

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
UNESP BOTUCATU

AVALIAÇÃO NEUROCOMPORTAMENTAL DE RATOS
EXPOSTOS AGUDAMENTE AO FIPRONIL –
INFLUÊNCIA DE DIAZEPAM E FLUMAZENIL

PAULA RAQUEL GALBIATI TERÇARIOL

BOTUCATU – SP
2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
UNESP BOTUCATU

AVALIAÇÃO NEUROCOMPORTAMENTAL DE RATOS
EXPOSTOS AGUDAMENTE AO FIPRONIL –
INFLUÊNCIA DE DIAZEPAM E FLUMAZENIL

ALUNA: PAULA RAQUEL GALBIATI TERÇARIOL

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção
do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Antonio
Francisco Godinho

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Terçariol, Paula Raquel Galbiati.

Avaliação neurocomportamental de ratos expostos agudamente ao fipronil
– influência de diazepam e flumazenil / Paula Raquel Galbiati Terçariol. –
Botucatu : [s.n.], 2007

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

Orientador: Antonio Francisco Godinho

Assunto CAPES: 50501038

1. Toxicologia veterinária. 2. Sistema Nervoso Central - Efeitos de drogas.

CDD 636.089696

Palavras-chave: Comportamento; diazepam; Fipronil; flumazenil; GABA

Paula Raquel Galbiati Terçariol

**AVALIAÇÃO NEUROCOMPORTAMENTAL DE RATOS
EXPOSTOS AGUDAMENTE AO FIPRONIL – INFLUÊNCIA DE
DIAZEPAM E FLUMAZENIL**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Francisco Godinho
Presidente e Orientador
Centro de Assistência Toxicológica – CEATOX
Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Michiko Sakate
Membro
Departamento de Clínica Veterinária - Toxicologia
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Antonio Queiroz Neto
Membro
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
FMVZ - UNESP – Jaboticabal

Data da Defesa: 13 de dezembro de 2007.

Dedico este trabalho

A Deus

Princípio, meio e fim, por estar sempre ao meu lado,
guiando meus passos e orientando minha vida
sempre de acordo com sua sublime e perfeita vontade.

Aos meus pais Vitório e Raquel

Pelo amor infinito, exemplo de vida, apoio incondicional, em todos os momentos, da realização à concretização de meus sonhos.

e meus irmãos Vinicius e Simone

Pela convivência maravilhosa, amizade, carinho, compreensão e incentivo.

Vocês são e sempre serão exemplos para mim
Amo vocês!

Agradecimento especial

Ao Prof. Dr. Antonio Francisco Godinho

Pelos preciosos ensinamentos, oportunidade, confiança,
companheirismo, paciência e amizade. Por ter acreditado e
depositado sua confiança em mim, possibilitando a realização deste
Mestrado.

Agradecimento

A Tecbio – Merial, pela doação do Frontline.

Ao meu colega de trabalho Cláudio, pela paciência, compreensão e amizade.

A Livia, Érica, Andréia pela amizade, carinho e hospedagem.

Aos funcionários do CEATOX – Centro de Assistência Toxicológica, Alaor, Amauri, Aninha, Denise, Rita e Pardal pela amizade e apoio.

A FMVZ – Unesp Botucatu pela oportunidade de realização deste mestrado.

Aos funcionários da Pós-Graduação por toda ajuda, compreensão e paciência dispensada.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente foram fundamentais para a elaboração deste trabalho,

Muito Obrigada!

Figura 1 –	Fórmula estrutural do fipronil	9
Figura 2 –	Vias de degradação do fipronil no meio ambiente	10
Figura 3 –	Mecanismo de ação molecular do fipronil	13
Figura 4 –	Esquema do protocolo experimental	28

Gráfico 1 – Comportamento de congelamento.....	32
Gráfico 2 – Comportamento de limpeza.....	33
Gráfico 3 – Comportamento de locomoção.....	34
Gráfico 4 – Comportamento de levantar.....	35
Gráfico 5 – Número de entradas nos braços abertos.....	37
Gráfico 6 – Número de entradas nos braços fechados.....	38
Gráfico 7 – Tempo de permanência nos braços abertos.....	39
Gráfico 8 – Tempo de permanência nos braços fechados.....	40

Tabela 1 –	Resultados na Arena de Campo Aberto.....	31
Tabela 2 –	Resultados no Labirinto em Cruz Elevado.....	36

