados.

A memória é a retenção da informação aprendida (Lynch, 2004), sendo um processo que requer a atividade integrada de diferentes regiões do encéfalo e sistemas de neurotransmissão (Hu et al., 2005). Já o aprendizado pode ser definido como o mecanismo pelo qual novas informações ou conhecimentos são adquiridos, ou seja, é a aquisição de novas informações, sendo o primeiro estágio da memória (Lynch, 2004).

Como lesões no sistema nervoso central podem alterar as fases de aquisição, consolidação e evocação da memória e a consolidação da memória ocorre principalmente no hipocampo (Silveira et al., 2013), sendo o sistema GABAérgico fundamental, tanto para o desenvolvimento quanto para manutenção, da memória no hipocampo (Stanley et al., 2012), os resultados obtidos aqui com o fipronil, um antagonista dos receptores do GABA, poderiam sugerir que sua ação tóxica de diminuição do comportamento de memória, talvez atue sobre esta área cerebral.

Estudos têm mostrado que, quando as lesões que englobam o hipocampo são superiores a 75%, a memória é significativamente prejudicada (Stanley et al., 2012). Apesar da avaliação morfológica no presente estudo não ter sido realizada especificamente para o hipocampo, as lesões evidenciadas nos cérebros dos animais podem corroborar com esta afirmação destes autores.

No teste de reconhecimento de novo objeto não houve diferença significativa entre os grupos analisados para a memória à curto prazo nos ratos jovens. Porém, para memória à longo prazo, os ratos jovens do grupo lactação

apresentaram uma diminuição significativa em relação ao grupo controle. Nos ratos adultos, houve uma diminuição significativa na memória à curto prazo e à longo prazo do grupo lactação em relação ao grupo controle. Estes resultados confirmam, de certo modo, o que foi observado no LO com a memória espacial.

Os testes do RNOB e LO são especialmente adequados para testar os efeitos de intervenções farmacológicas e agentes químicos sobre os comportamentos de aprendizado e memória. O que é novidade induz a excitação e tem efeitos motivacionais que são utilizados como um reforço para induzir a aprendizagem (Silveira et al., 2013).

De acordo com McEown e Treit (2010), drogas que ativam o sistema GABAérgico promovem prejuízo na formação da memória, quando administradas no ventrículo lateral, prosencéfalo basal, hipocampo e amígdala. Nossos resultados parecem sugerir o contrário do que é afirmado por estes autores, uma vez que o fipronil é inibidor do sistema do GABA. As diferenças podem ser causadas pela forma e via de administração, já que McEown e Treit fizeram administração direta em locais específicos do SNC enquanto que os presentes resultados são devido à exposição perinatal.

Em roedores, os testes para acessar a memória de reconhecimento de um novo objeto são baseados na tendência natural dos animais em explorar o novo (Ennauceur, 2010). A partir da maior exploração de um objeto não familiar em detrimento do já conhecido, é possível calcular um índice de discriminação utilizando a proporção de tempo que o animal despende investigando um novo objeto comparado àquele familiar. Uma extensa linha de evidências obtidas dos estudos com lesões em roedores implica o córtex perirrinal como a região cerebral necessária para o reconhecimento de um novo objeto, baseada em sugestões visuais (Albasser et al., 2010) enquanto que detecção de novo objeto baseada em sugestões espaciais, requer utilização da função do hipocampo, córtex parahipocampal e córtex entorrinal (Barker e Warburton, 2011). Seguindo esta linha de raciocínio, as evidências obtidas com este teste em nossos experimentos, não excluem uma ação do fipronil afetando a região do córtex cerebral perirrinal já que o teste realizado utilizou-se de provas visuais.

Há muito tempo dados de estudos neurofisiológicos incluindo ambos, lesão e avaliações eletrofisiológicas em humanos e animais, já têm mostrado que certas áreas do cérebro ricas em receptores GABA (por exemplo amígdala,

septo, hipocampo e córtex entorrinal) têm função importante em processos de memória (Rawlins, 1987; Davis, 1994).

Há evidências experimentais mostrando que, na progressão de doenças neurotóxicas, os eventos bioquímicos precedem as alterações estruturais e danos permanentes ao sistema nervoso central (Kamel e Hoppin, 2004). As concentrações de acetilcolina (ACh), como os inibidores da acetilcolinesterase (AChE), são ferramentas terapêuticas conhecidas para melhorar deficiências cognitivas associadas com doenças neurodegenerativas (Silveira et al., 2013).

No presente estudo, houve aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade da AChE na prole adulta dos grupos gestação, lactação e gest/lact 1-21 em relação ao grupo controle.

Alterações da dinâmica e da atividade em vários neurotransmissores dentro da formação hipocampal evidenciam que alguns mediadores do processo de aprendizado e memória, incluindo acetilcolina, jogam um importante papel na formação da memória no hipocampo. Isto foi possível de ser descoberto através do impedimento do aprendizado/memória em seguida à administração de antagonistas dos respectivos receptores destes mediadores (Dere et al., 2007). De acordo com Schmatz et al. (2009), modificações na atividade da AChE tem sido associadas à danos nos processos de memória e aprendizagem.

Os dados da literatura quanto ao efeito do fipronil sobre alterações bioquímicas, incluindo a atividade da AChE, são raros. Gill e Dumka (2013) ao exporem bezerros de búfalos ao fipronil, na dose de 0,5 mg/Kg/dia, por via oral, durante 98 dias, não observaram alteração significativa na atividade da AChE enquanto que Gupta et al. (2014) ao exporem carpas (*Cyprinus carpio*) ao fipronil, em concentrações de 0,01; 0,1; 1,0 e 10,0 mg/L⁻¹, observaram redução significativa (aproximadamente 50%) da AChE no cérebro destes animais. Apesar das diferenças no perfil dos experimentos, os resultados obtidos no presente estudo com filhotes expostos perinatalmente ao fipronil, não corroboram com os dados obtidos por Gupta et al. (2014) e por Gill e Dumka (2013).

No presente estudo o aumento da atividade da AChE levando à uma redução de acetilcolina nos ratos adultos poderia prejudicar o comportamento da memória, como constatado nos testes do LO e RNOB.

Agentes neurotóxicos podem causar lesão no cérebro, especialmente se as exposições ocorrerem durante o período de desenvolvimento precoce. Se os processos de desenvolvimento do sistema nervoso do feto imaturo são prejudicados, os efeitos tendem a ser duradouros e, possivelmente, permanentes (Julvez e Grandjean, 2009). Esta poderia ser a situação ocorrida em nosso experimento de exposição perinatal ao fipronil.

No presente estudo, a avaliação histológica no cérebro dos filhotes expostos ao fipronil mostrou que tanto os animais jovens quanto os adultos tiveram alterações morfológicas distintas, incluindo congestão vascular, edema, satelitose e vacuolização. Estas alterações morfológicas ocorrendo em diversas áreas do cérebro poderiam levar ao prejuízo das funções cerebrais, inclusive daquelas relacionadas ao comportamento de memória. A inexistência de dados de literatura relativos ao fipronil, neste sentido, prejudica uma comparação dos nossos resultados, porém, por outro lado engrandece o caráter inédito do presente estudo.

5. Conclusão

Fipronil alterou o desenvolvimento neurocomportamental de ratos jovens e adultos, expostos durante o período perinatal, causando prejuízos à memória espacial e à memória cognitiva, a curto e a longo prazo, demonstrando um efeito neurotóxico duradouro.

Fipronil alterou funções do sistema colinérgico que podem influenciar o comportamento de memória.

As lesões histopatológicas desenvolvidas no cérebro pelo fipronil podem estar relacionadas a este efeito neurotóxico.

REFERÊNCIAS

- Albasser, M.M.; Chapman, R.J.; Amin, E.; Iordanova, M.D.; Vann, D.S.; Aggleton, J.P., 2010. New behavioral protocols to extend our knowledge of rodent object recognition memory. *Learn. Mem.* v.17(8), p.407–19.
- Barker, G.R.E.; Warburton, E.C., 2011. When is the hippocampus involved in recognition memory?. *J. Neurosci.*, v.31(29), p.10721–10731.
- Bouchard, M.F.; Chevrier, J.; Harley, K.G.; Kogut, K.; Vedar, M.; Calderon, N.; Trujillo, C.; Johnson, C.; Bradman, A.; Barr, D.B.; Eskenazi, B., 2011. Prenatal exposure to organophosphate pesticides and IQ in 7-year-old children. *Environ Health Perspect.* v.119, n.8, p.1189-1195.
- Cammarota, M.; Bevilacqua, L.R.; Rossato, J.I.; Ramirez, M.; Medina, J.H.; Izquierdo, I., 2005. Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. *Neurobiol Learn Mem.* v.84, n.1, p.25-32.
- Chelonis, J.; Flake, R.; Baldwin, R.; Blake, B.; Paule, M., 2004. Developmental Aspects of Timing Behavior in Children. *Neurotoxicology and Teratology.* v.26, p.461–476.
- Chernoff N, Rogers EH, Gage MI, Francis BM. The relationship of maternal and fetal toxicity in developmental toxicology bioassays with notes on the biological significance of the “no observed adverse effect level”. *Repr. Toxicol.* v.25, p.192–202, 2008.
- Cole, L.M.; Nicholson, R.A.; Casida, J.E., 1993. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-Gated chloride channel. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* v.46, n.1, p.47-54.
- Costa, L.; Ascher, M.; Vitalone, A.; Syversen, T.; Soldin, O., 2004. Developmental Neuropathology of Environmental Agents. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* v.44, p.87-110.
- 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.
- Davis, M., 1994. The role of the amygdala in emotional learning. *Int. Rev. Neurobiol.*, v.36, p.225–266.
- Dere, E.; Huston, J.P.; De Souza Silva, M.A., 2007. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosc. Biobehav. Rev.*, v.31(5), p.673–704.
- Dix, S.L.; Aggleton, J.P., 1999. Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behavioural Brain Research.* v.99, p.191-200.
- Ecobichon, D.J., 2001. Toxic effects of pesticides, in: Klaassen, C.D. Casarett & Doull's Toxicology - The basic science of poisons, McGraw-Hill: New York, p. 763–810.
- Ennaceur, A., 2010. One-trial object recognition memory in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav. Brain Res.*, v.215, n.2, p.244–54.
- Gill, K.K.; Dumka, V.K., 2013. Biochemical alterations induced by oral subchronic exposure to fipronil, fluoride and their combination in buffalo calves. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* v. 36, p. 1113-1119.
- Gupta, S.K.; Pal, A.K.; Sahu, N.P.; Saharan, N.; Prakash, C.; Akhtar, M.S.; Kumar, S., 2014. Haemato-biochemical responses in *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) fry exposed to sub-lethal concentration of a phenylpyrazole insecticide, fipronil. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences.* v. 84, n. 1; p. 113-122.
- Hainzl, D; Casida, J.E., 1996. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy Sciences, U.S.A.* v.93, p.12746–12767.

- Hainzl, D.; Cole, L.M.; Casida, J.E., 1998. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chem. Res. Toxicol.* v.11, n.12, p.1529-1535.
- Hu, Y.; Xia, Z.; Sun, Q.; Orsi, A.; Rees, D., 2005. A new approach to the pharmacological regulation of memory: Sarsasapogenin improves memory by elevating the low muscarinic acetylcholine receptor density in brains of memory-deficit rat models. *Brain Res.* v.1060, p.26-39.
- Ikeda, T.; Zhao, X.; Nagata, K.; Kono, Y.; Shono, T.; Yeh, J.Z.; Narahashi, T., 2001. Fipronil modulation of gamma-aminobutyric acid_A receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* v.296, n.3, p.914-921.
- IPCS - International Programme on Chemical Safety., 2001. Environmental health criteria 223. Neurotoxicity risk assessment for human health: principles and approaches. Geneva: World Health Organization (WHO); ISBN 94 4 157223 X.
- Jennings, K.A.; Canerdy, T.D.; Keller, R.J.; Atieh, B.H.; Doss, R.B.; Gupta, R.C., 2002. Human exposure to fipronil from dogs treated with frontline. *Vet. Hum. Toxicol.* v.44, n.5, p.301-303.
- Julvez, J.; Grandjean, P., 2009. Neurodevelopmental Toxicity Risks Due to Occupational Exposure to Industrial Chemicals during Pregnancy. *Industrial Health.* v. 47, p. 459-468.
- Kamel, F.; Hoppin, J.A., 2004. Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. *Environmental Health Perspectives.* v.112, p.950-958.
- Kimmel, C., 1998. Current Approaches to Risk Assessment for Developmental Neurotoxicology. In Slikker, W.; Chang, L. *Handbook of Developmental Neurotoxicology.* San Diego: Academic Press. p.675-685.
- Lynch, M.A., 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiol. Rev.* v.84, p.87-136.
- Matsuda, K.; Buckingham, S.D.; Kleier, D.; Rauh, J.J.; Grauso, M.; Sattelle, D.B., 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* v.22, p.573-580.
- McEown, K.; Treit, D., 2010. Inactivation of the dorsal or ventral hippocampus with muscimol differentially affects fear and memory. *Brain Research.* v.1353, p.145-151.
- Menzies, L.; Ooi, C.; Kamath, S.; Suckling, J.; McKenna, P.; Fletcher, P.; Bullmore, E.; Stephenson, C., 2007. Effects of gamma-aminobutyric acid-modulating drugs on working memory and brain function in patients with schizophrenia. *Arch. Gen. Psych.* v.64, n.2, p.56-67.
- Michels, L.; Martin, E.; Klaver, P.; Edden, R.; Zelaya, F.; Lythgoe, D.J.; Luchinger, R.; Brandeis, D.; O'Gorman, R.L., 2012. Frontal GABA levels change during working memory. *PLoS One.* v.7, p.e3193, doi:10.1371/journal.pone.0031933.
- Mostafalou, S.; Abdollahi, M., 2012. Concerns of environmental persistence of pesticides and human chronic diseases. *Clin. Exp. Pharmacol.* S5:e002. doi:10.4172/2161-1459.S5-e002.
- Ngim, K.K.; Crosby, D.G., 2001. Abiotic process influencing fipronil and desthiofipronil dissipation in California, USA, rice fields. *Environ. Toxicol. Chem.* v.20, p. 972-977.
- Olton, D.S., 1987. The Radial Arm Maze as a tool in the behavioral pharmacology. *Physiology and Behavior.* v.40, p.793-797.
- Ratra, G.S.; Erkkila, B.E.; Weiss, D.S.; Casida, J.E., 2002. Unique insecticide specificity of human homomeric rho 1 GABA(C) receptor. *Toxicol. Lett.* v.129, p.47-53.
- Rawling, J.N.P., 1987. Do hippocampal lesions produce amnesia in animals? In Stahl, S.M.; Iversen, S.D. Goodman, E.C. *Cognitive Neurochemistry.* Oxford: Oxford University Press, p.73-89.
- Salvatori F, Talasi CB, Salzgeber SA, Spinoso HS, Bernardi MM. Embryotoxic and Long-term Effects of Cadmium Exposure During Embryogenesis in Rats. *Neurotoxicology and Teratology.* 2004, 26:673-680.

- Scharf, M.E.; Siegfried, B.D., 1999. Toxicity and neurophysiological effects of fipronil and fipronil sulfone on the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. v.40, p.150-156.
- Schmatz, R.; Mazzanti, C.M.; Spanevello, R.; Stefanello, N.; Gutierrez, J.; Corrêa, M.; Rosa, M.M.; Rubin, M.A.; Schetinger, M.R.C.; Morsch, V.M., 2009. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*. v.610, p.42-48.
- Shafer, T.J.; Meyer, D.A.; Crofton, K.M., 2005. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environmental Health Perspectives*. v.113, n.2, p. 123-136.
- Silveira, C.K.B.; Furini, C.R.G.; Benetti, F.; Monteiro, S.C.; Izquierdo, I., 2013. The role of histamine receptors in the consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*. v.103, p.64-71.
- Smart JL, Dobbing J. Vulnerability of developing brain: II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour on the rat. *Brain Res*. v.28, p.85-95, 1971.
- Souza, A.; Medeiros, A.R.; Souza, A.C.; Wink, M.; Siqueira, I.R.; Ferreira, M.B.; Fernandes, L.; Loayza H.M.P.; Torres, I.L., 2011. Evaluation of the impact of exposure to pesticides on the health of the rural population: Vale do Taquari, State of Rio Grande do Sul (Brazil). *Cien. Saude Colet*. v.16, n.8, p.3519–3528.
- Stanley, E.M.; Wilson, M.A.; Fadel, J.R., 2012. Hippocampal neurotransmitter efflux during one-trial novel object recognition in rats. *Neuroscience Letters*. v. 511, p. 38-42.
- Tang, J.; Usmani, A.; Hodgson, E.; Rose, R.L., 2004. 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.
- Terçariol, P. R., Godinho, A. F., 2011. Behavioral effects of acute exposure to the insecticide fipronil. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. v.99, p.221-225.
- Tingle, C.C.D.; Rother, J.A.; Dewhurst, C.F.; Lauer, S.; King, W.J., 2003. Fipronil: Environmental Fate, Ecotoxicology, and Human Health Concerns. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. v.176, p.1-66.
- Udo, M.S.B.; Sandini, T.M.; Reis, T.M.; Bernardi, M.M.; Spinosa, H.S., 2014. Prenatal exposure to a low fipronil dose disturbs maternal behavior and reflex development in rats. *Neurotoxicology and Teratology*. p.1-7.
- Wilde, G.E.; Whitworth, R.J., Claassen, M.; Shufan, R.A., 2001. Seed treatment for control of wheat insects and its effect on yield. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*. v.18, p.1–11.
- Zhao, X.; Yeh, J.Z.; Salgado, V.L.; Narahashi, T., 2005. Sulfone metabolite of fipronil blocks γ -aminobutyric acid and glutamate-activated chloride channels in mammalian and insect neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v.314, n.1, p.363-373.