ABSTRACT	4
I – INTRODUÇÃO.....	6
II - REVISÃO DA LITERATURA	9
• Química	9
• Degradação do fipronil	9
1 – No meio ambiente	9
2 – Em organismos vivos	11
• Mecanismos Gerais de Toxicidade.....	12
1 - Efeitos em vertebrados e invertebrados	12
2 - Riscos devido à exposição em mamíferos	14
• Ecotoxicidade	16
• Toxicidade Reprodutiva	17
• Neurotoxicidade	19
• Hepatotoxicidade	20
• Carcinogênese	20
• Agonista Gabaérgico – Diazepam	21
• Antagonista Benzodiazepínico - Flumazenil	22
III – OBJETIVOS	24
IV – MATERIAL E MÉTODOS	26
1. Animais	26
2. Drogas utilizadas	26
3. Procedimento Experimental	26
3.1. Experimento Piloto	26
3.2. Grupos de Tratamento	27
3.3. Avaliação Neurocomportamental	28

3.3.1. Arena de Campo Aberto	28
3.3.2. Labirinto em Cruz Elevado	29
4. Análise Estatística dos Resultados	29
 V – RESULTADOS	 31
 VI – DISCUSSÃO.....	 42
 VII – CONCLUSÃO	 47
 VIII – BIBLIOGRAFIA	 49
 IX – TRABALHO CIENTÍFICO	 57

2007. 73p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Fipronil, um derivado fenil pirazólico, é conhecido por causar neurotoxicidade tendo o ácido gama-amino butírico (GABA) como principal alvo para o mecanismo de sua ação tóxica. O presente estudo investigou os efeitos do diazepam e do flumazenil sobre o comportamento de ratos expostos agudamente ao fipronil (Frontline® Top Spot). Ratos Wistar jovens, machos, receberam um dos seguintes tratamentos: a- 0,3 ml de óleo de milho aplicada topicamente sobre o dorso dos animais (controle). b- fipronil (280 mg/Kg) aplicado topicamente sobre o dorso dos animais; c- fipronil e após 3,0 horas, aplicação de diazepam (5mg/Kg, i.p.); d- fipronil e após 3,0 horas, aplicação de flumazenil (4mg/Kg, i.p.). Após 3,5 horas da aplicação do fipronil ou do controle e após 30 minutos do diazepam e do flumazenil, os animais tiveram o comportamento avaliado em arena de campo aberto e em labirinto em cruz elevado. Observou-se que na arena de campo aberto o diazepam antagonizou o efeito do fipronil sobre os comportamentos de limpeza e levantar e potencializou o comportamento de congelamento; já o flumazenil potencializou o efeito do fipronil sobre os comportamentos de limpeza e levantar e antagonizou o efeito do fipronil sobre o comportamento de congelamento. No labirinto em cruz elevado, diazepam parece ter potencializado o efeito do fipronil sobre o número de entradas nos braços abertos e fechados; já o flumazenil antagonizou o efeito do fipronil sobre a entrada no braço aberto. Concluindo, os resultados indicam influência do diazepam e do flumazenil sobre determinados comportamentos dos animais expostos agudamente ao fipronil sugerindo o envolvimento do GABA nos efeitos comportamentais do praguicida. Não se exclui outro tipo de mediação na ação deste agente sobre as alterações comportamentais observadas.

Palavras Chave: Fipronil, comportamento, GABA, diazepam, flumazenil.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The present study investigates diazepam and flumazenil influence on neurobehavioral effects of exposition to pesticide fipronil (Frontline[®] Top Spot) in young rats. The pesticide was topically applied (single dose) to rats receiving concurrent diazepam or flumazenil administration. Fipronil exposed rats in the open-field (OF) tests showed increased freezing, grooming, and rearing while elevated plus maze (EPM) tests showed none significant alterations although seems that fipronil decrease entry in both open and closed arms. In OF, diazepam intensified fipronil effect on freezing and antagonized on grooming and rearing while flumazenil antagonized fipronil effect on freezing and intensified fipronil effect on grooming and rearing. In EPM, diazepam intensified fipronil effect on entry in both open and closed arms while flumazenil antagonize this effect. Our studies suggest that fipronil exposition induces behavioral alterations in young rats correlated with fear; emotionality and exploratory behavior without modify locomotor activity of animals or anxiety status. The fact of diazepam and flumazenil influence these alterations suggests GABA mediation on observed fipronil effects but other mechanism of fipronil neurotoxicity is not discarded.

Key Words: Fipronil, behavior, GABA, diazepam, flumazenil.

INTRODUÇÃO

I – INTRODUÇÃO

Os estágios tecnológico e industrial atingidos pelo homem moderno proporcionaram o rápido desenvolvimento da capacidade de sintetizar novas substâncias químicas, porém, o uso irracional e indiscriminado destas é responsável por um dramático aumento nos níveis de poluição do solo e da água trazendo consequências na qualidade dos alimentos e sérios problemas na saúde do meio ambiente e dos organismos vivos que os habitam.