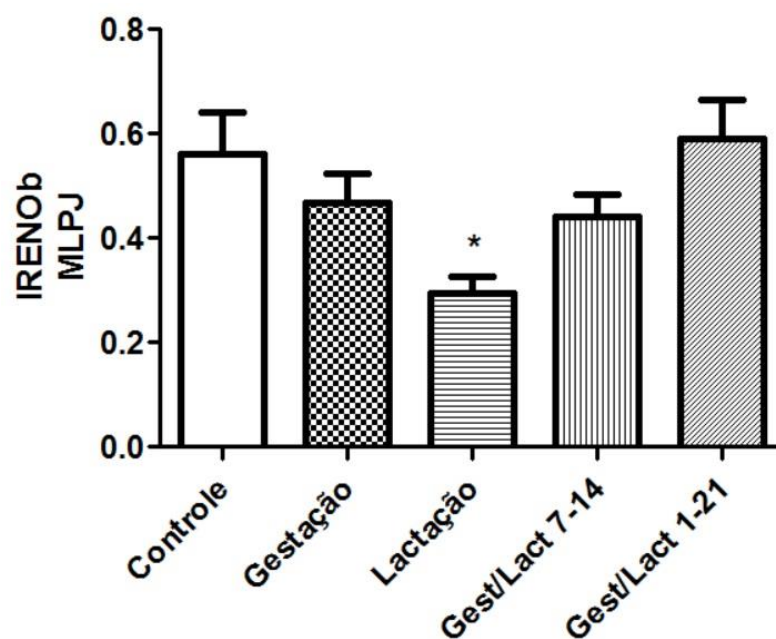


Figura 1. Índice de reconhecimento de um novo objeto (IRENOb) para memória a longo prazo na prole jovem (MLPJ), de mães expostas ao fipronil no período perinatal. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (N=15). * $p < 0,05$ em relação ao Controle.

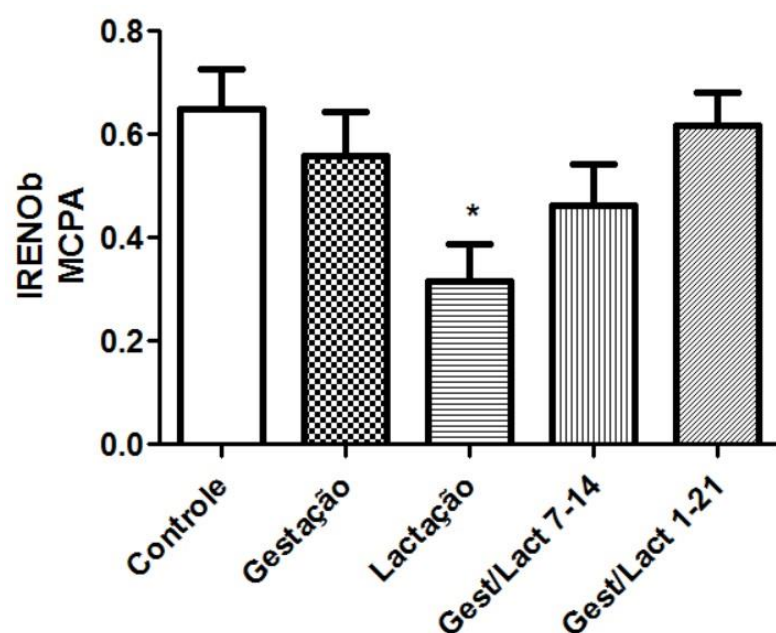


Figura 2. Índice de reconhecimento de um novo objeto (IRENOb) para memória a curto prazo na prole adulta (MCPA), de mães expostas ao fipronil no período perinatal. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (N=15). * $p < 0,05$ em relação ao Controle.

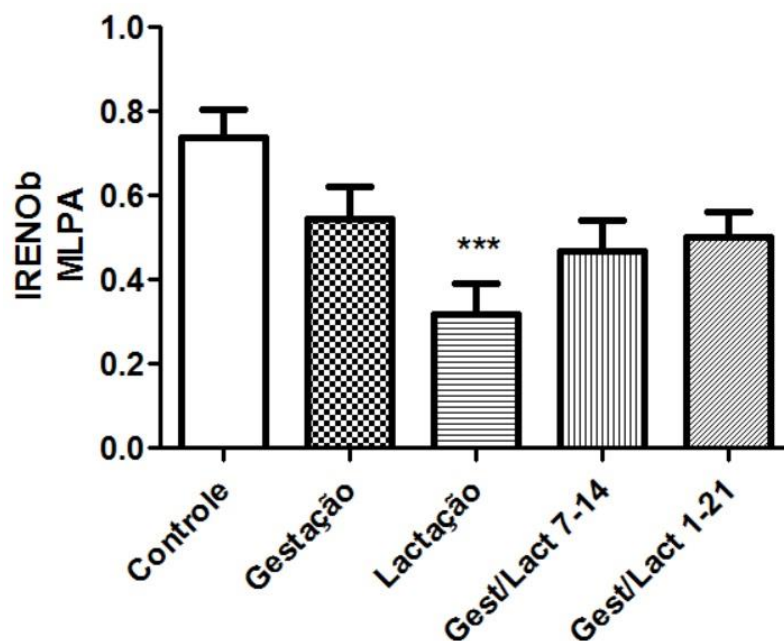


Figura 3. Índice de reconhecimento de um novo objeto (IRENOb) para memória a longo prazo na prole adulta (MLPA), de mães expostas ao fipronil no período perinatal. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (N=15). *** $p < 0,001$ em relação ao Controle.

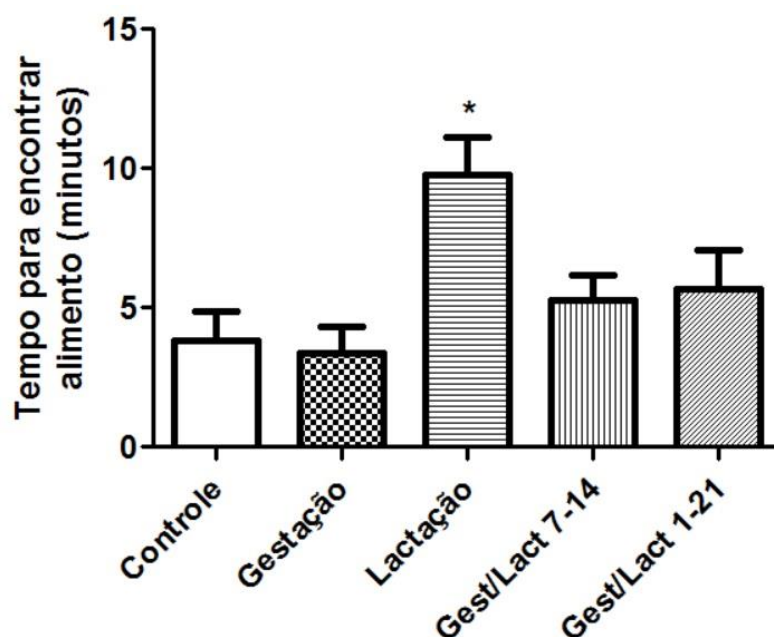


Figura 4. Tempo para encontrar alimento, no comportamento de memória, no labirinto octogonal, em filhotes de mães expostas ao fipronil no período perinatal. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (N=15). * $p < 0,05$ em relação ao Controle.

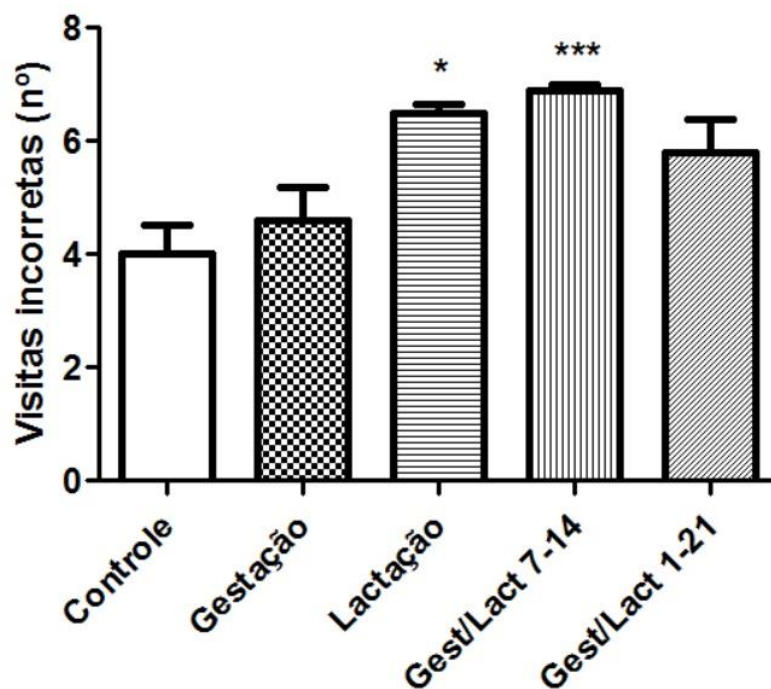


Figura 5. Número de visitas à braços incorretos, no comportamento de memória, no labirinto octogonal, em filhotes de mães expostas ao fipronil no período perinatal. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (N=15). * $p < 0,05$ e *** $p > 0,001$ em relação ao Controle.

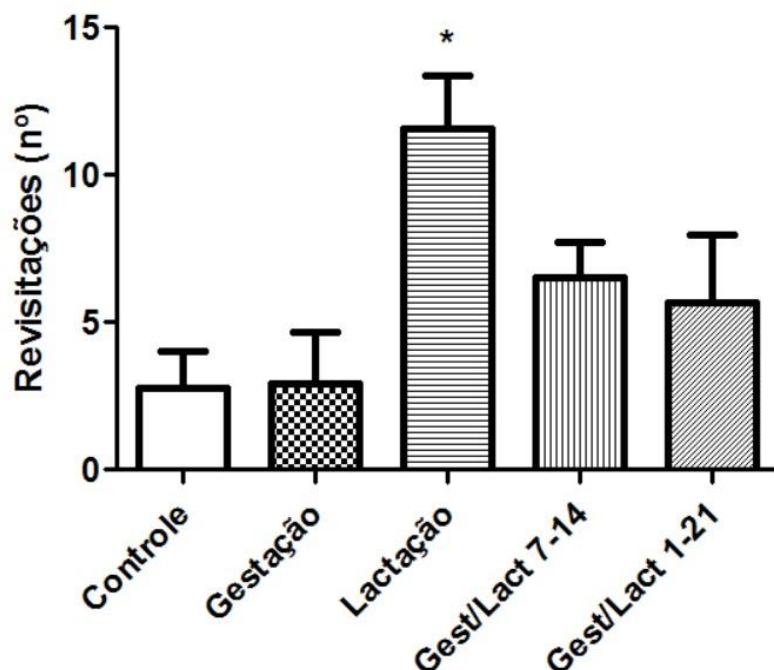


Figura 6. Número de revisitações à braços incorretos, no comportamento de memória, no labirinto octogonal, em filhotes de mães expostas ao fipronil no período perinatal. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (N=15). * $p < 0,05$ em relação ao Controle.

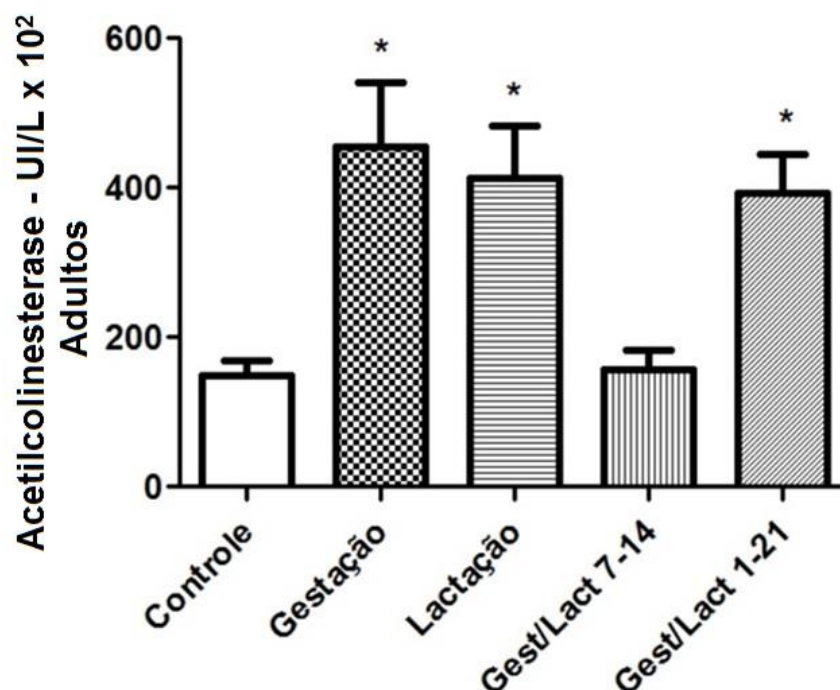


Figura 7. Dosagem da enzima acetilcolinesterase sérica na prole adulta de mães expostas ao fipronil no período perinatal.

Os valores representam a média ± E.P.M. (N=15). * $p < 0,05$ em relação ao Controle.

Tabela 1A.

Alteração Patológica	Controle	Gestação	Lactação	Gest/Lact 7-14	Gest/Lact 1-21
Congestão vascular	+	++	s.a.	+++	+
Edema	s.a.	s.a.	+++	s.a.	+++
Sateliteose	s.a.	s.a.	s.a.	+++	s.a.
Vacuolização	s.a.	++++	+++	+++	+++

Tabela 1B.

Alteração Patológica	Controle	Gestação	Lactação	Gest/Lact 7-14	Gest/Lact 1-21
Congestão vascular	s.a.	+++	+++	+++	s.a.
Edema	++	++++	++	++	++
Sateliteose	s.a.	s.a.	s.a.	s.a.	s.a.
Vacuolização	++	+++	++++	++++	++++

Tabela 1. Alterações histopatológicas no cérebro da prole de ratos Wistar (jovens – 1A e adultos – 1B) de mães expostas ao fipronil no período perinatal.

NOTA: s.a (sem alteração); + (alteração leve); ++ (alteração leve à moderada); +++ (alteração moderada à intensa); ++++ (alteração intensa).



Figura 8. Congestão vascular no cérebro de filhotes de ratas expostas ao fipronil no período perinatal. Aumento de 400x.



Figura 9. Edema no cérebro de filhotes de ratas expostas ao fipronil no período perinatal. Aumento de 100x

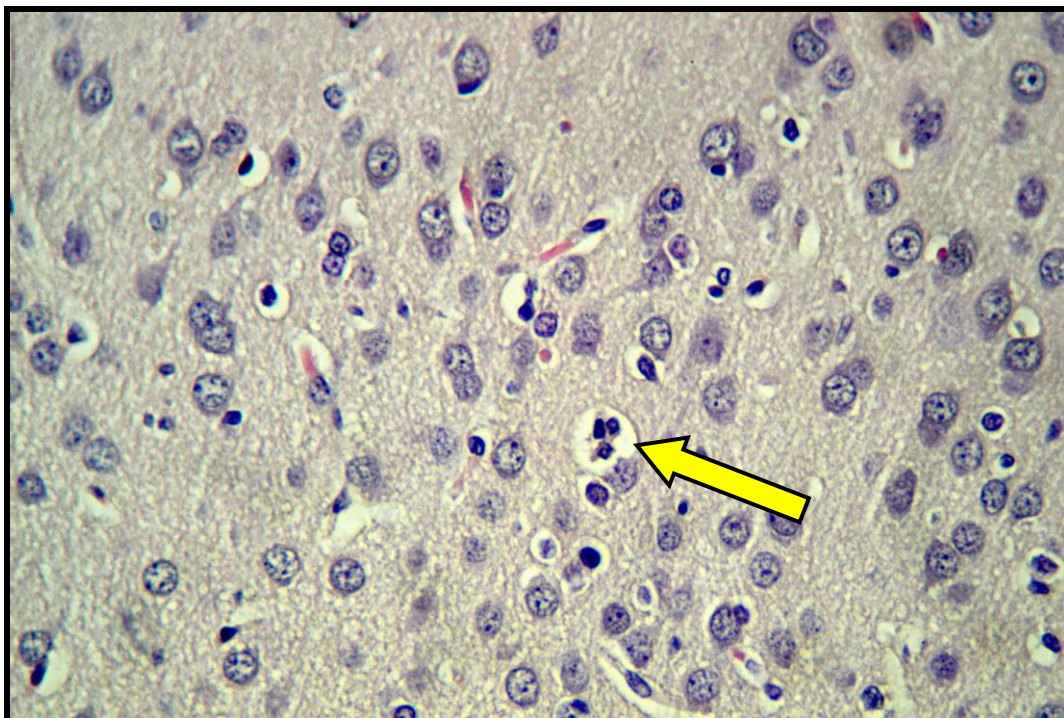


Figura 10. Satelitose no cérebro de filhotes de ratas expostas ao fipronil no período perinatal. Aumento de 400x.

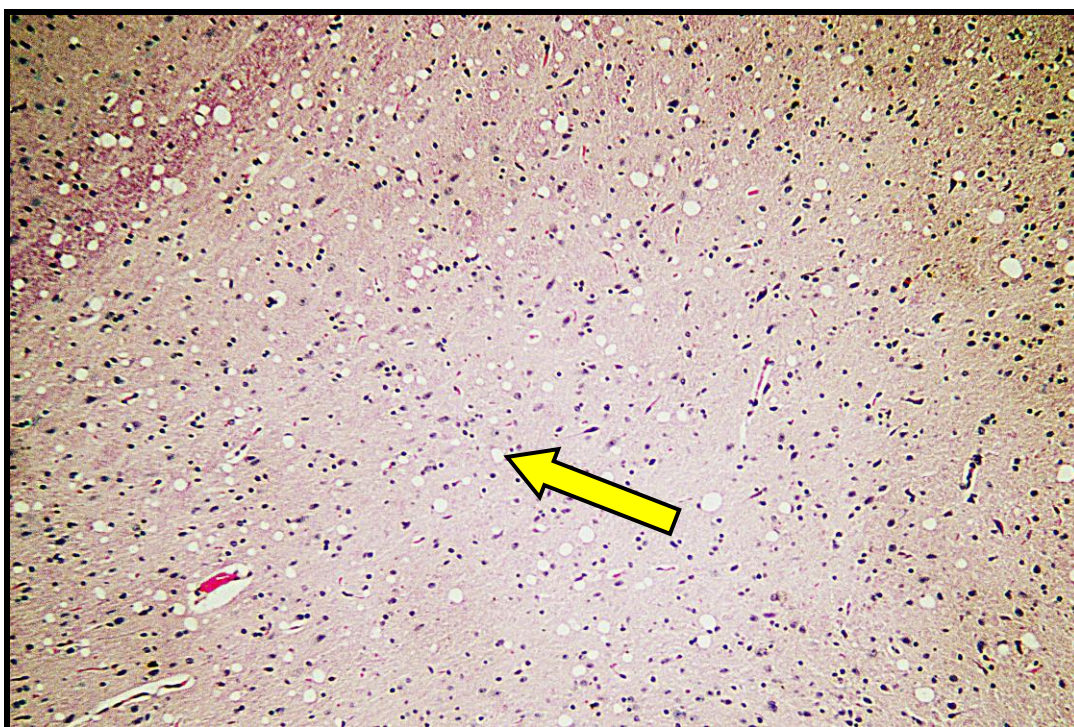


Figura 11. Vacuolização no cérebro de filhotes de ratas expostas ao fipronil no período perinatal. Aumento de 40x.