Praguicidas que agem em sistemas transmissores neuronal e muscular são freqüentemente aplicados na agricultura moderna no controle de várias pragas. Por vários anos, compostos organofosforados são utilizados para este propósito. Mais tarde, outros praguicidas altamente tóxicos foram introduzidos, como organoclorados e piretróides. Recentemente, praguicidas de 2º geração, como o fipronil, têm sido utilizados e observou-se que são menos tóxicos e com maior afinidade aos receptores de insetos e mamíferos.

Fipronil é um derivado fenilpirazol amplamente utilizado em medicina veterinária. Tem uma excelente ação terapêutica e atividade persistente no controle de pragas veterinárias (pulgas, carrapatos, mosca do chifre), quando administrado topicamente em animais domésticos. Também é efetivo em baixas doses contra numerosos insetos terrestres e, por causa do seu largo espectro de ação, permite que seja também utilizado para o controle de pragas das lavouras (gafanhotos, formiga e cupins) e na higiene pública (baratas, formigas, lagartixas, besouros, larvas de *Aedes aegypti*). Estas possibilidades de utilização podem, no entanto, permitir que organismos não alvos como aves, plantas aquáticas, peixes, algas, pássaros, humanos, répteis e mamíferos sejam atingidos.

O risco de impactos adversos dos praguicidas é devido a sua toxicidade intrínseca e de interações com o meio ambiente. A revisão bibliográfica a seguir focaliza além dos aspectos químicos, propriedades do fipronil relacionadas ao seu potencial de impacto ao meio ambiente, vida animal, seres humanos e sistemas agrícolas.

A busca de novos indicadores de exposição de organismos não alvos a agentes químicos, vem cada vez mais se intensificando e uma bateria de protocolos de testes procura identificar os problemas por meio de estudos de

toxicidade reprodutiva, neurotoxicidade, carcinogenicidade, hepatotoxicidade entre outros, utilizando nos estudos, roedores e não roedores.

Este projeto de pesquisa avaliou aspectos do mecanismo de ação tóxica do fipronil em ratos e as implicações sobre a neurotoxicidade deste agente, a qual foi avaliada por meio de testes neurocomportamentais.

II - REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

- Química

Fipronil, 5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-4-[(trifluorometil) sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitrila) (Sinonímia – MB 46030), é um composto classificado como praguicida (Classificação toxicológica – Classe II), descoberto pela transnacional Rhône-Poulenc Agro no ano de 1987 (RHÔNE-POULENC, 1995), sendo altamente ativo e de amplo espectro, derivado quimicamente da família do fenilpirazol ou fiproles. Recentemente, foi designado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S.EPA) como de 2ª geração e tem sido sugerido como alternativo aos inseticidas organofosforados (TANG et al., 2004). Comercialmente pode ser encontrado com vários nomes: Icon®, Regent®, Ascend®, Chipco®, Adonis®, Frontline®.

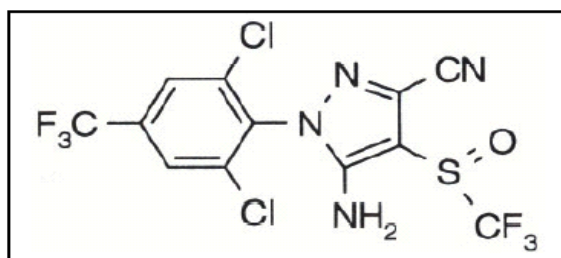


Figura 1 – Fórmula estrutural do fipronil (Tingle et al., 2003)

A formulação de fipronil é frequentemente apresentada como isca de insetos, spray para pets, e como produtos granulados para gramados no controle de grilos (U.S.EPA, 2001), incluindo também líquidos, pós e grânulos que dispersam na água, microgrânulos, sólido dispersível, emulsões aquosas (TINGLE et al., 2003).

- **Degradação do fipronil:**

1. No meio ambiente:

Fipronil é propenso a transformações metabólicas e degradações abióticas a vários produtos fundamentais gerando MB 46513 (fipronil desulfinitil)

por fotólise, MB 45950 (fipronil sulfeto) por redução, MB 46136 (fipronil sulfona) por oxidação e RPA 200766 (fipronil amido) por hidrólise (PEI et al., 2004).