CAPÍTULO 4.

Trabalho a ser enviado para a revista *Toxicology*

Coordenação motora afetada por fipronil em filhotes de ratas expostas ao praguicida

(Motor coordination affected by fipronil in offsprings of rats pesticide exposed)

Francisco Pizzolato Montanha^{a*}, Caique Aparecido Faria^b, Faber Daniel Machado^b, Fábio Anselmo^c, Antonio Francisco Godinho^d, Noeme Sousa Rocha^e

^a Doutorando na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. chicopm28@yahoo.com.br. *autor para correspondência

^b Iniciação científica na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. caiquefaria32@hotmail.com; faber.machado@hotmail.com

^c Mestrando na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. anselmof_unesp@yahoo.com.br.

^d Docente na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. godinho@ibb.unesp.br

^e Docente na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. rochanoeme@fmvz.unesp.br

RESUMO

A larga utilização de praguicidas a nível mundial tem trazido benefícios para a produção especialmente na agricultura e na pecuária, porém, a contaminação ambiental e os danos à saúde animal e à humana, têm suscitado fortes reflexões a respeito de sua utilização desenfreada. Este estudo teve como objetivo avaliar os comportamentos de coordenação motora, exploração e locomoção, na prole jovem e adulta de ratas expostas ao fipronil no período perinatal. Para este estudo, ratas gestantes foram distribuídas em cinco grupos com 15 animais cada, respectivamente controle, gestação, lactação, gest/lact 7-14 e gest/lact 1-21. Os ratos jovens (25-30 dias) e adultos (75-80 dias) foram avaliados para coordenação motora e exploração utilizando-se o hole-board (HB) e para locomoção, utilizando-se da arena de campo aberto (ACA). O fipronil e seu metabólito ativo sulfona foram quantificados no cérebro da prole jovem e adulta. Os resultados dos experimentos mostraram que houve diminuição da coordenação motora na prole jovem, sem alteração das capacidades de exploração e locomoção. Ainda, que os danos causados pelo praguicida parecem ser dependentes da sua presença e de seu metabólito ativo sulfona, no tecido cerebral. Conclui-se que fipronil causou diminuição da coordenação motora na prole na idade jovem, sugerindo toxicidade sobre os nervos motores.

Palavras-chave: Arena de Campo Aberto, Fenilpirazol, Hole-Board, Toxicidade, Fipronil sulfona.

ABSTRACT

The widespread use of pesticides in the world has brought benefits to the production especially in agriculture and livestock but, environmental contamination and damage to animal and human health, has raised strong reflections on their wild use. This study aimed evaluate the behavior of motor coordination, exploration and locomotion in offsprings and adult rats exposed to fipronil in the perinatal period. For this study, pregnant rats were distributed into five groups of 15 animals each, respectively control, gestation, lactation, gest/lact 7-14 and gest/lact 1-21. The young (25-30 days) and adults (75-80 days) offsprings were evaluated for motor coordination and exploration using the hole-board (HB), and locomotion, using the open field arena (ACA). Fipronil and its active metabolite sulfone were measured in the brains of young and adult offspring. The experimental results showed that there was decreased motor coordination in young offspring and no change of exploration and locomotion capabilities. Still, that the damage caused for the pesticide appear to be dependent on their presence and its active metabolite sulfone, in brain tissue. It is concluded that fipronil caused decreased motor coordination in the offspring at a young age, suggesting toxicity on motor nerves.

Keywords: Open Field test, Phenylpyrazole, Hole-Board, Toxicity, Sulfone.

1. Introdução e objetivo

Modernamente, a utilização de praguicidas pelo homem tem sido implementada com a visão de que muitos benefícios podem ser obtidos, principalmente melhorando a produção com diminuição dos prejuízos (Ecobichon, 2001).

Nas últimas décadas, tem se percebido que o contato em longo prazo com os praguicidas, através da exposição pelo meio ambiente contaminado e exposição ocupacional, pode prejudicar a vida humana e perturbar a função de diferentes sistemas orgânicos no corpo, incluindo o nervoso, o endócrino, o imune, o reprodutivo, o renal, o cardiovascular e o respiratório (PAHO, 2002; Kamel e Hoppin, 2004; Andersen et al., 2015).

Dados epidemiológicos, relatos clínicos e estudos de laboratório têm evidenciado que o uso generalizado de compostos praguicidas em agricultura, pecuária e a nível doméstico tem levantado muitas questões acerca da segurança do uso destes compostos por humanos, quando se trata das exposições ocupacionais principalmente, e daquela provocada pelos *hobbies*, como jardinagem, por exemplo (Maroni et al., 2000; Franklin e Worgan, 2005; Rodriguez et al., 2006; Rothlein et al., 2006).

Recentemente, relatos científicos têm evidenciado que é elevado o potencial de toxicidade dos praguicidas para animais e humanos e a associação do uso indiscriminado destas substâncias com alterações do neurodesenvolvimento em crianças, tem chamado a atenção para os vários problemas decorrentes da sua utilização e as exposições que ocorrem no período perinatal (Garcia et al., 2003; Shafer et al., 2005; Bouchard et al., 2011; González-Alzaga et al., 2014).

Fipronil (5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-[(trifluoromethyl) sulfinyl]-1H-pyrazole-3-carbonitrile) é um praguicida, derivado quimicamente da família do fenilpirazol ou fiproles que tem como alvo o receptor do ácido gama amino butírico (GABA) (Wilde et al., 2001). Possui amplo espectro de ação (Gill e Dumka, 2013), é extremamente ativo (Tang et al., 2004) e altamente eficaz (Zhao et al., 2005; Gill e Dumka, 2013).

É usado na agricultura contra uma grande variedade de pragas que infestam alimentos (Scharf e Siegfried, 1999; Ngim e Crosby, 2001; Wilde et al.,

2001). Também é usado em outras aplicações que incluem o controle das pragas veterinárias (Jennings et al., 2002). Além disso, o fipronil foi designado pela agência de proteção ambiental (EPA) como alternativa ao uso de organofosforados para o controle de cupins e formigas, porém, várias questões sobre efeitos adversos do fipronil na saúde pública foram levantadas por ser largamente comercializado e utilizado inclusive a nível doméstico (Jennings et al., 2002; Tingle et al., 2003).

Apesar de sua propagada seletividade contra insetos (Cole et al., 1993; Hainzl e Casida, 1996; Matsuda et al., 2001) o fipronil também se liga a receptores GABAérgicos de mamíferos (Hainzl e Casida, 1996; Hainzl et al., 1998; Ikeda et al., 2001; Ratra et al., 2002). O principal metabólito sulfona bem como seu produto de fotodegradação dessulfinil foram relatados serem mais tóxicos a insetos, mamíferos, peixes e pássaros, do que o composto original (Das et al., 2006).

Apesar da neurotoxicidade dos fenilpirazóis ser bem caracterizada e seu mecanismo de ação em mamíferos ser conhecido, seu potencial para provocar efeitos comportamentais ainda é desconhecido. Recentemente, foi demonstrado que fipronil pode interferir com a atividade neurocomportamental em ratos (Terçariol e Godinho, 2011; Udo et al., 2014). Como uma das funções neurológicas para a qual os efeitos adversos de praguicidas neurotóxicos tem sido mostrado repetidamente é a comportamental, conhecer os efeitos do fipronil sobre esta função do sistema nervoso, em animais e humanos, torna-se uma necessidade frente ao seu uso atual em larga escala.

Comportamento é o produto da integração de vias como a sensorial, a motora e de várias funções associadas ao sistema nervoso, e a hipótese é que as substâncias neurotóxicas podem adversamente afetar uma ou mais destas funções, desregulando vários processos de aprendizagem e memória, ou causar outros efeitos comportamentais prejudiciais (IPCS/WHO, 2001).

A importância de estudos neurocomportamentais reside no fato de que comportamento é considerado como um produto final funcional de vários processos sensoriais, motores e integrativos, que ocorrem no sistema nervoso. Por isso, avaliação de alterações comportamentais tem sido reconhecida como um indicador padrão de toxicidade em humanos e animais, expostos à agentes

químicos considerados por terem potencial neurotóxico (Terçariol e Godinho, 2011).

Dados da literatura tem relatado que praguicidas clorados são capazes de provocar alterações no desenvolvimento motor em animais e humanos (Koopman-Esseboom et al., 1996; Dallaire et al., 2012; Forns et al., 2012; Jin et al., 2015). Adicionalmente, recentemente Godinho et al., (2014) observaram que o piretróide permetrina, provoca incoordenação motora em ratos adultos e esta ação parece estar relacionada ao efeito de íons cálcio e os canais com os quais ele está envolvido. À semelhança do fipronil, alguns destes pesticidas clorados e também permetrina interferem com o ácido gama amino butírico (GABA) na sua ação tóxica.

Os objetivos deste estudo foram avaliar os comportamentos de coordenação motora, exploração e locomoção, na prole jovem e adulta de ratas expostas ao fipronil no período perinatal.

2. Materiais e métodos

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FMVZ-UNESP (protocolo número 59/2012).

2.1 Animais

Ratos Wistar fêmeas e machos, obtidos da colônia do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu, foram os animais utilizados no presente estudo. Foram retirados do Biotério Central com 22 dias de vida, logo após o desmame, e alocados no biotério do Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX), sob condições controladas de temperatura ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa (55 ± 5), ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, exaustão contínua, recebendo água e ração sem restrição, até os 80 dias de vida, quando atingiram a idade de acasalamento. Durante todo o experimento, a cada três dias, foram feitas trocas de forragem de maravalha e lavagem das gaiolas de polipropileno.

2.2 Procedimento experimental

Para o acasalamento, os animais foram colocados numa mesma gaiola, na proporção de três fêmeas para um macho. Após lavado vaginal, realizado a cada 24 horas do período de acasamento, fêmeas que apresentaram espermatozoide no canal vaginal foram consideradas prenhes e separadas em caixas isoladas, sendo este o dia zero da gestação. As gestantes foram separadas aleatoriamente em 5 grupos de 15 animais, denominados respectivamente: controle (Ct), gestação (G), lactação (L), gest/lact 7-14 (G+L 7-14) e gest/lact 1-21 (G+L 1-21). A cada três dias, as ratas prenhes foram pesadas.

Para os experimentos foi utilizado o fipronil na forma de um dos seus produtos comerciais, o Topline® (concentração a 1% - Merial do Brasil). Os animais foram expostos a 1 mg do princípio ativo por quilograma de peso por dia, por via dermal (tópica), na região dorsal do pescoço, após tricotomia. Os animais do grupo controle receberam 0,2 mL de óleo de milho durante os períodos de gestação e lactação do 7º ao 14º dias; os grupos G, L e G+L 7-14 foram expostos ao fipronil do 7º ao 14º dias da gestação e/ou lactação; o grupo G+L 1-21 foi exposto ao fipronil do 1º ao 21º dias da gestação e lactação.

Para todos os grupos, em seguida ao nascimento dos filhotes foi feito a sexagem dos mesmos, selecionando oito filhotes machos de cada rata, para padronização do tamanho das ninhadas. Estes permaneceram com suas respectivas mães até o DPN21, ou seja, durante a amamentação. Após isso, um filhote macho, de cada mãe foi utilizado, totalizando 15 animais para cada grupo experimental propriamente dito.

2.3 Avaliação de comportamento

Todos os testes comportamentais foram realizados em filhotes na idade jovem (25-30 dias de idade) e adultos (75-80 dias de idade) de todos os grupos.

Coordenação motora e atividade de exploração:

Foram avaliadas utilizando o Hole-board (HB) descrito por Meyer e Caston (2005) o qual consiste de uma caixa quadrada de madeira impermeabilizada, sendo o assoalho pintado de branco e contendo orifícios de mesmo tamanho, distribuídos simetricamente em toda a plataforma. Uma tampa de acrílico

recobre a caixa, para permitir filmagem do interior da caixa. Durante cinco minutos, para cada animal foram avaliados o número de vezes que uma pata escorregou e desapareceu num orifício (paw-dip) e o número de vezes que o animal colocou a cabeça para explorar um orifício (head-dip). O teste foi filmado e observado posteriormente. Ao final de cada sessão com cada animal, o aparelho foi higienizado com algodão embebido em álcool etílico (5%) para eliminar os vestígios do animal antecessor.

Atividade Locomotora:

Foi avaliada segundo metodologia descrita em Trombini et al. (2001) por meio de observação em arena de campo aberto (ACA), durante 3 minutos. O teste foi filmado para avaliação posterior. Ao final de cada sessão com cada animal o aparelho foi higienizado com algodão embebido em álcool etílico (5%) para eliminar os vestígios do animal antecessor.

2.4 Dosagem do fipronil

A dosagem dos níveis de fipronil e seus principais metabólitos, sulfona e dessulfinil, no cérebro foi realizada por cromatografia de alta eficiência (HPLC Shimadzy, modelo Prominence – Espectrômetro de Massas do tipo Triploquadrupolo, MS/MS AB Sciex, modelo 4500) para confirmar a exposição da prole e sua relação com possíveis efeitos tóxicos. Foram utilizados padrões Sigma-Aldrich de referência, a partir de metodologia preconizada por Xavier et al. (2014). O limite de detecção em ppb do aparelho para o fipronil, fipronil sulfona e fipronil dessulfinil é 0,051, 0,013 e 0,050, respectivamente.

2.5 Análise estatística dos resultados

Os dados coletados foram analisados estatisticamente utilizando-se análise de variância (One-Way ANOVA) através de software Instat 3.0 (*Graph Pad Software*). O teste de Tukey-Kramer Multiple Comparisons foi utilizado para identificar diferenças entre os grupos. A comparação entre os grupos foi considerada significativamente diferente quando $p < 0,05$.

3. Resultados

Durante todo o experimento, não houve alterações nas gestantes que pudessem indicar sinais de intoxicação pelo fipronil.

Na Figura 1 observa-se que na avaliação do comportamento de coordenação motora no Hole-board, a prole jovem, do grupo lactação, apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle, no número de enfiada de patas. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) da coordenação motora entre os grupos, para a prole adulta (Figura 2).

A avaliação do comportamento de exploração, no Hole-board, mostrou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos, para os ratos jovens ou adultos.

A avaliação do comportamento de locomoção, na Arena de Campo Aberto, mostrou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos, para os ratos jovens ou adultos.

O resultado da dosagem do fipronil e metabólitos no cérebro dos filhotes está mostrado na Tabela 1. Observa-se que houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da quantidade do fipronil e do fipronil sulfona no cérebro da prole jovem, em relação ao controle, que é relacionado ao período de exposição e que confirma a exposição da prole por exposição perinatal parental. Na prole adulta não foi detectada a presença de fipronil e seu metabólito. O metabólito dessulfinil não foi detectado no cérebro da prole jovem e adulta.

4. Discussão

Num experimento de exposição perinatal a agentes químicos, um dos óbvios sinais de toxicidade materna é a perda de peso (Chernoff et al., 2008), além de alterações na homeostase materna, o que poderia interferir indiretamente com o desenvolvimento dos filhotes (Smart e Dobbing, 1971; Salvatori et al., 2004). A não ocorrência de sinais de toxicidade materna no presente experimento nos leva a supor que, qualquer alteração ocorrendo com os filhotes foi, portanto exclusivamente devido à exposição ao fipronil.

Os resultados obtidos neste estudo confirmam que a exposição ao fipronil no período perinatal, promove danos à atividade dos nervos motores nos filhotes, sem modificar sua atividade exploratória ou a locomoção.

Segundo dados prévios da literatura, a exposição da fêmea a praguicidas durante os períodos de gestação e lactação pode causar alterações refletidas em aspectos físicos e comportamentais, de acordo com o período do desenvolvimento animal (Kimmel, 1998; Chelonis et al., 2004; Costa et al., 2004).

Na avaliação da coordenação motora, os ratos jovens, do grupo lactação, apresentaram aumento significativo no número de enfiadas de patas. Não houve diferença significativa entre os grupos quando os ratos adultos foram avaliados. Este resultado é semelhante aos obtidos por Terçariol e Godinho (2011), os quais estudando a atividade neurocomportamental de ratos adultos expostos ao fipronil (0, 70, 140 e 280 mg/kg, por via dermal), observaram que ratos recebendo a dose de 70 mg/Kg, não apresentaram alterações de coordenação motora enquanto que com a dose de 140 e 280 mg/k, houve diminuição da coordenação motora dos animais, sugerindo um efeito dose dependente do fipronil sobre o comando neural dos nervos motores.

Em acordo com o observado anteriormente, pesquisa realizada por Stehr et al., (2006), demonstraram que o fipronil também causou defeitos motores em embriões de peixes e larvas, ampliando com seus resultados a faixa de organismos susceptíveis aos efeitos motores do fipronil .

Godinho et al. (2014) estudando a coordenação motora de animais adultos expostos ao piretróide permetrina, também um antagonista de GABA à semelhança do fipronil, observaram incoordenação motora pelo efeito do praguicida, efeito este atribuído à ação do piretróide sobre os canais que controlam o movimento celular de cálcio. Mecanismo este bem distinto da ação antagônica gabaérgica (Alviña e Khodakhah, 2008). Nas ações prejudiciais ao sistema motor observadas aqui pelo fipronil poderia ser estudado a importância deste mecanismo como parte da toxicidade deste praguicida sobre o SNC.