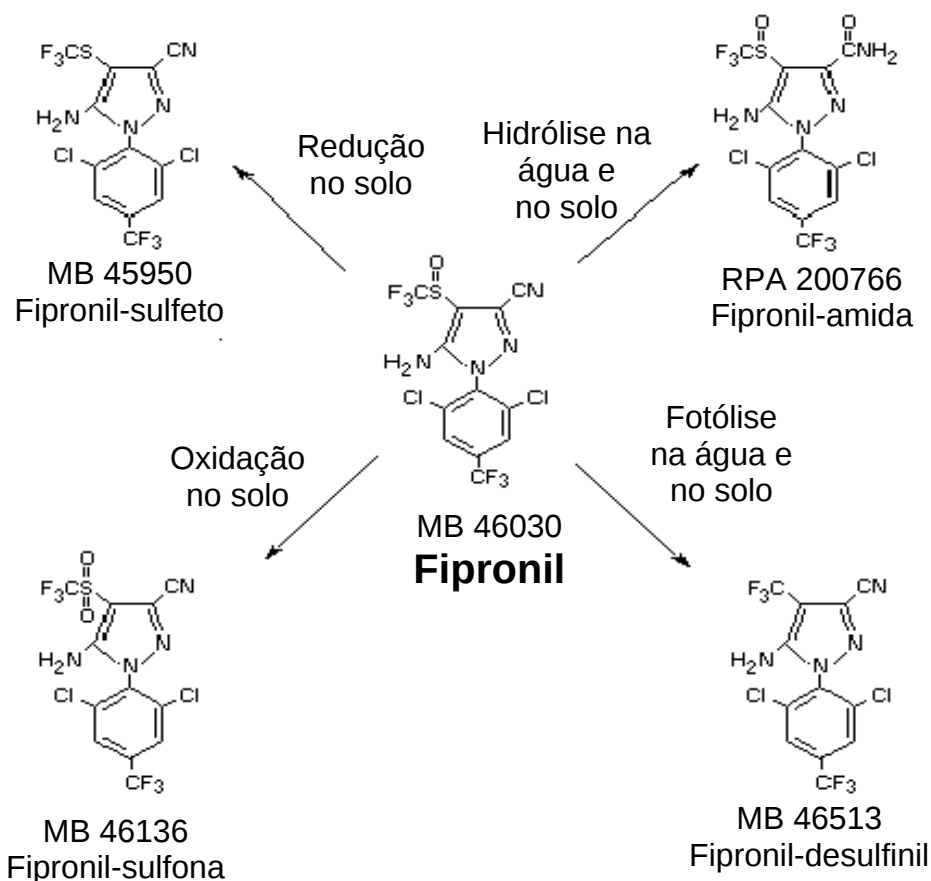


Figura 2 – Vias de degradação do fipronil no meio ambiente (PEI et al., 2004).

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

A degradação é lenta no solo argiloso, com uma meia vida de 34 dias (BOBE et al., 1998). Na água a degradação, tem meia vida de 3,63 horas,

quando exposto a uma fonte luminosa (U.S.EPA, 1996). Segundo Tingle et al. (2003) o potencial para contaminação do lençol d'água é considerado baixo.

Fipronil no ar tem uma pressão de vapor relativamente baixa e provavelmente não volatiliza e só será encontrado no ar se for utilizado na forma de spray. No solo, tem baixa mobilidade o que resulta num baixo potencial de contaminação de água, e tem uma tendência de dissipar-se longitudinalmente pelo solo, o que facilita sua quebra por microorganismos (U.S.EPA, 2001).

2. Em organismos vivos:

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

Em ratos, fipronil é rapidamente metabolizado e os resíduos extensamente distribuídos nos tecidos, particularmente em tecidos gordurosos, onde permanecem em quantias significantes uma semana após administração oral (TINGLE et al., 2003). Estudos metabólicos mostraram que havia um potencial maior de bioacumulação do produto MB-46513 (fipronil-desulfinil), em tecidos gordurosos (U.S.EPA, 1998).

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

Fipronil marcado (^{14}C) administrado oralmente para ratos e ratas nas doses de 4 e 150 mg/kg (dose única) e 4 mg/kg durante 14 dias, resultou em significantes quantidades de resíduos radioativos na carcaça, trato gastrointestinal, fígado, adrenal e gordura abdominal, após 168 horas, em todos os ratos em todos grupos de dose (U.S.EPA, 1996).

No ambiente doméstico, é utilizado contra carrapatos, pulgas e ácaros que infestam os animais, principalmente cães, gatos e eqüinos (POSTAL et al., 1995; PENALIGGON, 1997; HUGNET et al., 1999; JENNINGS et al., 2002).