De acordo com Adzu et al. (2002) a redução ou o aumento da enfiadas de cabeça no aparelho HB estão relacionados com a atividade geral do SNC, sendo que a diminuição se relaciona à depressão e o aumento se relaciona à estimulação do SNC. Nos presentes experimentos, foi observado que os

filhotes tanto jovens quanto adultos, expostos perinatalmente ao fipronil, não tiveram alterações do comportamento de exploração no aparelho HB, sugerindo que não houve depressão nem estimulação geral do SNC pelo fipronil. Porém, não se exclui, somente por isso, que alguma área do cérebro ou algum mecanismo neuronal específico estejam sendo particularmente afetados pela ação do agente químico nos filhotes expostos através das suas mães.

Uma função principal do cerebelo é coordenar o movimento e manter a postura do corpo e o balanço corporal (Ito, 1984). O cerebelo consiste em duas estruturas anatômica distintas: o córtex e os núcleos profundos. Os circuitos cerebelares do córtex recebem e integram uma quantidade grande de informação sensorial e cortical enquanto que os neurônios dos núcleos cerebelares profundos (NCP) codificam os sinais cerebelares requeridos para a coordenação do movimento (Raman et al., 2000). Alterações da atividade intrínseca dos neurônios dos NCP afetam adversamente a função cerebelar causando ataxia (Shakkottai et al. 2004). Como uma explicação seria a de que a falta de coordenação motora provocada pelo fipronil nos animais esteja relacionada à uma ação tóxica do agente químico sobre a função cerebelar, futuros experimentos devem ser realizados para evidenciar esta hipótese.

Em relação ao comportamento de locomoção na ACA, no presente estudo não houve diferença significativa entre os grupos de filhotes, tanto jovens quanto adultos. Este resultado está em acordo com observações de Terçariol e Godinho (2011), que também não observaram alteração do comportamento de locomoção de animais expostos ao fipronil. O resultado da coordenação testado no HB poderia ser influenciado pela atividade locomotora dos animais (Meyer e Caston, 2005), porém, o fato de na ACA não ter sido observado alteração na atividade de locomoção, reforça a influência tóxica do fipronil sobre os nervos motores.

Por fim, como o efeito de incoordenação motora foi observado apenas nos ratos jovens e não nos adultos e a presença do fipronil e seu metabólito ativo sulfona foi detectada apenas na prole jovem, isto nos leva a sugerir que o dano motor provocado pelo fipronil nos animais foi dependente da presença do agente químico nas estruturas cerebrais. Uma sugestão para confirmar esta hipótese seria a de realizar a dosagem do agente e metabólito ativo em estruturas

possivelmente implicadas no efeito motor aqui observado, principalmente o cerebelo.

Conclui-se que a exposição perinatal de ratos ao fipronil causou diminuição da coordenação motora na prole na idade jovem, sugerindo toxicidade sobre os nervos motores. O efeito de incoordenação motora parece ser dependente da presença do agente tóxico e seu metabólito ativo sulfona e pode ocorrer por algum efeito específico em alguma área cerebral que controla os movimentos motores, como, por exemplo, a área cerebelar.

REFERÊNCIAS

- Adzu, S.; Amos, S.; Dzarma, C.W.; Gamaniel, K., 2002. Effect of *Zizypus spinchristi* wild aqueous extract on the central nervous system in mice. *J. Ethnopharmacol.* 79, 13–16.
- Alviña, K.; Khodakhah, K., 2008. Selective regulation of spontaneous activity of neurons of the deep cerebellar nuclei by N-type calcium channels in juvenile rats. *J. Physiol.* 586, 2523-2538.
- Andersen, H.R.; Debes, F.; Wohlfahrt-Veje, C.; Murata, K.; Grandjean, P., 2015. Occupational pesticide exposure in early pregnancy associated with sex-specific neurobehavioral deficits in the children at school age. *Neurotoxicology and Teratology.* 47, 1-9.
- Bouchard, M.F.; Chevrier, J.; Harley, K.G.; Kogut, K.; Vedar, M.; Calderon, N.; Trujillo, C.; Johnson, C.; Bradman, A.; Barr, D.B.; Eskenazi, B., 2011. Prenatal exposure to organophosphate pesticides and IQ in 7-year-old children. *Environ Health Perspect.* 119, 1189-1195.
- Chelonis, J.; Flake, R.; Baldwin, R.; Blake, B.; Paule, M., 2004. Developmental Aspects of Timing Behavior in Children. *Neurotoxicology and Teratology.* 26, 461–476.
- Chernoff, N.; Rogers, E.H.; Gage, M.I.; Francis, B.M. The relationship of maternal and fetal toxicity in developmental toxicology bioassays with notes on the biological significance of the “no observed adverse effect level”. *Repr. Toxicol.* v.25, p.192–202, 2008.
- Cole, L.M.; Nicholson, R.A.; Casida, J.E., 1993. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-Gated chloride channel. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 46, 47-54.
- Costa, L.; Ascher, M.; Vitalone, A.; Syversen, T.; Soldin, O., 2004. Developmental Neuropathology of Environmental Agents. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 44, 87-110.
- Dallaire, R.; Muckle, G.; Rouget, F.; Kadhel, P.; Bataille, H.; Guldner, L.; Seurin, S.; Chajès, V.; Monfort, C.; Boucher, O.; Thomé, J.P.; Jacobson, S.W.; Multigner, L.; Cordier, S., 2012. Cognitive, visual, and motor development of 7-month-old Guadeloupean infants exposed to chlordecone. *Environmental Research.* 118, 79-85.
- Das, P.C.; Cao, Y.; Cherrington, N.; Hodgson, E.; Rose, R.L., 2006. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chemico Biological Interactions.* 164, 200-214.
- Ecobichon, D.J., 2001. Toxic effects of pesticides, in: Klaassen, C.D. Casarett & Doull's Toxicology - The basic science of poisons, McGraw-Hill: New York, pp. 763–810.

- Forns, J.; Lertxundi, N.; Aranbarri, A.; Murcia, M.; Gascon, M.; Martinez, D.; Grellier, J.; Lertxundi, A.; Julvez, J.; Fano, E.; Goñi, F.; Grimalt, J.O.; Ballester, F.; Sunyer, J.; Ibarluzea, J., 2012. Prenatal exposure to organochlorine compounds and neuropsychological development up to two years of life. *Environmental International*. 45, 72-77.
- Franklin, C.A.; Worgan, J.P., 2005. Occupational and residential exposure assessment for pesticides. West Sussex, UK: John Wiley & Sons Ltda. 440p.
- Garcia, S.J.; Seidler, F.J.; Slotkin, T., 2003. Developmental neurotoxicity elicited by prenatal or postnatal chlorpyrifos exposure: effects on neurospecific proteins indicate changing vulnerabilities. *Environ. Health Perspect.* 111, 297-303.
- Gill, K.K.; Dumka, V.K., 2013. Biochemical alterations induced by oral subchronic exposure to fipronil, fluoride and their combination in buffalo calves. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 36, 1113-1119.
- Godinho, A.F.; Stanzani, S.L.; Ferreira, F.C.; Braga, T.C.; Silva, M.C.; Chaguri, J.L.; Dias-Júnior, J.L., 2014. Permethrin chronic exposure alters motor coordination in rats: effect of calcium supplementation and amlodipine. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 37, 878-884.
- González-Alzaga, B.; Lacasaña, M.; Aguilar-Garduño, C.; Rodríguez-Barranco, M.; Ballester, F.; Rebagliato, M.; Hernández, A.F., 2014. A systematic review of neurodevelopmental effects of prenatal and postnatal organophosphate pesticide exposure. *Toxicology Letters*. 230, 104-121.
- Hainzl, D.; Casida, J.E., 1996. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy Sciences, U.S.A.* 93, 12746-12767.
- Hainzl, D.; Cole, L.M.; Casida, J.E., 1998. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1529-1535.
- Ikeda, T.; Zhao, X.; Nagata, K.; Kono, Y.; Shono, T.; Yeh, J.Z.; Narahashi, T., 2001. Fipronil modulation of gamma-aminobutyric acid_A receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 296, 914-921.
- IPCS - International Programme on Chemical Safety., 2001. Environmental health criteria 223. Neurotoxicity risk assessment for human health: principles and approaches. Geneva: World Health Organization (WHO); ISBN 94 4 157223 X.
- Ito, M., 1984. The cerebellum and neural control. Raven Press, New York.
- Jennings, K.A.; Canerdy, T.D.; Keller, R.J.; Atieh, B.H.; Doss, R.B.; Gupta, R.C., 2002. Human exposure to fipronil from dogs treated with frontline. *Vet. Hum. Toxicol.* 44, 301-303.
- Jin, Y.; Liu, Z.; Peng, T.; Fu, Z., 2015. The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish: A survey on the endpoints at development, locomotor behavior, oxidative stress and immunotoxicity. *Fish & Shellfish Immunology*. 43, 405-414.
- Kamel, F.; Hoppin, J.A., 2004. Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. *Environmental Health Perspectives*. 112, 950-958.
- Kimmel, C., 1998. Current Approaches to Risk Assessment for Developmental Neurotoxicology. In Slikker, W.; Chang, L. *Handbook of Developmental Neurotoxicology*. San Diego: Academic Press., 675-685.
- Koopman-Esseboom, C.; Weisglas-Kuperus, N.; Ridder, M.A.; Paauw, C.G.V.; Tuinstra, L.G.; Sauer, P.J., 1996. Effects of polychlorinated biphenyl/dioxin exposure and feeding type on infants' mental and psychomotor development. *Pediatrics*. 97, 700-706.
- Maroni, M.; Colosio, C.; Ferioli, A.; Fait, A., 2000. Biological monitoring of pesticide exposure: a review. *Toxicology*. 143, 1-118.
- Matsuda, K.; Buckingham, S.D.; Kleier, D.; Rauh, J.J.; Grauso, M.; Sattelle, D.B., 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 573-580.

- Meyer, L.; Caston, J., 2005. Repeated stress affect caffeine action on motor coordination in C57B16/J male mice. *Brain Res.* 1039, 171-176.
- Ngim, K.K.; Crosby, D.G., 2001. Abiotic process influencing fipronil and desethiofipronil dissipation in California, USA, rice fields. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 972-977.
- PAHO - Pan American Health Organization., 2002. Epidemiological situation of acute pesticide poisoning in Central America, 1992-2000. *Epidemiological Bulletin.* 23, 5-9.
- Raman, I.M.; Gustafson, A.E.; Padgett., 2000. Ionic currents and spontaneous firing in neurons isolated from the cerebellar nuclei. *J. Neurosci.* 20, 9004-9016.
- Ratra, G.S.; Erkkila, B.E.; Weiss, D.S.; Casida, J.E., 2002. Unique insecticide specificity of human homomeric rho 1 GABA(C) receptor. *Toxicol. Lett.* 129, 47-53.
- Rodriguez, T.; Younglove, L.; LU, C.; Funez, A.; Weppner, S.; Barr, D.B.; Fenske, R.A., 2006. Biological monitoring of pesticide exposure among applicators and their children in Nicaragua. *Int. J. Occup. Environ. Health.* 12, 312-320.
- Rothlein, J.; Rohlman, D.; Lasarev, M.; Phillips, J.; Muniz, J.; McCauley, L., 2006. Organophosphate pesticide exposure and neurobehavioral performance in agricultural and non-agricultural Hispanic workers. *Environ. Health Perspect.* 114, 691-696.
- Salvatori, F.; Talasi, C.B.; Salzgeber, S.A.; Spinosa, H.S.; Bernardi, M.M. Embryotoxic and Long-term Effects of Cadmium Exposure During Embryogenesis in Rats. *Neurotoxicology and Teratology.* 2004, 26:673-680.
- Smart, J.L.; Dobbing, J. Vulnerability of developing brain: II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour on the rat. *Brain Res.* v.28, p.85-95, 1971.
- Scharf, M.E.; Siegfried, B.D., 1999. Toxicity and neurophysiological effects of fipronil and fipronil sulfone on the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology.* 40, 150-156.
- Shafer, T.J.; Meyer, D.A.; Crofton, K.M., 2005. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environmental Health Perspectives.* 113, 123-136.
- Shakkottai, V.G.; Chou, C.H.; Oddo, S.; Sailer, C.A.; Knaus, H.G.; Gutman G.A.; Barishi, M.E.; LaFerla, F.M.; Chandy, K.G., 2004. Enhanced neuronal excitability in the absence of neurodegeneration induces cerebellar ataxia. *J. Clin. Invest.* 113, 582-590.
- Stehr, C.M.; Linbo, T.L.; Incardona, J.P.; Scholz, N.L., 2006. The developmental neurotoxicity of fipronil: Notochord degeneration and locomotor defects in Zebrafish embryos and larvae. *Toxicological Sciences.* 92, 270-278.
- Tang, J.; Usmani, A.; Hodgson, E.; Rose, R.L., 2004. In vitro metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam. *Chemico-Biological Interactions.* 147, 319-329.
- Terçariol, P.R.; Godinho, A.F., 2011. Behavioral effects of acute exposure to the insecticide fipronil. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 99, 221-225.
- Tingle, C.C.D.; Rother, J.A.; Dewhurst, C.F.; Lauer, S.; King, W.J., 2003. Fipronil: Environmental Fate, Ecotoxicology, and Human Health Concerns. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* 176, 1-66.
- Trombini, T.V.; Pedroso, C.G.; Ponce, D. Almeida, A.A.; Godinho, A.F., 2001. Developmental lead exposure in rats: is a behavioral sequel extended at F2 generation? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 68, 743-751.
- Udo, M.S.B.; Sandini, T.M.; Reis, T.M.; Bernardi, M.M.; Spinosa, H.S., 2014. Prenatal exposure to a low fipronil dose disturbs maternal behavior and reflex development in rats. *Neurotoxicology and Teratology.* 1-7.
- Wilde, G.E.; Whitworth, R.J.; Claassen, M.; Shufan, R.A., 2001. Seed treatment for control of wheat insects and its effect on yield. *Journal of Agricultural and Urban Entomology.* 18, 1-11.

- Xavier, G.; Chandran, M.; George, T.; Beevi, S.N.; Mathew, T.B.; Paul, A.; Arimboor, R.; Vijayasree, V.; Pradeepkumar, G.T.; Rajith, R., 2014. Persistence and effect of processing on reduction of fipronil and its metabolites in chilli pepper (*Capsicum annum* L.) fruits. *Environ. Monit. Assess.* DOI 10.1007/s10661-014-3792-8.
- Zhao, X.; Yeh, J.Z.; Salgado, V.L.; Narahashi, T., 2005. Sulfone metabolite of fipronil blocks γ -aminobutyric acid and glutamate-activated chloride channels in mammalian and insect neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 314, 363-373.

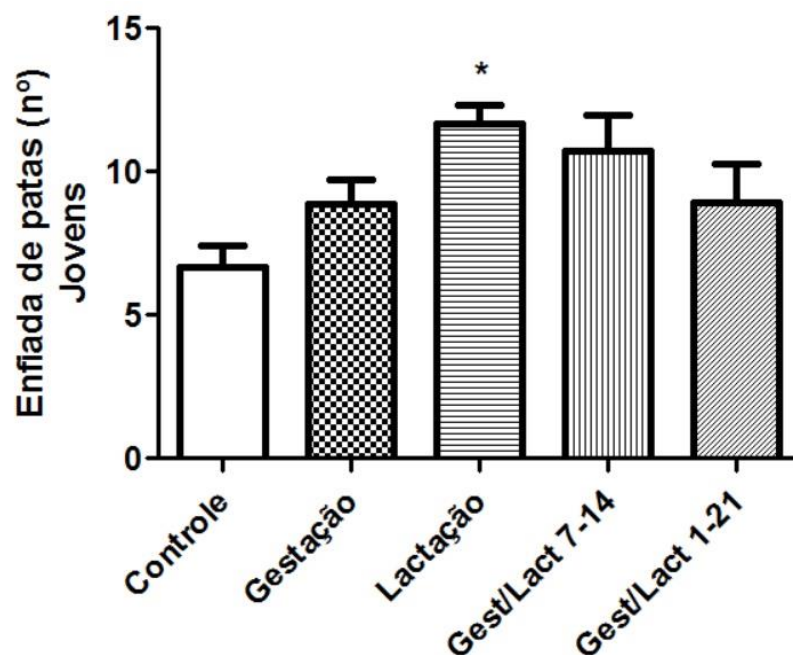


Figura 1. Número de enfiadas de patas, no comportamento de coordenação motora no aparelho Hole-board, pela prole jovem de ratas expostas ao fipronil no período perinatal.

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (n=15). * $p < 0,05$ em relação ao Controle.

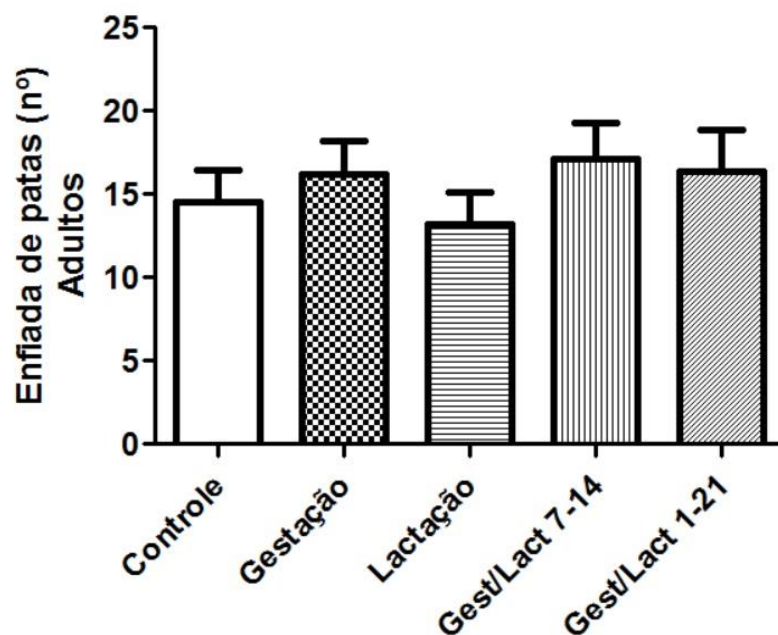


Figura 2. Número de enfiadas de patas, no comportamento de coordenação motora no aparelho Hole-board, pela prole adulta de ratas expostas ao fipronil no período perinatal.

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (n=15).

Tratamento	Ct	G	L	G+L 7-14	G+L 1-21
Fipronil	0,00	0,37±0,20*	0,73±1,46*	0,16±0,09*	3,01±0,27*
Fipronil Sulfona	0,00	355,1±15,82*	374,4±41,69*	633,4±107,35*	1.248,6±134,6*

Tabela 1. Dosagem do fipronil ($\mu\text{g/g}$ de tecido) e de seu metabólito fipronil sulfona, no cérebro de ratos jovens de ratas expostas ao praguicida no período perinatal.

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (n=7). * $p < 0,05$ em relação ao Controle. Ct – Controle; G – Gestação; L – Lactação; G+L 7-14 – Gest/Lact 7-14; G+L 1-21 – Gest/Lact 1-21.

CAPÍTULO 5.

Trabalho a ser enviado para a revista *Reproductive Toxicology*

Parâmetros do desenvolvimento de filhotes de ratas expostas ao praguicida fipronil no período perinatal

(Developmental parameters of rats offsprings exposed to fipronil pesticide in the perinatal period)

Francisco Pizzolato Montanha^{a*}, Romulo Francis Estangari Lot^b, Raquel Beneton Ferioli^c, Tatiany Luiza Silveira^d, Isamery Machado de Sarmiento^e, Caique Aparecido Faria^f, Faber Daniel Machado^g, Antonio Francisco Godinho^h, Noeme Sousa Rochaⁱ

^a Doutorando na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. chicopm28@yahoo.com.br. *autor para correspondência.

^b Docente na Universidade de Marília, Marília-SP, Brasil. romulovet@yahoo.com.br

^c Doutoranda na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. rbf.patologia@gmail.com

^d Doutoranda na Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, Brasil. taty.silveira@gmail.com

^e Doutoranda na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. isamerymachado@yahoo.com

^f Iniciação científica na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. caiquefaria32@hotmail.com

^g Iniciação científica na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. faber.machado@hotmail.com;

^h Docente na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. godinho@ibb.unesp.br

ⁱ Docente na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. rochanoeme@fmvz.unesp.br

RESUMO

Praguicidas são agentes químicos que atuam causando prejuízos em vários níveis dos organismos e por isto, atualmente, a exposição a estes agentes tem levantado várias questões sobre a saúde animal e a saúde humana. Este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade do fipronil utilizando parâmetros do desenvolvimento de filhotes de ratas expostas ao praguicida em diferentes fases do período perinatal. Para isto, ratas gestantes foram distribuídas em cinco grupos com 15 animais cada, respectivamente controle, gestação, lactação, gest/lact 7-14 e gest/lact 1-21. Na prole jovem (25-30 dias) e adulta (75-80 dias) foram avaliados parâmetros relacionados ao desenvolvimento físico e sensorio-motor; relação peso órgão/animal; comportamento geral em arena de campo aberto (ACA), e parâmetros bioquímicos e histológicos. Foi observado diminuição do tempo para erupção dos dentes incisivos e aumento do peso do fígado da prole jovem; aumento do cortisol sérico na prole jovem e alterações histológicas no fígado da prole jovem e adulta. Segundo os parâmetros de avaliação utilizados os resultados confirmam a toxicidade do fipronil a filhotes de ratas expostas no período perinatal.

Palavras-chave: Arena de Campo Aberto, Desenvolvimento físico, Desenvolvimento sensorio-motor, Relação peso órgão/animal.

ABSTRACT

Pesticides are chemicals that act causing damage at various levels of organisms and therefore currently the exposure to these agents raised several questions on the animal and human health. This study aimed to evaluate the toxicity of fipronil using parameters of the development of young and adult rats exposed to pesticide at different stages of the perinatal period. For this, pregnant rats were distributed into five groups of 15 animals each, respectively control, gestation, lactation, gest/lact 7-14 and gest/lact 1-21. In young (25-30 days) and adults (75-80 days) offsprings were evaluated parameters related to physical and sensory-motor; weight ratio organ/animal of organs; general behavior in the open field arena (ACA), and biochemical and histological parameters. Were observed decreased time for eruption of the incisors and increased for the weight of liver of young offspring; increased seric cortisol in young offspring and histological changes in the liver of young and adult offspring. According to the parameters used the results confirm the toxicity of fipronil on offsprings of female rats exposed in the perinatal period.

Keywords: Open Field test, Physical development, Sensory-motor development, Weight ratio organ/animal.

1. Introdução

Dados epidemiológicos, relatos clínicos e estudos de laboratório têm evidenciado que o uso generalizado de compostos praguicidas em agricultura, pecuária e no ambiente doméstico tem levantado muitas questões acerca da segurança do uso destes compostos por humanos, quando se trata principalmente das exposições ocupacionais, e daquela provocada pelos *hobbies*, como jardinagem, por exemplo, já que tem aumentado muito nos últimos anos a utilização doméstica destes agentes químicos [1-4].

Relatos científicos descritos na literatura tem engrandecido o elevado potencial de toxicidade dos praguicidas para animais e humanos. Adicionalmente, a associação do uso indiscriminado destas substâncias com alterações do neurodesenvolvimento em crianças, tem chamado a atenção para os vários problemas decorrentes da sua utilização e as exposições que ocorrem no período perinatal [5-8].

Efeitos sutis provocados *in útero* podem se traduzir em vários tipos de alterações que podem se expressar durante o desenvolvimento pós-natal do indivíduo, com prejuízos transitórios e/ou permanentes à saúde dos animais jovens em desenvolvimento. Por mais que a placenta forneça proteção ao feto, produtos químicos industriais como praguicidas, podem atravessá-la e concentrar-se no sistema nervoso fetal. Alguns destes produtos químicos são lipofílicos e, por conseguinte, tendem a ser mantidos em órgãos com elevada concentração de lipídios, tais como o encéfalo [9]. Sabe-se há muito tempo que a exposição a agentes tóxicos durante poucas horas após a fertilização pode produzir malformação fetal [10].

Fipronil (5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]- 4-[(trifluoromethyl) sulfinyl] -1H-pyrazole -3-carbonitrile) é um praguicida, derivado quimicamente da família do fenilpirazol ou fiproles que tem como alvo o receptor do ácido gama amino butírico (GABA) [11]. Possui amplo espectro de ação [12], é extremamente ativo [13] e altamente eficaz [12,14].

É usado na agricultura contra uma grande variedade de pragas que infestam alimentos [11,15-16]. Também é usado em outras aplicações que incluem o controle das pragas veterinárias [17]. Além disso, o fipronil foi designado pela agência de proteção ambiental (EPA) como alternativa ao uso

de organofosforados para o controle de cupins e formigas, porém, várias questões sobre efeitos adversos do fipronil na saúde pública foram levantadas por ser largamente comercializado e utilizado inclusive a nível doméstico [17-18].

Apesar de sua propaganda seletividade contra insetos [19-21] o fipronil também se liga a receptores de mamíferos [20,22-24]. O principal metabólito sulfona, bem como seu produto de fotodegradação dessulfínil foram relatados serem mais tóxicos a insetos, mamíferos, peixes e pássaros, do que o composto original [25].

Como os praguicidas conhecidos e utilizados tem geralmente efeitos tóxicos sobre as funções neurológicas, a função neurocomportamental tem sido a mais extensamente estudada, porém, vários outros parâmetros toxicológicos como alterações físicas, bioquímicas e morfológicas, por exemplo, também são utilizadas como marcadores da toxicidade de agentes químicos [26].

Apesar da neurotoxicidade dos fenilpirazóis ser bem caracterizada e seu mecanismo de ação em mamíferos ser conhecido, seu potencial para provocar efeitos no organismo em desenvolvimento, ainda é desconhecido [37].

A importância de maiores estudos comprovando a toxicidade de praguicidas modernos, como o fipronil, sobre os vários aspectos do desenvolvimento *in útero* e pós-natal, bem como sobre processos sensoriais, motores e integrativos que ocorrem no desenvolvimento do sistema nervoso, reside no fato de que o elo final da cadeia trófica, o ser humano, deve estar sempre protegido [27].

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar em filhotes de ratas expostas ao fipronil durante o período perinatal, parâmetros que pudessem confirmar a toxicidade deste agente sobre o organismo dos animais em desenvolvimento.

2. Material e métodos

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FMVZ-UNESP (protocolo número 59/2012).

2.1 Animais

Para o experimento, foram utilizados ratos Wistar (fêmeas e machos), adquiridos da colônia do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu, que foram retirados do Biotério Central logo após o desmame, com 22 dias, e alocados no biotério do Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX), sob condições controladas de temperatura ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa (55 ± 5), ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, exaustão contínua, recebendo água e ração sem restrição, até atingirem a idade de 80 dias, necessária para acasalamento. A cada três dias, durante todo o experimento, as gaiolas de polipropileno foram higienizadas, fazendo troca da forragem de maravalha e a lavagem das caixas.

2.2 Procedimento experimental

Para o acasalamento, numa mesma gaiola, foram colocados três fêmeas e um macho por um período total de 5 dias, sendo que a cada 24 horas, foi realizado um lavado vaginal para detecção de espermatozoides. Fêmeas com presença do espermatozoide no canal vaginal foram consideradas prenhes e separadas em caixas isoladas, sendo este considerado o dia zero do período gestacional. As gestantes foram separadas aleatoriamente em 5 grupos de 15 animais, denominados respectivamente: controle (Ct), gestação (G), lactação (L), gest/lact 7-14 (G+L 7-14) e gest/lact 1-21 (G+L 1-21). A cada três dias, as ratas prenhes de cada grupo foram pesadas.

O fipronil foi utilizado na dose de 1mg/Kg/dia, por via dermal (tópica), na região dorsal do pescoço próxima à cabeça, após tricotomia da região. O produto utilizado foi o Topline[®] (fipronil a 1% - Merial do Brasil), produto comercial. Os animais controle receberam 0,2 mL de óleo de milho durante os períodos de gestação e lactação do 7º ao 14º dias; os grupos G, L e G+L 7-14 foram expostos ao fipronil do 7º ao 14º dias da gestação e/ou lactação; o grupo G+L 1-21 foi exposto ao fipronil do 1º ao 21º dias da gestação e lactação.

Imediatamente após o nascimento dos filhotes foi feita a sexagem selecionando-se oito filhotes do sexo masculino, de cada rata, para padronização do tamanho das ninhadas de todos os grupos. Os filhotes foram mantidos juntamente com suas respectivas mães até a idade de 21 dias (DPN21), quando foi feito o desmame. Para a formação dos grupos dos animais

utilizados para o experimento propriamente dito, um filhote macho, de cada mãe/ninhada foi utilizado, totalizando 15 animais para cada grupo experimental.

2.3 Desenvolvimento físico e sensório-motor

Após o nascimento e durante o período da lactação, foram realizados nos filhotes: avaliação física (ganho de peso, aparecimento de pêlos, abertura dos olhos, erupção dos incisivos, descolamento de orelhas, descida dos testículos); e avaliação sensório-motora (reflexos de preensão palmar, endireitamento ou postural e geotaxia negativa).

2.4 Comportamento

Para o comportamento utilizou-se o teste da arena de campo aberto (ACA), segundo metodologia descrita em Trombini et al. (2001), para avaliar a atividade geral dos filhotes na idade jovem (25-30 dias - DPN25-30) e adulta (75-80 dias - DPN75-80). O aparelho consiste em uma arena circular de madeira impermeabilizada dividida em três círculos concêntricos, os quais são subdivididos em 18 espaços similares, separados por linhas pintadas de preto no assoalho do aparelho, sobre um fundo branco. Para o teste o animal foi colocado no centro da arena e foram avaliados durante 3 minutos, os seguintes parâmetros: locomoção, levantar (apoiar-se sobre as patas traseiras com as dianteiras levantadas, apoiadas ou não na parede lateral), congelamento (tempo total de imobilidade sobre as quatro patas, sempre com os olhos abertos e dilatados e respiração irregular, após ter permanecido imóvel por pelo menos um segundo) e limpeza (lamber ou limpar as patas, corpo, genital, focinho ou cabeça, agitar a cabeça). Após o teste o animal era retirado da ACA e feita a limpeza com algodão embebido em álcool etílico a 5% para disfarçar o cheiro do animal precedente.

Após o teste comportamental, os animais tanto jovens quanto adultos, foram pesados, anestesiados (xilazina – 10mg/Kg, mais cetamina – 80mg/Kg, IP) para coleta de sangue por punção cardíaca direta e eutanasiados com excesso de anestésico para coleta de tecidos (cérebro, fígado, rins, baço e testículos).

2.5 Relação peso órgão/animal

Os órgãos coletados da prole adulta, como cérebro, fígado, rins, baço e testículos foram pesados e seus pesos a fresco relacionados com o peso do animal através do cálculo de relação peso órgão/peso animal, onde o peso do órgão foi multiplicado por 100 e dividido pelo peso do animal.

2.6 Análises bioquímicas

O sangue foi centrifugado a 2.500 rpm durante 5 minutos e o soro foi utilizado para dosagem de enzimas alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST) e cortisol, utilizando espectrofotômetro (Ultrospec 2000–Pharmacia Biotech) e kits comerciais (Biotécnica-Brasil).

2.7 Avaliação histopatológica

Para posterior avaliação histopatológica, o fígado coletado foi fixado em solução de formalina tamponada a 10% por 3 dias e em seguida processado em histotécnica para confecção dos blocos de parafina. Destes foram obtidos cortes de 4µm de espessura consecutivamente e montados em lâminas de vidro histológicas para esta finalidade. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e avaliadas ao microscópio.

2.8 Análise estatística dos resultados

Os dados coletados foram analisados estatisticamente utilizando-se análise de variância (One-Way ANOVA) através de software Instat 3.0 (*Graph Pad Software*). O teste de Tukey-Kramer Multiple Comparisons foi utilizado para identificar diferenças entre os grupos. A comparação entre os grupos foi considerada significativamente diferente quando $p < 0,05$.

3. Resultados

Mães:

Durante todo o experimento não foram observados nas fêmeas gestantes e lactantes qualquer alteração física ou clínica que pudessem indicar quadro de intoxicação pelo fipronil.

Filhotes:

Desenvolvimento físico e sensório-motor:

O ganho de peso dos filhotes variou significativamente ($p < 0,05$) entre os grupos analisados (Figura 1), porém não houve alteração no número total de filhotes nascidos por rata, assim como no número de natimortos ($p > 0,05$).

Não houve variação significativa ($p > 0,05$) no desenvolvimento físico dos filhotes relacionado aos parâmetros: descolamento das orelhas, abertura dos olhos, descida dos testículos e aparecimento de pêlos. Com relação ao tempo para erupção dos dentes incisivos, houve uma diminuição significativa nos grupos gestação ($p < 0,001$), lactação ($p < 0,01$), Gest/Lact 7-14 ($p < 0,001$) e Gest/Lact 1-21 ($p < 0,001$), em relação ao controle (Figura 2).

O desenvolvimento sensório-motor dos filhotes não mostrou variação significativa ($p > 0,05$) entre os grupos analisados nos parâmetros: aquisição do reflexo postural, perda do reflexo de preensão palmar e aquisição do reflexo de geotaxia negativa.

Comportamento:

No comportamento na ACA observou-se que não houve diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) entre os grupos analisados, nos parâmetros locomoção, levantamento, limpeza e congelamento.

Relação peso órgão/animal:

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na relação peso órgão/animal, nos animais adultos, entre os grupos analisados para cérebro, rins, baço e testículos. A relação do peso calculado para o fígado apresentou um aumento significativo ($p < 0,01$) no grupo gestação, em relação ao controle (Figura 3).

Avaliação bioquímica:

Na avaliação bioquímica na prole jovem e adulta, observou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos analisados nos seguintes parâmetros: ALT e AST.

A quantificação do cortisol sérico mostrou-se elevada de forma significativa ($p < 0,01$) nos filhotes da Gest/Lact 7-14 e de forma não significativa

nos da lactação (Figura 4). Na prole adulta não houve alteração no nível do cortisol sérico.

Avaliação histopatológica:

Na avaliação histopatológica do fígado foram observadas alterações dos tipos congestão vascular, degeneração hidrópica e infiltrado linfocítico nos ratos jovens (Tabela 1A); nos adultos, congestão vascular, degeneração gordurosa, degeneração hidrópica e infiltrado linfocítico (Tabela 1B, Figuras 5-8).

4. Discussão

Num experimento de exposição perinatal a agentes químicos, um dos óbvios sinais de toxicidade materna é a perda de peso [29], além de alterações na homeostase materna, o que poderia interferir indiretamente com o desenvolvimento dos filhotes [30-31]. A não ocorrência de sinais de toxicidade materna no presente experimento nos leva a supor que, qualquer alteração ocorrendo com os filhotes foi, portanto exclusivamente devido à exposição ao fipronil.

De acordo com Jackson et al. [32], ratos recebendo administração única de fipronil, por gavagem, nas doses 0, 2,5; 7,5 e 25 mg/Kg tiveram diminuição do ganho de peso 7 dias após a administração da dose única de 7,5 mg/Kg. Gill e Dumka [12], ao exporem bezerros de búfalos ao fipronil, na dose de 0,5 mg/Kg/dia, por via oral, durante 98 dias, observaram que o fipronil induziu uma diminuição do ganho de peso corporal nos animais, além de outros sinais clínicos de intoxicação.

Contrariamente a estes dados, neste estudo durante o período de desenvolvimento inicial dos filhotes, foi observado ganho de peso aumentado no 14º e 21º dias de vida, nos grupos lactação e gestação mais lactação 1-21 e diminuição do tempo para o aparecimento dos incisivos, em todos os grupos de exposição ao fipronil. Efeitos pós-natais mediados por agentes químicos encontrados no leite materno podem provocar desenvolvimento físico alterado nos filhotes [31]. É provável que a carga corpórea do praguicida nos filhotes, recebida cineticamente através das mães, possa provocar alterações sobre a homeostasia e maturação do organismo dos mesmos.

Adicionalmente, efeitos do praguicida sobre o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e sobre glicocorticoides, poderiam provocar alterações durante o desenvolvimento do filhote [31,33]. Corroborando com esta hipótese, existe o fato de que a concentração do cortisol sérico na prole jovem foi aumentada, o que poderia sugerir a possibilidade de um efeito desregulador endócrino. A questão da desregulação endócrina por agentes praguicidas que contaminam o meio ambiente vem sendo discutida nos últimos anos, sendo muitos deles classificados positivamente neste sentido [34], inclusive o fipronil [35].