Este agente químico tem formulação muito variada e tem sido bastante utilizado na agricultura para proteção contra formigas, gafanhotos, cupins, vaquinha verde-amarela, broca da cana, migdolus (MONOGRAFIA BASF S/A, 2005; SCHARF e SIEGFRIED, 1999, WILDE et al., 2001).

Não foram relatados efeitos agudos adversos em humanos e os sintomas observados em experimentos com animais expostos a doses altas foram: redução no consumo alimentar, anúria, excitabilidade e convulsões (MONOGRAFIA BASF S/A, 2005).

- **Mecanismos Gerais de Toxicidade:**

- 1 - Efeitos em vertebrados e invertebrados:

Fipronil é uma molécula extremamente ativa e um potente desregulador do Sistema Nervoso Central (SNC) dos insetos e dos mamíferos. A toxicidade de fipronil é atribuída a sua habilidade para agir no receptor ácido gama amino butírico (GABA) como um bloqueador não competitivo dos canais de cloro dos neurônios no sistema nervoso central (RHÔNE-POULENC, 1995; DAS et al., 2006). Esta ação resulta numa descontrolada atividade do SNC e conseqüente morte do inseto (FAO, 1998). Em insetos expostos a doses suficientes, o fipronil causa excitação neuronal excessiva, paralisia e morte. Matsuda et al. (2001) observaram que fipronil possui maior afinidade por receptores de insetos que os de mamíferos.

GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC de mamíferos. E sabe-se que benzodiazepínicos interagem com receptores GABA_A ligando-se no sitio modulatório dentro do complexo receptor (HALL et al., 2004).

Mecanismo de ação molecular do fipronil.

Fipronil (antagonista do GABA)

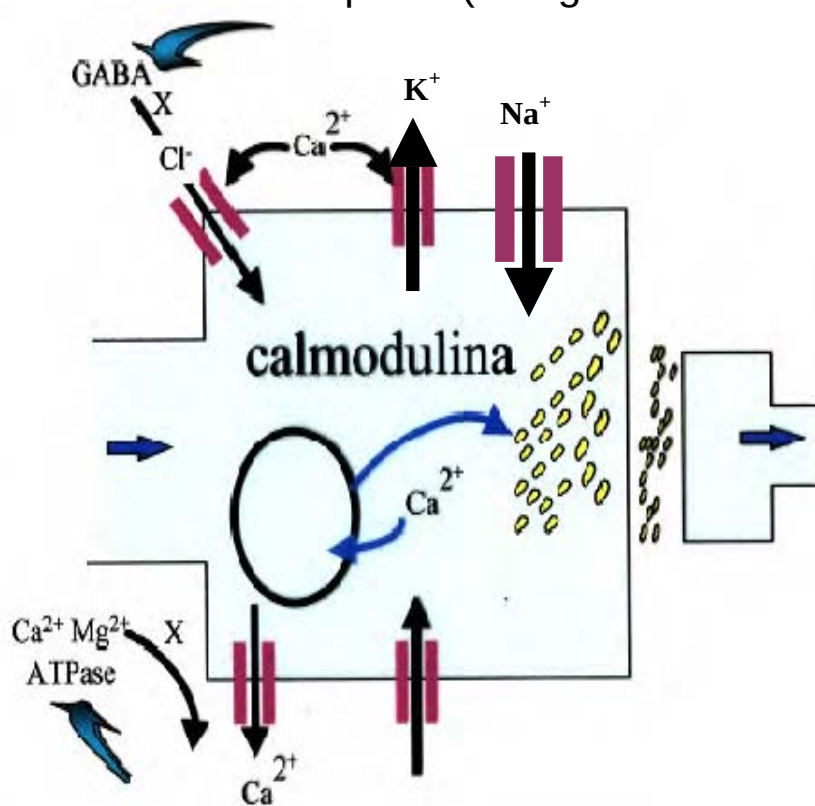


Figura 3 – Mecanismo de ação molecular do fipronil (Ecobichon, 2001).

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

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

Embora o fipronil seja moderadamente tóxico para ratos e camundongos, com uma DL50 oral entre 40 e 100 mg/kg (HAINZL e CASIDA, 1996; ROSE et al., 1999; TANG et al., 2004), estudos da ACP (1999) relatam que tecnicamente o fipronil pode estar na categoria tóxica II e III, dependendo da via de administração, sendo classificado como não-sensibilizador. Sinais comuns de toxicidade aguda em animais experimentais são: piloereção, postura curvada, locomoção anormal e diarreia.