Neste estudo a avaliação de comportamento dos filhotes na ACA, um teste comportamental comumente utilizado para triagem farmacológica de drogas que atuam sobre o sistema nervoso central [36], não demonstrou alteração pelo fipronil. Estes resultados são diferentes daqueles observados por Terçariol e Godinho [37] os quais demonstraram que fipronil, em dose mais elevadas, pode interferir na emocionalidade, medo e atividade exploratória dos animais na ACA. As diferenças podem ser por causa dos níveis de dose elevados utilizados por estes autores e o diferente perfil experimental, já que expuseram ratos adultos agudamente.

A capacidade de produtos químicos induzirem enzimas metabólicas, incluindo o citocromo p450 (CYP), tem sido considerada uma das respostas bioquímica celulares mais sensíveis à agressão tóxica, uma vez que muitas ocorrem em doses muito menores do produto químico do que aquelas conhecidas por causar efeitos tóxicos evidentes e letalidade [38]. A relação peso órgão/animal calculada para o fígado dos filhotes do grupo gestação foi aumentada pelo fipronil sugerindo um efeito indutor enzimático hepático. Este resultado corrobora com dados prévios apresentados por Tang et al. [13] e Das et al. [25], sugerindo que fipronil aumenta a atividade das enzimas microsomais hepáticas.

As enzimas ALT e AST são comumente utilizadas no diagnóstico de doenças hepáticas em roedores, porém, não há muita informação disponível referente à toxicidade de fipronil nas respostas bioquímicas [39]. No presente estudo, a quantificação das enzimas marcadoras de lesão hepática, ALT e AST, mostrou níveis normais das mesmas nos filhotes expostos ao fipronil. Gupta et al. [39], ao exporem carpas (*Cyprinus carpio*) ao fipronil, em diferentes concentrações (0,01; 0,1; 1,0 e 10,0 mg/L), observaram que, as atividades de

AST, tanto em fígado e músculo foram significativamente maiores nos peixes expostos ao fipronil, em relação ao controle. No entanto, não encontraram mudanças significativas no nível de ALT no tecido hepático. A diferença observada pode ser por causa das diferenças nos modelos experimentais utilizados.

Os ratos, expostos ao fipronil, apresentaram, na avaliação histopatológica do fígado, congestão vascular mais intensa do que a encontrada nos ratos controle. A degeneração hidrópica foi identificada em todos os grupos de animais. Outras alterações histopatológicas no fígado foram diagnosticadas nos grupos expostos ao fipronil, como infiltrado linfocítico e degeneração gordurosa. Quando os animais do grupo controle apresentaram essas alterações, houve uma tendência destas serem menos intensas, o que sugere que a exposição ao fipronil, pode ter agravado alterações já existentes.

A degeneração hidrópica é a expressão mais comum e fundamental de lesão celular. Manifesta-se como aumento do tamanho e do volume celular a partir de uma sobrecarga de água, causada pela falência da célula e falta de manutenção da homeostasia normal em regular a entrada e saída de água. É acompanhada pela modificação e degeneração das organelas [40]. Como uma das prováveis organelas atingidas pelo fipronil no fígado pode ser o retículo endoplasmático liso, experimentos futuros necessitam ser realizados para confirmar essa sugestão.

Conclui-se que a exposição perinatal de ratos ao fipronil interferiu em parâmetros do desenvolvimento físico e hormonal dos filhotes, mas não modificou comportamentos relacionados ao medo e emocionalidade dos mesmos. Apesar da normalidade das enzimas marcadoras de lesão hepática, a avaliação histológica do fígado aponta efeitos teciduais negativos pela exposição ao fipronil, que poderiam interferir na homeostasia deste órgão e modificar sua capacidade de metabolização hepática. Todos juntos, estes parâmetros confirmam a toxicidade da exposição perinatal ao fipronil.

Referências

- [1] Maroni M, Colosio C, Ferioli A, Fait A. Biological monitoring of pesticide exposure: a review. *Toxicology*. v.143, n.1, p.1-118, 2000.
- [2] Franklin CA, Worgan JP. *Occupational and residential exposure assessment for pesticides*. West Sussex, UK: John Wiley & Sons Ltda. 440p. 2005.
- [3] Rodriguez T, Younglove L, Lu C, Funez A, Weppner S, Barr DB, Fenske RA. Biological monitoring of pesticide exposure among applicators and their children in Nicaragua. *Int. J. Occup. Environ. Health*. v.12, n.4, p.312-320. 2006.
- [4] Rothlein J, Rohlman D, Lasarev M, Phillips J, Muniz J, McCauley L. Organophosphate pesticide exposure and neurobehavioral performance in agricultural and non-agricultural Hispanic workers. *Environ. Health Perspect.* v.114, n.5, p.691-696, 2006.
- [5] Garcia SJ, Seidler FJ, Slotkin T. Developmental neurotoxicity elicited by prenatal or postnatal chlorpyrifos exposure: effects on neurospecific proteins indicate changing vulnerabilities. *Environ. Health Perspect.* v.111, n.3, p.297-303, 2003.
- [6] Shafer TJ, Meyer DA, Crofton KM. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environmental Health Perspectives*. v.113, n.2, p. 123-136, 2005.
- [7] Bouchard MF, Chevrier J, Harley KG, Kogut K, Vedar M, Calderon N, Trujillo C, Johnson C, Bradman A, Barr DB, Eskenazi B. Prenatal exposure to organophosphate pesticides and IQ in 7-year-old children. *Environ Health Perspect.* v.119, n.8, p.1189-1195, 2011.
- [8] Gonzáles-Alzaga B, Lacasaña M, Aguilar-Garduño C, Rodríguez-Barranco M, Ballester F, Rebagliato M, Hernández AF. A systematic review of neurodevelopmental effects of prenatal and postnatal organophosphate pesticide exposure. *Toxicology Letters*. v.230, p.104-121, 2014.
- [9] Julvez J, Grandjean P. Neurodevelopmental Toxicity Risks Due to Occupational Exposure to Industrial Chemicals during Pregnancy. *Industrial Health*. v. 47, p. 459-468, 2009.
- [10] Górnaiak SL, Spinosa HS, Bernardi MM. Toxicologia do Desenvolvimento. In: Spinosa HS, Górnaiak SL, Palermo-Neto J. In: *Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária*. São Paulo: Manole, 2008. 942p.
- [11] Wilde GE, Whitworth RJ, Claassen M, Shufran RA. Seed treatment for control of wheat insects and its effect on yield. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*. v.18, p.1-11, 2001.
- [12] Gill KK, Dumka VK. Biochemical alterations induced by oral subchronic exposure to fipronil, fluoride and their combination in buffalo calves. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v. 36, p. 1113-1119, 2013.
- [13] Tang J, Usmani A, Hodgson E, Rose RL. *In vitro* metabolismo of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam. *Chemico-Biological Interactions*. v. 147, p. 319-329, 2004.
- [14] Zhao X, Yeh JZ, Salgado VL, Narahashi T. Sulfone metabolite of fipronil blocks γ -aminobutyric acid and glutamate-activated chloride channels in mammalian and insect neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v.314, n.1, p.363-373, 2005.
- [15] Scharf ME, Siegfried BD. Toxicity and neurophysiological effects of fipronil and fipronil sulfone on the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. v.40, p.150-156, 1999.
- [16] Ngim KK, Crosby DG. Abiotic process influencing fipronil and desthiofipronil dissipation in California, USA, rice fields. *Environ. Toxicol. Chem.* v.20, p. 972-977, 2001.
- [17] Jennings KA, Canerdy TD, Keller RJ, Atieh BH, Doss RB, Gupta RC. Human exposure to fipronil from dogs treated with frontline. *Vet. Hum. Toxicol.* v.44, n.5, p.301-303, 2002.

- [18] Tingle CCD, Rother JA, Dewhurst CF, Lauer S, King WJ. Fipronil: Environmental Fate, Ecotoxicology, and Human Health Concerns. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. v.176, p.1-66, 2003.
- [19] Cole LM, Nicholson RA, Casida JE. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-Gated chloride channel. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. v.46, n.1, p.47-54, 1993.
- [20] Hainzl, D; Casida, J.E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy Sciences, U.S.A.* v.93, p.12746–12767, 1996.
- [21] Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* v.22, p.573–580, 2001.
- [22] Hainzl D, Cole LM, Casida JE. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chem. Res. Toxicol.* v.11, n.12, p.1529-1535, 1998.
- [23] Ikeda T, Zhao X, Nagata K, Kono Y, Shono T, Yeh JZ, Narahashi T. Fipronil modulation of gamma-aminobutyric acid_A receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v.296, n.3, p.914-921, 2001.
- [24] Ratra GS, Erkkila BE, Weiss DS, Casida JE. Unique insecticide specificity of human homomeric rho 1 GABA(C) receptor. *Toxicol. Lett.* v.129, p.47-53, 2002.
- [25] Das PC, Cao Y, Cherrington N, Hodgson E, Rose RL. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chemico Biological Interactions*. v. 164, p. 200-214, 2006.
- [26] Ecobichon DJ. Toxic effects of pesticides, in: Klaassen CD. *Casarett & Doull's Toxicology - The basic science of poisons*, McGraw-Hill: New York, p. 763–810, 2001.
- [27] Barone S, Das KP, Lassiter TL, White LD. Vulnerable processes of nervous system development: a review of markers and methods. *Neurotoxicology*. v.21, p.15-36, 2001.
- [28] Trombini TV, Pedroso CG, Ponce D, Almeida AA, Godinho AF. Developmental lead exposure in rats: is a behavioral sequel extended at F2 generation? *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.68, p.743-751, 2001.
- [29] Chernoff N, Rogers EH, Gage MI, Francis BM. The relationship of maternal and fetal toxicity in developmental toxicology bioassays with notes on the biological significance of the “no observed adverse effect level”. *Repr. Toxicol.* v.25, p.192–202, 2008.
- [30] Smart JL, Dobbing J. Vulnerability of developing brain: II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour on the rat. *Brain Res.* v.28, p.85-95, 1971.
- [31] Salvatori F, Talasi CB, Salzgeber SA, Spinosa HS, Bernardi MM. Embryotoxic and Long-term Effects of Cadmium Exposure During Embryogenesis in Rats. *Neurotoxicology and Teratology*. 2004, 26:673-680.
- [32] Jackson D, Cornell CB, Luukinen B, Buhl K, Stone D. 2009. *Fipronil Technical Fact Sheet*; National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. <http://npic.orst.edu/factsheets/fiptech.pdf>.
- [33] Seckl JR, Holmes MC. Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal programming of adult pathophysiology. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metabol.* v.3, p.479–488, 2007.
- [34] Bila DM, Dezotti M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Quim. Nova*. v.30, p. 651-666, 2007.
- [35] Ferreira M, Oliveira PR, Denardi SE, Bechara GH, Mathias MIC. Fipronil (active ingredient of acaricide frontline®) acting on the mice thyroid. *Microscopy Research and Technique*. v.75, p.265-270, 2012.

- [36] Eidman DS, Benedito MA, Leite JR. Daily changes in pentylenetetrazol-induced convulsions and open-field behavior in rats. *Physiol. Behav.* v.47, p.853-856, 1990.
- [37] Terçariol PR, Godinho AF. Behavioral effects of acute exposure to the insecticide fipronil. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* v.99, p.221 - 225, 2011.
- [38] Hernández AF, Gil F, Lacasaña M, Rodríguez-Barranco M, Tsatsakis AM, Requena M, Parrón T, Alarcón R. Pesticide exposure and genetic variation in xenobiotic-metabolizing enzymes interact to induce biochemical liver damage. *Food and Chemical Toxicology.* v.61, p.144-151, 2013.
- [39] Gupta SK, Pal AK, Sahu NP, Saharan N, Prakash C, Akhtar MS, Kumar S. Haemato-biochemical responses in *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) fry exposed to sub-lethal concentration of a phenylpyrazole insecticide, fipronil. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences.* v. 84, n. 1; p. 113-122, 2014.
- [40] Myers RK, McGavin MD, Zachary JF. Cellular adaptation, injury, and death: morphologic, biochemical, and genetic bases. 2012. In: Zachary JF, McGavin MD. *Pathologic basis of veterinary disease.* 5th edn. St. Louis: Elsevier Mosby, 2012. cap. 1

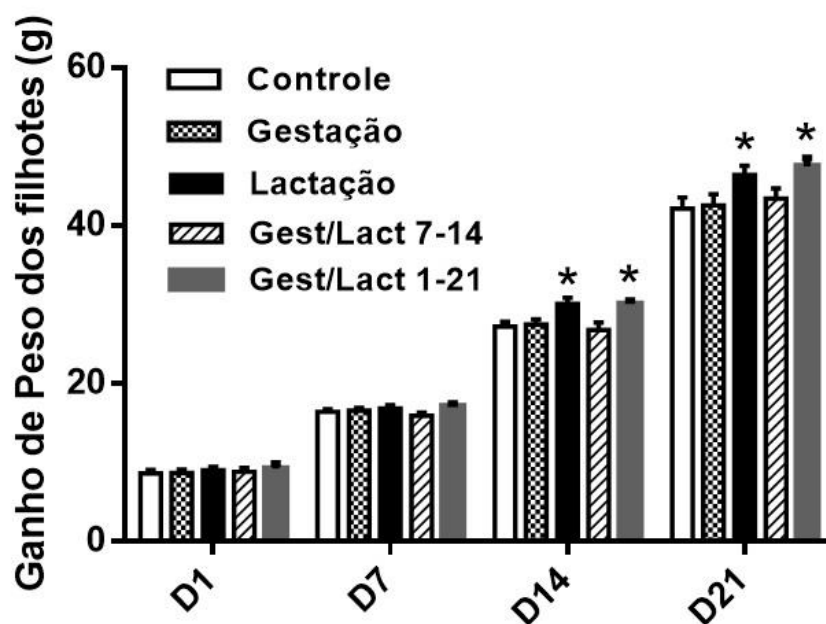


Figura 1. Efeito do fipronil sobre o ganho de peso dos filhotes de ratas expostas ao praguicida no período perinatal.

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (N=8). * $p < 0,05$ em relação ao controle. D = dia da avaliação do peso dos animais.

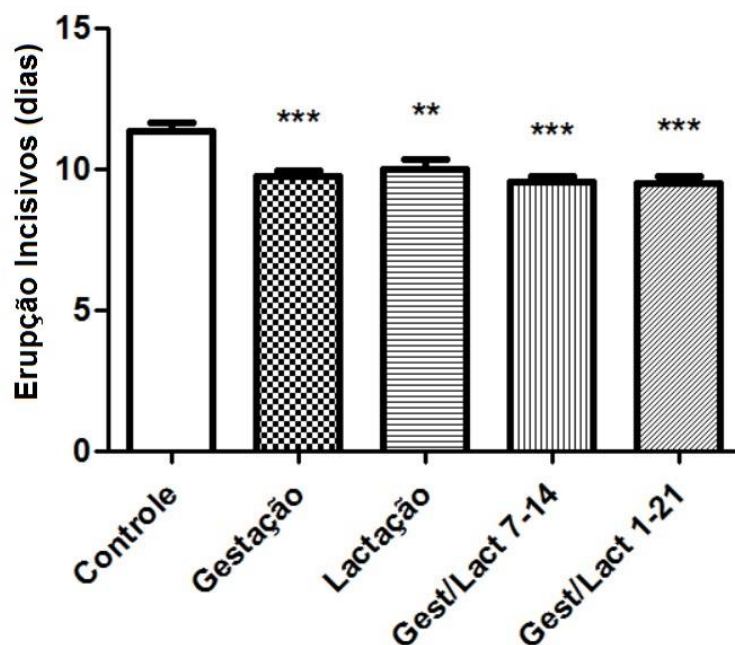


Figura 2. Número de dias para a erupção dos dentes incisivos em filhotes de ratas expostas ao fipronil no período perinatal.

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (N=15). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao Controle.

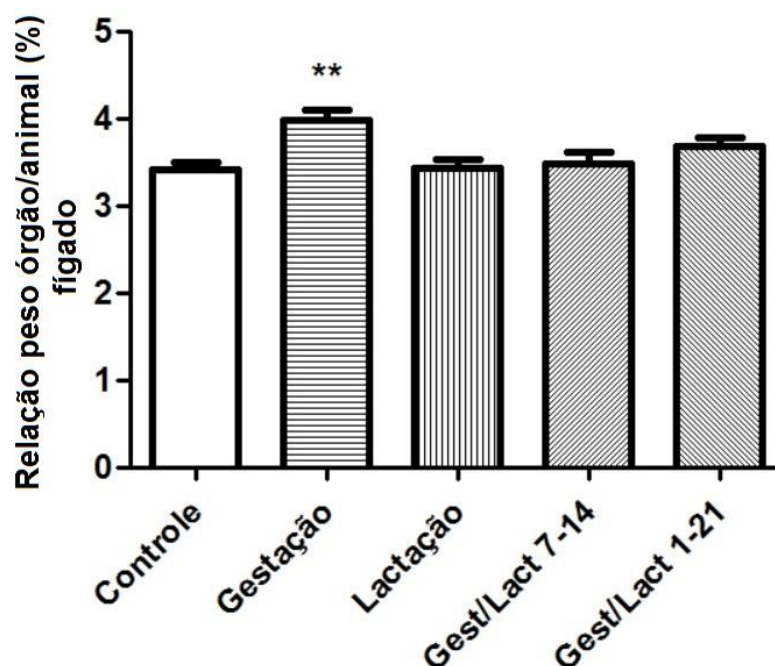


Figura 3. Relação peso órgão/animal (%) do fígado da prole adulta de ratas expostas ao fipronil no período perinatal.

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (N=15). ** $p < 0,01$ em relação ao Controle.