Em camundongos, o fipronil é metabolizado no fígado, sofrendo um S-oxidação para formar o metabólito fipronil-sulfona (HAINZL et al., 1998; TANG et al., 2004). Já o relato da U.S.EPA, 2001, diz que o fipronil é tóxico para mamíferos por ingestão e a DL50 oral para ratos é 97mg/kg. É ligeiramente tóxico pela via dermal, com um relato de DL50 dermal maior que 200mg/kg para ratos. O fipronil não provoca sensibilização dérmica em cobaia, mas mostrou irritação dermal em coelhos.

Estudos crônicos com alimentação incluindo fipronil para ratos mostraram que ocorrem: ansiedade, diminuição do ganho de peso, diminuição do consumo alimentar e da eficiência na conversão alimentar, diminuição dos valores hematológicos, alterações de parâmetros sanguíneos (colesterol, cálcio e proteína), alterações dos hormônios da tireóide, alterações na bioquímica da urina, alterações grosseiras à necropsia, aumento do peso do fígado e tireóide e efeitos renais (U.S.EPA, 1996). Fipronil é principalmente eliminado pelas fezes e urina, respectivamente 45%-75% e 5%-25% das doses administradas (TINGLE et al., 2003).

Fipronil penetra fracamente na epiderme ou na camada hipoderme de ratos e coelhos, confirmando a baixa passagem percutânea (baixa toxicidade dermal), e quando aplicado por esta via, o produto não causou aumento nas malformações do esqueleto ou visceral em coelhos e ratos (ACP, 1999).

A substância química fipronil também possui excelente ação terapêutica e atividade persistente contra pulgas em gatos e cães (RUST, 2005).

2 - Riscos devido à exposição em mamíferos:

O principal mecanismo de ação da toxicidade de fipronil em humanos, se expostos, ocorre pelo mesmo princípio de ação tóxica observado em insetos, ou seja, inibição no receptor GABA (HAINZL e CASIDA, 1996; OZOE et al., 2000; TANG et al., 2004), fazendo bloqueio não competitivo dos canais de cloro dos neurônios no SNC. O risco de toxicidade aguda em humanos parece ser insignificante para pessoas quando fipronil é usado de acordo com as normas de procedimento do rótulo do produto (ACP, 1999).

Recentemente foi publicado um caso clínico descrevendo os sintomas induzidos por fipronil em pacientes, relatando dor de cabeça, náuseas, vertigem e fraqueza (CHODOROWSKI e ANAND, 2004). Este relato indica que inseticidas de 2º geração também podem provocar graves efeitos em humanos em casos de exposição prolongada. Embora várias investigações recentes tentem esclarecer a toxicidade neuronal de fipronil em mamíferos, há poucos dados acerca de efeitos fisiológicos detalhados (FUNG et al., 2003). Szegedi et al.(2005) sugerem que o fipronil possui alguns efeitos sobre o sistema nervoso de mamíferos, mas estes são geralmente moderados e temporários.

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

Baseado no fato de que as crianças são geralmente mais sensíveis que os adultos aos efeitos neurotóxicos e comportamentais (POHL et al., 1998; COSTA et al., 2004), a reversibilidade dos efeitos neurotóxicos nos adultos deve ser avaliada com critério, mesmo na ausência sinais clínicos neurológicos evidentes (KIMMEL, 1998).

A necessidade de avaliação de efeitos precoces por exposição a compostos químicos em crianças é reforçada pela observação de que estas crianças expostas a produtos de uso doméstico ou agrícola, mesmo que não apresentem sintomas clínicos, podem apresentar pior desempenho em testes neurocomportamentais em relação a crianças da mesma comunidade que nunca foram expostas a esses compostos (DAM et al., 2000). Por isso, preconizado a utilização de testes neurocomportamentais para avaliação da neurotoxicidade por agentes químicos tipo fipronil.

Modelos de estudos experimentais com animais são utilizados amplamente e os riscos de efeitos prejudiciais de agentes químicos para o ser humano são avaliados, baseados em modelos toxicocinéticos e fisiológicos. Em testes toxicológicos, geralmente são utilizados roedores, a fim de auxiliar a avaliação de potenciais danos causados pela exposição do homem a compostos tóxicos (CASTRO, 2004). Mas este é um ponto controverso da avaliação da segurança de uso dos compostos químicos. Na extrapolação dos dados obtidos em animais para os seres humanos, apesar da similaridade na fisiologia dos organismos, deve-se atentar para alguns aspectos como variações interespécies e limitações experimentais (DOURSON et al., 2002).

A neurotoxicidade ocasionada pela exposição a substâncias tóxicas é avaliada de acordo com testes, descritas na literatura internacional, que se baseia em aplicação de questionários (no caso de seres humanos), alterações de funções cognitivas e comportamentais. As funções cognitivas, como aprendizagem e memória, têm sido utilizadas em indivíduos expostos a solventes e metais pesados. As comportamentais são: sociabilidade, cooperação, estado emocional, nível de atividade, atenção, ansiedade e irritabilidade (DESPRÉS et al., 2005).

- **Ecotoxicidade:**

Apesar de seu uso considerável como praguicida em organismos de diversos ecossistemas, pouca informação tem sido disponibilizada sobre o

fipronil na literatura corrente em relação a sua toxicidade para organismos superiores, incluindo o próprio homem.

Fipronil é altamente efetivo contra uma variedade de pragas de insetos, mas existe uma grande preocupação sobre a contaminação do meio ambiente e efeitos na saúde humana, uma vez que seu uso mundial está aumentando devido ao aumento do comércio em muitos países industrializados e desenvolvidos (TINGLE et al., 2003).

A exposição humana aos agroquímicos seja por exposição ambiental ou ocupacional, pode ocasionar danos à saúde se as exposições forem freqüentes, inclusive em pequenas doses (CASTRO et al., 1999). A análise do risco de contaminação de populações expostas envolve o conhecimento das fontes de emissão, dos contaminantes, das transformações, transporte e acúmulo no ambiente, das rotas de ingresso no organismo, das doses potenciais, da biodisponibilidade, da dose biologicamente efetiva e de possíveis efeitos prejudiciais à saúde dos organismos (CASTRO, 2004).

Fipronil foi bastante comercializado na China em 1993, por causa de seu efetivo controle de pragas e lá tem sido usado extensivamente na plantação de arroz e outros vegetais (PEI et al., 2004).

Numerosos estudos foram conduzidos para determinar níveis de resíduos de fipronil em numerosas colheitas de vegetais e frutas. Os resultados indicaram que níveis de resíduos em alimentos colhidos são geralmente muito baixos, muitas vezes abaixo dos limites aceitáveis (BELAYNEH, 1998). Fipronil geralmente pode ser aplicada em baixas doses para promover efetivo controle de pragas; isto é claramente vantajoso sob o ponto de vista ecotoxicológico já que oferece redução de riscos à vida selvagem não-alvo (LATCHININSKI, 2000).

• Toxicidade Reprodutiva

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 (CLAUDIO et al., 1999; GREENLEE et al., 2004). 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. A exposição perinatal pode envolver efeitos latentes, observados tardiamente, que se manifestam após um estímulo ambiental, mesmo nos casos em que a exposição ocorra em doses menores que aquelas que promovem efeitos evidentes em adultos (KIMMEL, 1998; CHELONIS et al., 2004; COSTA et al., 2004).

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

Estudos recentes de Ohi et al. (2004) demonstraram que os efeitos adversos do fipronil sobre o aparelho reprodutor de ratas estão relacionados às alterações provocadas no sistema endócrino dos animais sugerindo ser o fipronil um desregulador deste sistema. Agentes ativos hormonalmente (desreguladores endócrinos) podem causar uma variedade de efeitos adversos à saúde incluindo alterações do desenvolvimento comportamental e riscos reprodutivos; também resulta em alterações dos níveis de progesterona e estradiol, na duração do ciclo estral e taxa de gestação de fêmeas de ratos Wistar. O desequilíbrio hormonal pode impedir o transporte dos espermatozóides, e consequentemente passagem do óvulo fertilizado para dentro do útero.

Os sinais tradicionalmente observados de toxicidade materna em estudos experimentais com o fipronil são: decréscimo do ganho de peso, diminuição do consumo de água e alimento, sinais clínicos e mortalidade. Alterações sutis de comportamento e mudanças neurológicas podem ser indicadores iniciais de dano à saúde dos animais jovens em desenvolvimento (CASTRO, 2004).

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

- **Neurotoxicidade:**

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 (WORMLEY et al., 2004), estudos que avaliem o comportamento de animais expostos ao fipronil tornam-se necessários.

Os estudos neurotoxicológicos experimentais em animais incluem avaliações preliminares (screening), que se constituem por bateria de observação funcional, quando são avaliados reflexos e algumas reações como salvação e piloereção. Ainda podem ser conduzidas avaliações do desenvolvimento cognitivo (aprendizado e memória) (CASTRO, 2004).

As respostas que envolvem atividade e outros comportamentos são estudadas em roedores no contexto de exploração e aprendizagem, memória e ansiedade. O efeito inicial neuroquímico no cérebro pode ter consequências comportamentais a longo prazo para o organismo em desenvolvimento (BEKKEDAL et al., 1999; SARTER, 2004). A atividade exploratória é freqüentemente usada como um índice de reatividade de um animal a uma situação nova e, até certo ponto, em situações de estresse (ZIMMERMANN et al., 2001; COSTOLI et al., 2005).