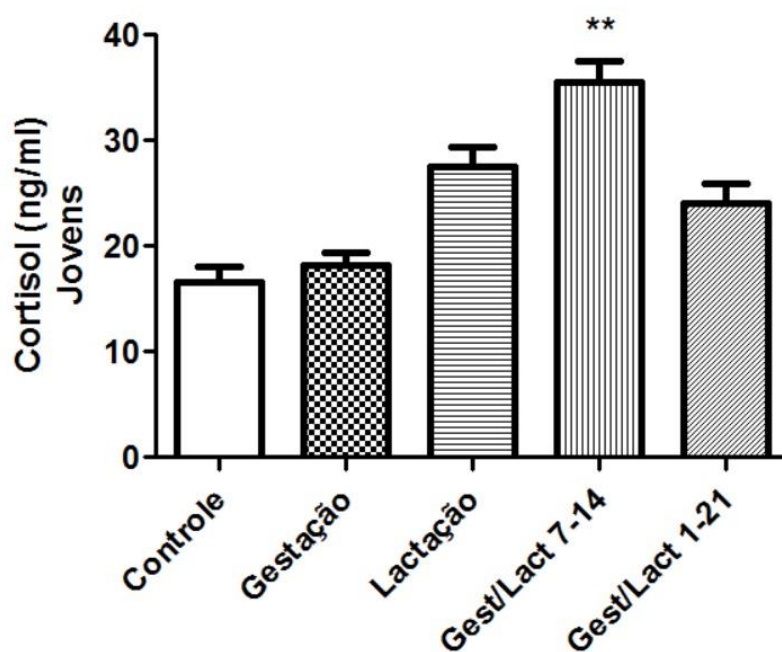


Figura 4. Dosagem do cortisol sérico na prole jovem de ratas expostas ao fipronil no período perinatal.

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (N=7). ** $p < 0,01$ em relação ao controle.

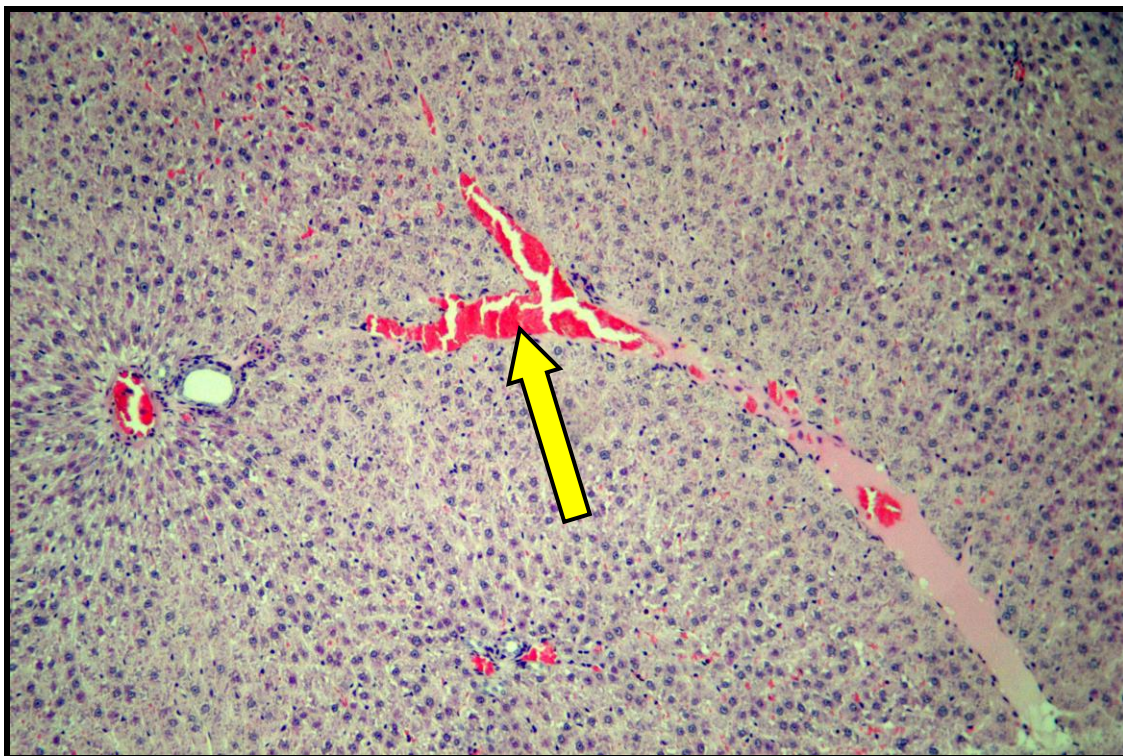


Figura 5. Congestão vascular no fígado de filhotes de ratas expostas ao fipronil no período perinatal. Aumento de 100x.

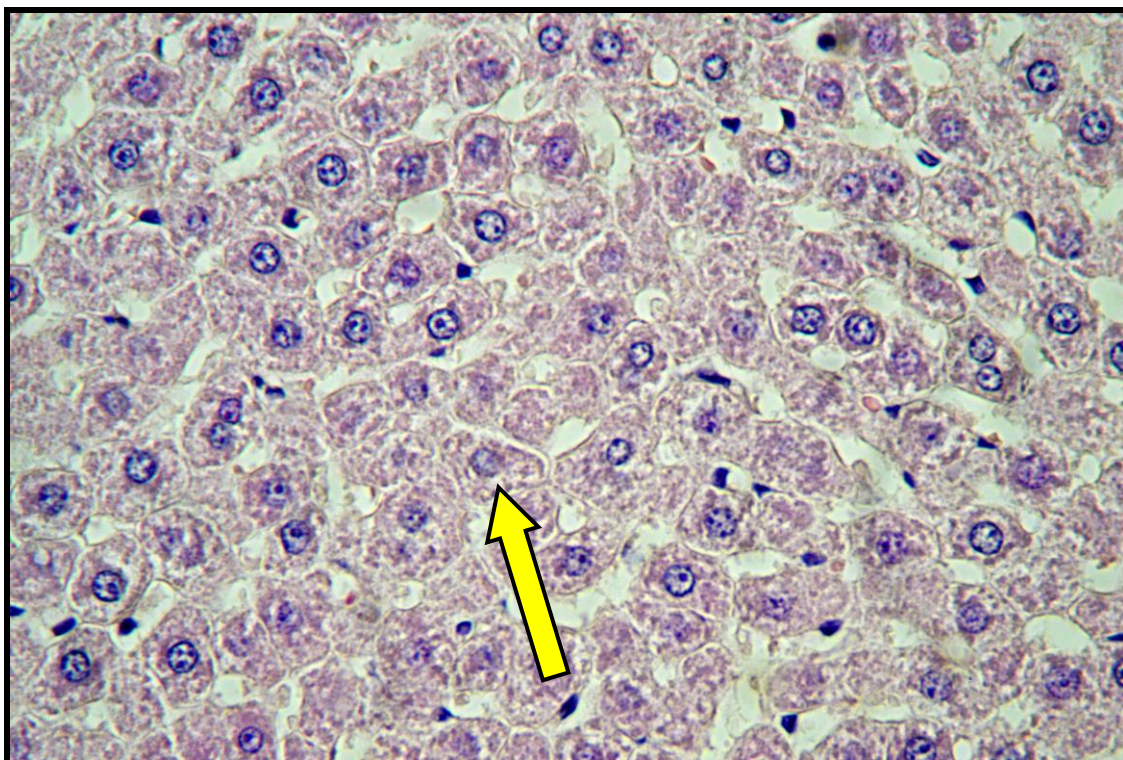


Figura 6. Degeneração hidrópica no fígado de filhotes de ratas expostas ao fipronil no período perinatal. Aumento de 400x.

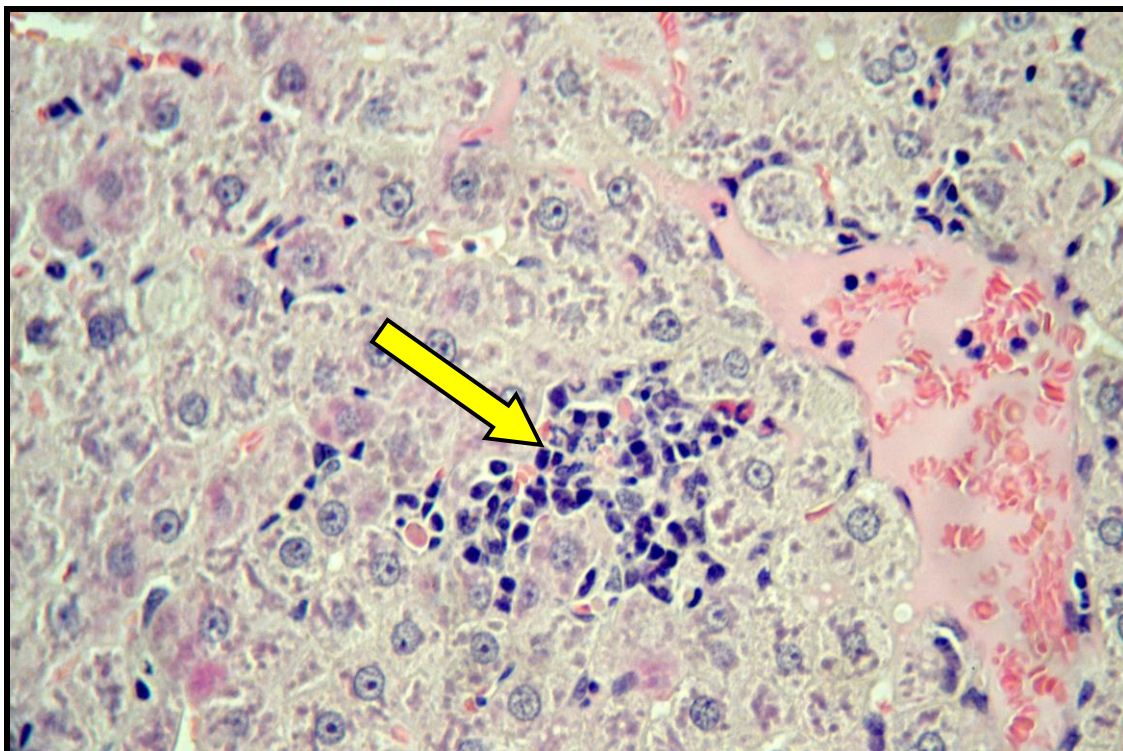


Figura 7. Infiltrado linfocítico no fígado de filhotes de ratas expostas ao fipronil no período perinatal. Aumento de 400x.

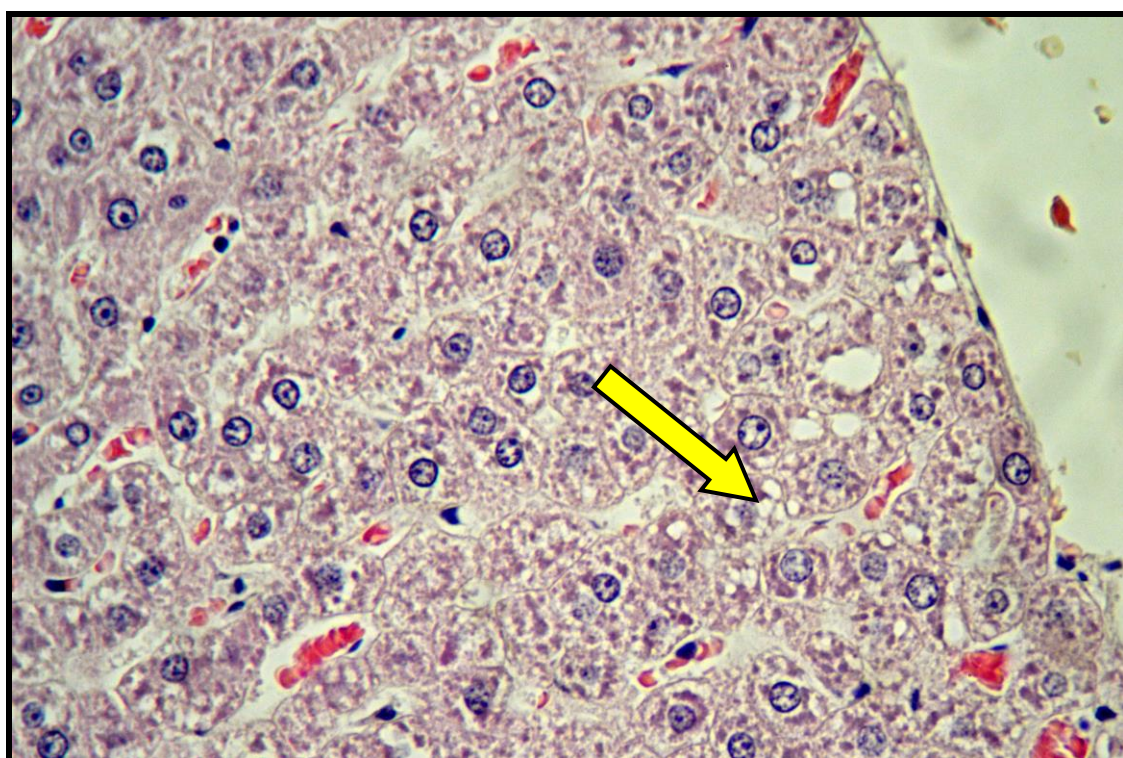


Figura 8. Degeneração gordurosa no fígado de filhotes de ratas expostas ao fipronil no período perinatal. Aumento de 400x.

1A – Jovens

Alteração Patológica	Controle	Gestação	Lactação	Gest/Lact 7-14	Gest/Lact 1-21
Congestão vascular	++	+++	s.a.	+++	+++
Degeneração hidrópica	++++	++++	++++	++++	++++
Infiltrado linfocítico	s.a.	+	+	s.a.	s.a.

1B – Adultos

Alteração Patológica	Controle	Gestação	Lactação	Gest/Lact 7-14	Gest/Lact 1-21
Congestão vascular	++	+++	s.a.	+++	++++
Degeneração gordurosa	s.a.	s.a.	+	+	s.a.
Degeneração hidrópica	+++	++++	++++	++++	++++
Infiltrado linfocítico	+	+	++	+++	++

Tabela 1. Alterações histopatológicas no fígado de filhotes (jovens – 1A e adultos – 1B) de ratas expostas ao fipronil no período perinatal.

NOTA: s.a (sem alteração); + (alteração leve); ++ (alteração leve à moderada); +++ (alteração moderada à intensa); ++++ (alteração intensa).

3. DISCUSSÃO GERAL

A soma das alterações observadas e descritas em cada capítulo, deste trabalho de tese, sugere que o praguicida fipronil produziu vários níveis de toxicidade perinatal, como evidenciado pela exposição dos resultados.

Como observado pelos resultados, as alterações observadas no presente estudo não seguiram um padrão de ocorrência sempre para os mesmos grupos de exposição, porém, fica claro que o período de tratamento lactação foi o que mais apresentou prejuízo às avaliações realizadas.

Apesar de alguns resultados obtidos serem completamente inéditos já que não foram ainda descritos na literatura pertinente, o conjunto dos resultados obtidos está em acordo com dados de vários estudos prévios da literatura, os quais sugerem que a exposição da fêmea a agroquímicos durante a prenhez e a lactação pode causar alterações refletidas em aspectos físicos e comportamentais, de acordo com o período do desenvolvimento animal (KIMMEL, 1998; CHELONIS et al., 2004; COSTA et al., 2004).

Este estudo teve como foco principal o desenvolvimento neurocomportamental e foi possível observar que as alterações provocadas pelo fipronil, podem interferir severamente na homeostasia do tecido cerebral. Além disso, que outros órgãos como o fígado e tecidos como o sistema nervoso motor periférico, por exemplo, também podem ser prejudicados pela ação tóxica do praguicida estudado.

Alguns dos efeitos observados tenderam a ser permanentes enquanto que outros foram transitórios. Agentes neurotóxicos podem causar lesão no cérebro, especialmente se as exposições ocorrerem durante o período de desenvolvimento precoce. Segundo JULVEZ e GRANDJEAN (2009) se os processos de desenvolvimento do sistema nervoso do feto imaturo forem prejudicados, os efeitos tendem a ser duradouros e, possivelmente, permanentes por causa da maior sensibilidade dos tecidos em formação e maturação.

Uma vez que o mecanismo de ação do fipronil ocorre no sistema nervoso central, através da inibição do sistema GABA, seria esperado que alterações comportamentais e de desenvolvimento físico e sensorio-motor estejam presentes nos animais expostos a este praguicida segundo este mecanismo de

ação, porém, foi observado que outros níveis e mecanismos podem estar envolvidos na neurotoxicidade pelo fipronil, que não os gabaérgicos.

Alguns dos efeitos observados neste estudo podem ser sugestivos de desregulação endócrina pelo fipronil no período perinatal.

Atualmente, poucas referências estão disponíveis na literatura à respeito dos efeitos do fipronil nos animais, diferente do que se vê com vegetais, cujo assunto é mais explorado. Devido a sua ampla utilização no meio ambiente e a essa escassez da literatura quando se busca por estudos que demonstrem os efeitos deste praguicida nos animais, são necessárias mais pesquisas sobre os aspectos toxicológicos do fipronil.

Este estudo comprova o que muitos pesquisadores já vêm observando, que é o fato de que muitas das doenças que são observadas na população humana podem ter sua origem na exposição alimentar e ocupacional, já que, esta vias, permitem o contato direto com agentes químicos praguicidas, desde baixas até altas doses, dependendo do tempo e da via de exposição.

É importante frisar que os resultados aqui obtidos ocorreram devido à uma dose baixa e esta se assemelha àquela à qual a maioria dos humanos pode estar sendo exposta, o que traz uma grande preocupação aos organismos regulatórios que controlam a liberação e o uso de tais produtos.

4. CONCLUSÃO GERAL

A exposição perinatal ao praguicida fipronil, em períodos da gestação e lactação, influencia o desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole de ratos nas idades jovem e adulta do seu desenvolvimento.

De modo geral, os animais expostos ao fipronil, no presente estudo, apresentaram-se mais ansiosos, agressivos, com memória prejudicada e com deficiência motora, devido à exposição em um ou mais dos períodos escolhidos para tal, demonstrando claramente o alto poder de neurotoxicidade do praguicida.

Os efeitos tóxicos do fipronil podem ser devido a sua ação em áreas cerebrais diferentes já que comportamentos relacionados à diferentes áreas apresentaram-se alterados em algum aspecto.

Os efeitos aqui observados devem ser mais estudados para uma melhor compreensão dos mecanismos mais íntimos pelos quais a ação tóxica ocorre, pois outros sistemas que não o do GABA, que está envolvido diretamente na ação neurotóxica do fipronil, podem ter uma ação aditiva ou sinérgica.

5. BIBLIOGRAFIA¹

AAJOUD, A.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.51, n.5, p.1347-1352, 2003.

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

ANVISA. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. 2005.

AZEVEDO, D.M.F.S. *Efeitos da restrição de tiamina durante o desenvolvimento sobre o desempenho cognitivo espacial e níveis cerebrais de GABA e glutamato em ratos jovens e adultos*. 2010. 122f. Tese (Doutorado) – Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BAVARESCO, C.S. *Alterações bioquímicas e comportamentais em ratos submetidos à administração intra-estriatal de hipoxantina*. 2008. 233f. Tese (Doutorado) – Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BEHR, G.A.; MOTTA, L.L.; OLIVEIRA, M.R.; OLIVEIRA, M.W.S.; HOFF, M.L.M.; SILVESTRIN, R.B.; MOREIRA, J.C.F. Decreased anxiety-like behavior and locomotor/exploratory activity, and modulation in hypothalamus, hippocampus, and frontal cortex redox profile in sexually receptive female rats after short-term exposure to male chemical cues. *Behavioural Brain Research*. v.199, p.263-270, 2009.

BEIDERBECK, D.I.; REBER, S.O.; HAVASI, A.; BREDEWOLD, R.; VEENEMA, A.H.; NEUMANN, I.D. High and abnormal forms of aggression in rats with extremes in trait anxiety – Involvement of the dopamine system in the nucleus accumbens. *Psychoneuroendocrinology*. v.37, p.1969-1980, 2012.

BENETTI, F. *Intervenções na relação mãe-filhote e seus efeitos nas respostas comportamentais e endócrinas na vida adulta*. 2005. 87f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

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

¹ Referências formatadas conforme as Regras Gerais das Referências Bibliográficas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Disponível em: http://www.fmvz.unesp.br/Home/Pos-Graduacao/MedicinaVeterinaria/modelos_diss_tese.pdf

BRANCO, A.C.S.C. *Avaliação da Toxicidade Crônica Pré-Clínica de Foeniculum vulgare Mill.* 2009. 136f, Tese (Doutorado) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

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, n.24, p.7055-7061, 2003.

CASTRO, V.L. Biomarcadores e Desenvolvimento Neurocomportamental: Aspectos Experimentais. *Embrapa Meio Ambiente*. Jaguariúna, 2006.

CASTRO, V.L. Estudo Experimental em Ratos da Interação Mãe-Filhote Expostos a Agroquímicos. *Circular Técnica*. ISSN 1516-4683. Jaguariúna, 2006a.

CHELONIS, J.; FLAKE, R.; BALDWIN, R.; BLAKE, B.; PAULE, M. Developmental aspects of timing behavior in children. *Neurotoxicology and Teratology*. v.26, p.461-476, 2004.

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

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. *Química Nova*. v.35, n.10, p.2063-2066, 2012.

CONNELLY, P. Environmental Fate of Fipronil. *California Environmental Protection Agency*. California, EUA, 2001.

COSTA, L.; ASCHER, M.; VITALONE, A.; SYVERSEN, T.; SOLDIN, O. Developmental neuropathology of environmental agents. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. v.44, p.87-110, 2004.

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

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

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

DIETRICH, A.; ORMEL, J.; BUITELAAR, J.K.; VERHULST, F.C.; HOEKSTRA, P.F.; HARTMAN, C.A. Cortisol in the morning and dimensions of anxiety, depression, and aggression in children from a general population and clinic-referred cohort: an integrated analysis. The trails study. *Psychoneuroendocrinology*. v.38, p.1281-1298, 2013.

FAVERO, A.M. *Efeitos da exposição materna ou paterna ao disseleneto de difenila sobre o desenvolvimento intra-uterino da prole de ratas Wistar*. 2006. 78f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Santa Maria.

FERNANDES, E.S. *Embriogênese inicial em ratas Wistar tratadas com extrato de Ginkgo biloba*. 2009. 69f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

FERREIRA, M. *Estudo morfológico do fígado de camundongos expostos a ação do fipronil (ingrediente ativo do acaricida Frontline®)*. 2010. 38f. Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro.

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 frontline®) on the liver of mice: an ultrastructural analysis. *Microscopy Research and Technique*. v.75, p.197-205, 2012.

FERREIRA, M.; OLIVEIRA, P.R.; DENARDI, S.E.; BECHARA, G.H.; MATHIAS, M.I.C. Fipronil (active ingredient of acaricide frontline®) acting on the mice thyroid. *Microscopy Research and Technique*. v.75, p.265-270, 2012a.

FILE, S.E.; WARDILL, G. The reliability of the Hole-Board Apparatus. *Psychopharmacologia*. v.44, p.47-51, 1975.

FLÓRIO, J.C.; SOUSA, A.B. Toxicocinética e toxicodinâmica. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; PALERMO-NETO, J. In: *Toxicologia aplicada à medicina veterinária*. São Paulo: Manole, 2008. Capítulo 2. 942p.

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

GEHLEN, K.A. *Avaliação toxicológica dos benzodiazepínicos diazepam e maleato de midazolam sobre o desenvolvimento pré-natal de ratos Wistar*. 2003. 78f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GIBBONS, D.; MORRISSEY, C.; MINEAU, P. A Review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science and Pollution Research*. DOI 10.1007/s11356-014-3180-5. 2014.

GILL, K.K.; DUMKA, V.K. Biochemical alterations induced by oral subchronic exposure to fipronil, fluoride and their combination in buffalo calves. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v.36, p.1113-1119, 2013.

GODINHO, A.F.; STANZANI, S.L.; FERREIRA, F.C.; BRAGA, T.C.; SILVA, M.C.; CHAGURI, J.L.; DIAS-JÚNIOR, J.L. Permethrin chronic exposure alters motor coordination in rats: effect of calcium supplementation and amlodipine. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v.37, p.878-884, 2014.

GONÇALVES, J.F. *Avaliação de respostas bioquímicas, comportamentais, hematológicas e de bioacumulação em ratos expostos ao cádmio e tratados com N-Acetilcisteína*. 2012. 143f. Tese (Doutorado) – Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GÓRNIK, S.L.; SPINOSA, H.S.; BERNARDI, M.M. Toxicologia do desenvolvimento. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; PALERMO-NETO, J. In: *Toxicologia aplicada à medicina veterinária*. São Paulo: Manole, 2008. Capítulo 25. 942p.

GRANCE, S.R.M. *Efeito do extrato hidroetanólico de Baccharis trimera em ratas prenhes e seus conceitos*. 2007. 79f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

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

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

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

IKEDA, T.; ZHAO, X.; NAGATA, K.; KONO, Y.; SHONO, T.; YEH, J.Z.; NARAHASHI, T. Fipronil modulation of gamma-aminobutyric acid_A receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v.296, n.3, p.914-921, 2001.

IKEDA, T.; NAGATA, K.; KONO, Y.; YEH, J.Z.; NARAHASHI, T. Fipronil modulation of GABA_A receptor single-channel currents. *Pest Management Science*. v.60, p.487-492, 2004.

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

JONSSON, C.M.; CASTRO, V.L. Bioindicadores e Biomarcadores de Agroquímicos no Contexto da Relação Saúde-Ambiente. *Embrapa Meio Ambiente*. 2005.

JULVEZ, J.; GRANDJEAN, P. Neurodevelopmental toxicity risks due to occupational exposure to industrial chemicals during pregnancy. *Industrial Health*. v.47, p.459-468, 2009.

KIMMEL, C. Current Approaches to Risk Assessment for Developmental Neurotoxicology. In: SLIKKER, W.; CHANG, L. *Handbook of Developmental Neurotoxicology*. San Diego: Academic Press. p.675–685, 1998.

KOOLHAAS, J.M.; BOHUS, B. Animal models of human aggression. In: Alan A. Boulton, et al. (Eds.) *Animal models in psychiatry II*, Human Press, Clifton, New Jersey, p.249-271, 1991.

KUC, K.A.; GREGERSEN, B.M.; GANNON, K.S.; DODART, J.C. Holeboard discrimination learning in mice. *Genes, Brain and Behavior*. v.5, p.355-363, 2006.

LACROIX, M.Z.; PUEL, S.; TOUTAIN, P.L.; VIGUIÉ, C. Quantification of fipronil and its metabolite fipronil sulfone in rat plasma over a wide range of concentrations by LC/UV/MS. *Journal of Chromatography B*. v.878, 1934-1938, 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, p.38-44, 2009.

LI, P.; AKK, G. The insecticide fipronil and its metabolite fipronil sulphone inhibit the rat $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABA_A receptor. *British Journal of Pharmacology*. v.155, p.783-794, 2008.

MANDAL, K.; KAUR, R.; SINGH, B. Development of thin layer chromatographic technique for qualitative and quantitative analysis of fipronil in different formulations. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. v.37, n.19, p.2746-2755, 2014.

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

MELLO, R.C.V. *Avaliação do cortisol salivar no paciente em estado crítico*. 2007. 96f. Dissertação (Mestrado em Patologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

NEVES, M.D. *Avaliação da memória em camundongos pré-condicionados com N-metil-D-aspartato e submetidos ao modelo de traumatismo crânio-encefálico*. 2010. 58f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso), Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, Criciúma.

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*. 2010. 173f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

OLTON D.S. The Radial Arm Maze as a tool in behavioral pharmacology. *Physiology and Behavior*. v.40, p.793-797, 1987.

OZOE, Y.; YAGI, K.; NAKAMURA, M.; AKAMATSU, M.; MIYAKE, T.; MATSUMURA, F. Fipronil-Related Heterocyclic Compounds: Structure–Activity Relationships for Interaction with g-Aminobutyric Acid- and Voltage-Gated Ion Channels and Insecticidal Action. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. v.66, p.92–104, 2000.

POPPENGA, R.H.; OEHME, F.W. Pesticide use and associated morbidity and mortality in veterinary medicine. In: *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. Ed. Robert Krieger. Chapter 7, p.285-301. Academic Press, San Diego, 2010.

PÓVOA, R.M.F. *Estudo comparativo dos comportamentos exploratórios, predatórios e agonísticos de ratos Wistar, selvagens (Rattus norvegicus sp) e linhagens derivadas*. 2007. 219f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas), Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

RIGHI, D.A.; SPINOSA, H.S.; PALERMO-NETO, J. Avaliação da toxicidade. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; PALERMO-NETO, J. In: *Toxicologia aplicada à medicina veterinária*. São Paulo: Manole, 2008. Capítulo 3. 942p.

ROMAN, S.S. *Avaliação toxicológica de compostos orgânicos de telúrio sobre o desenvolvimento pré-natal em camundongos*. 2011. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

SALVATORI, F.; TALASI, C.B.; SALZGEBER, S.A.; SPINOSA, H.S.; BERNARDI, M.M. Embryotoxic and long-term effects of cadmium exposure during embryogenesis in rats. *Neurotoxicology and Teratology*. v.26, p.673-680, 2004.

SANTOS, T.R. *Desenvolvimento neonatal de crias de ratas Wistar (Rattus norvegicus BERKENHOUT, 1769) tratadas com Flavanóide Ipriflavona durante a lactação plena*. 2011. 52f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

SERRA, M. *Elevação plasmática do cortisol aumenta a agressividade em juvenis de matrinxã, Brycon amazonicus*. 2010. 75f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

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

SILVA, L.M. *Efeitos do mercúrio sobre a atividade das enzimas Alanina Aminotransferase, Lactato Desidrogenase e Glicose 6-Fosfatase de ratos jovens*. 2010. 69f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

SILVEIRA, C.K.B.; FURINI, C.R.G.; BENETTI, F.; MONTEIRO, S.C.; IZQUIERDO, I. The role of histamine receptors in the consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*. v.103, p.64-71, 2013.

SINDIVEG. *Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal*. 2014.

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

SPINOSA, H.S.; SCHWARZ, A. Introdução à toxicologia veterinária. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; PALERMO-NETO, J. In: *Toxicologia aplicada à medicina veterinária*. São Paulo: Manole, 2008. Capítulo 1. 942p.

SPINOSA, H.S.; XAVIER, F. G. Considerações gerais sobre os praguicidas. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; PALERMO-NETO, J. In: *Toxicologia aplicada à medicina veterinária*. São Paulo: Manole, 2008. Capítulo 9. 942p.

STANLEY, E.M.; WILSON, M.A.; FADEL, J.R. Hippocampal neurotransmitter efflux during one-trial novel object recognition in rats. *Neuroscience Letters*. v.511, p.38-42, 2012.

STOLBERG, A. Ranking of memories and behavioral strategies in the Radial Maze. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, v.65, p.39-49, 2005.

SZEGEDI, V.; BÁRDOS, G.; DÉTÁRI, L.; TÓTH, A.; BANCZEROWSKI-PELYHE, I.; VILÁGI, 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, A.; HODGSON, E.; ROSE, R.L. *In vitro* metabolismo of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam. *Chemico-Biological Interactions*. v.147, p.319-329, 2004.

TERÇARIOL, P.R.G. *Avaliação neurocomportamental de ratos expostos agudamente ao fipronil – influência de diazepam e flumazenil*. 2007. 78f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.

TERÇARIOL, P.R.G.; GODINHO, A.F. Behavioral effects of acute exposure to the insecticide fipronil. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. v.99, p.221-225, 2011.

TERÇARIOL, S.G.; ALMEIDA, A.A.; GODINHO, A.F. Cadmium and exposure to stress increase aggressive behavior. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v.32, p.40-45, 2011.

THRALL, M.A. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. São Paulo: Roca, 2006. Capítulo 16 e capítulo 31.

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

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

U.S. EPA. Fipronil Pesticide fact sheet. EPA 737-F-96-005. U.S.Environmental Protection Agency, Washington, USA. 7 pp., 1996. <http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/199ay-12/pr736DIR/Facts/Factsheet.txt.html>

UDO, M.S.B. *Avaliação dos efeitos tóxicos da exposição pré-natal ao fipronil na role de ratas Wistar*. 2012. 146f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

UDO, M.S.B.; SANDINI, T.M.; REIS, T.M.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Prenatal exposure to a low fipronil dose disturbs maternal behavior and reflex development in rats. *Neurotoxicology and Teratology*. p.1-7, 2014.

ZHAO, X.; YEH, J.Z.; SALGADO, V.L.; NARAHASHI, T. Sulfone metabolite of fipronil blocks γ -aminobutyric acid and glutamate-activated chloride channels in mammalian and insect neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v.314, n.1, p.363-373, 2005.

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

WILDE, G.E.; WHITWORTH, 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.

6. ANEXOS

- Normas para formatação dos artigos conforme as revistas:

Capítulo 2. Revista: Pesticide Biochemistry and Physiology

INTRODUCTION

Pesticide Biochemistry and Physiology will publish original research papers in English, dealing with the biochemistry and physiology of insecticides, herbicides fungicides, acaricides, nematocides, rodenticides and similar compounds, including nonlethal pest control agents such as antifeeding compounds and chemosterilants as well as, for example, the biosynthesis of pheromones, hormones and plant resistance agents. Topics of interest include the effects of these agents on the biochemistry and physiology of both target and non-target organisms, and the biochemical transformations of the agents themselves. The mechanisms of resistance, and interactions such as synergism and antagonism, are also suitable topics.

The journal does not encourage papers devoid of biochemical or physiological content, e.g., reports of toxicity testing, or chemical synthesis, or analysis of residues (except when used as a tool for elucidation of metabolic pathways), or of the efficacy of pesticide treatments. Nevertheless, suitability is based on the purpose or rationale of the study, and not only upon the technique used.

In addition to full-length manuscripts containing original data, the Editor will consider occasional publication of concise reviews describing up-to-date and timely analysis of specific research areas of interest to readers of the journal. The recommended length of each "minireview" is four to seven published pages, including references, presented in a format identical to that used in regular contributions. They will be reviewed for their scientific merit in the same manner as full-length articles.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described

research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Capítulo 3. Revista: Environmental Toxicology and Pharmacology

Environmental Toxicology and Pharmacology publishes the results of studies concerning toxic and pharmacological effects of (human and veterinary) drugs and of environmental contaminants in animals and man.

Areas of special interest are: molecular mechanisms of toxicity, biotransformation and toxicokinetics (including toxicokinetic modelling), molecular, biochemical and physiological mechanisms explaining differences in sensitivity between species and individuals, the characterisation of pathophysiological models and mechanisms involved in the development of effects and the identification of biological markers that can be used to study exposure and effects in man and animals.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. **Abstract must not exceed 150 words.**

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, type 3-6 keywords or short phrases suitable for indexing. If possible, keywords should be selected from Index Medicus or Excerpta Medica Index. First category key-words (e.g. Hyperphagia; G-Strophantidin; Fiber shortening) will all be listed and

cross-indexed. Second category keywords (e.g. Rat, Cold, Metabolite) will only be listed under the index entry for the first category keywords. Use American spelling and avoid general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These terms will be printed at the end of the abstract. If the editors feel that keywords should be adjusted to the standards of the journal this will be done without consultation of the author(s).

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Capítulo 4. Revista: Toxicology

Toxicology, an international journal, publishes only the highest quality original research and critical reviews dealing with the adverse effects of xenobiotics on the health of humans and animals. The goal of the journal is to advance the scientific understanding of mechanisms of toxicity. Emphasis will be placed on toxic effects observed at relevant exposures, which have direct impact on safety evaluation and risk assessment. All manuscripts published in Toxicology are subject to rigorous peer review.

Article structure

Manuscripts should be typewritten double spaced.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide 3 to maximum 6 keywords that include the full chemical name(s). Use British spelling and avoid general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork**Electronic artwork**

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Capítulo 5. Revista: Reproductive Toxicology

Drawing from a large number of disciplines, Reproductive Toxicology publishes timely, original research on the influence of chemical and physical agents on reproduction. Written by and for obstetricians, pediatricians, embryologists, teratologists, geneticists, toxicologists, andrologists,

and others interested in detecting potential reproductive hazards, the journal is a forum for communication among researchers and practitioners. Articles focus on the application of in vitro, animal and clinical research to the practice of clinical medicine.

All aspects of reproduction are within the scope of Reproductive Toxicology, including the formation and maturation of male and female gametes, sexual function, the events surrounding the fusion of gametes and the development of the fertilized ovum, nourishment and transport of the conceptus within the genital tract, implantation, embryogenesis, intrauterine growth, placentation and placental function, parturition, lactation and neonatal survival. Adverse reproductive effects in males will be considered as significant as adverse effects occurring in females. To provide a balanced presentation of approaches, equal emphasis will be given to clinical and animal or in vitro work. Typical end points that will be studied by contributors include infertility, sexual dysfunction, spontaneous abortion, malformations, abnormal histogenesis, stillbirth, intrauterine growth retardation, prematurity, behavioral abnormalities, and perinatal mortality.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be

avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. **The abstract should contain no more than 150 words.**

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 8 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.

- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>