Fipronil causa neurotoxicidade aguda em ratos, promovendo diminuição da força muscular a ponto do animal se arrastar sobre as patas traseiras. Cães mostraram sinais clínicos de neurotoxicidade crônica e exames neurológicos anormais (U.S. EPA, 1996).

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

- **Hepatotoxicidade:**

Estudos recentes demonstraram o potencial dos pesticidas orgânicos para inibir ou induzir enzimas metabolizadoras de xenobióticos em humanos. Das et al. (2006) observaram que o fipronil promove indução enzimática hepática (CYP1A1, CYP3A4, CYP2B6 e CYP3A5) de forma dose dependente, porém, doses muito altas podem fazer retornar o nível do citocromo a níveis normais. Fipronil-sulfona induziu efeitos citotóxicos a doses baixas, e a possibilidade destes efeitos citotóxicos fossem devido a apoptose foi indicada por indução tempo e dose dependente, da atividade da enzima caspase – 3/7 em células HepG2 e hepatócitos humanos (DAS et al., 2006).

- **Carcinogênese:**

De acordo com a classificação pela U.S.EPA (1996) de carcinogênicos químicos, o fipronil foi classificado como pertencente ao grupo C (possível carcinogênico humano), baseado no aumento dos tumores de células foliculares da tireóide em ambos os sexos em ratos. Há 2 mecanismos básicos pelo qual substâncias químicas podem induzir neoplasia em glândula tireoideana em roedores: um, devido a um efeito carcinogênico direto na própria tireóide e o outro no qual uma variedade de mecanismos que funcionam como desreguladores da tireóide, induzem neoplasia da glândula

tireoideana, secundária ao desequilíbrio hormonal. Fipronil parece agir por meio do mecanismo secundário (U.S.EPA 1998).

Fipronil é um dos vários pesticidas conhecidos que induzem câncer na tireóide de ratos, provavelmente como o resultado de sua habilidade de acentuar o metabolismo hepático e a excreção dos hormônios da tireóide. É possível que a indução de enzimas microsossomais e o acompanhamento dos sintomas associados com indução, inclusive aumento do peso do fígado e hipertrofia hepatocelular, pode ter um papel no desenvolvimento do tumor (DAS et al., 2006).

Há importantes diferenças na fisiologia da glândula tireóide entre roedores e humanos. Isto pode indicar que o rato não seja um bom modelo para mecanismos carcinogênicos da tireóide em humanos. Os níveis de dose para os quais o fipronil produz câncer de tireóide em ratos são muito altos e são improváveis de ocorrer sob as condições normais de uso (TINGLE et al., 2003).

Diferenças entre espécies podem ser observadas, na dependência da dose, em se tratando da ação cancerígena deste agente. O fipronil técnico não é cancerígeno para camundongos quando administrado em doses de 30 ppm ou mais (U.S.EPA, 1996); já para ratos, fipronil é carcinogênico a doses de 300 ppm em machos e fêmeas, baseado no aumento da incidência de sinais clínicos e alterações na bioquímica clínica e parâmetros tireoideanos (U.S.EPA, 1996).

• Agonista Gabaérgico - Diazepam.

Os benzodiazepínicos interagem com receptores no SNC, localizados paralelamente aos receptores de GABA e amplamente distribuídos no córtex, cerebelo e estruturas límbicas, áreas envolvidas em processos emocional e cognitivo e também na deflagração de convulsão. Estudos demonstraram que há um acoplamento funcional e estrutural dos receptores de benzodiazepínicos com receptores de GABA, formando um complexo macromolecular e, desta forma, se explica a potencialização desses fármacos sobre os efeitos do neurotransmissor GABA nos sítios pré e pós-sinápticos, levando ao aumento da transmissão gabaérgica (OGA, 2003).

Os benzodiazepínicos ligam - se a componentes moleculares do receptor GABA_A, presente nas membranas neuronais do SNC. Esse receptor que atua como canal de íons de cloreto, é ativado pelo neurotransmissor inibitório GABA.

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC, estudos indicam que os benzodiazepínicos potenciam a neurotransmissão gabaérgica em todos os níveis do neuroeixo, incluindo a medula espinhal, hipotálamo, hipocampo, substância negra, córtex cerebelar e córtex cerebral. Os benzodiazepínicos parecem aumentar a eficiência da inibição sináptica gabaérgica, aumentando os efeitos do GABA sem ativação direta dos receptores GABA ou dos canais de cloro associados (KATZUNG, 2006).

- **Antagonista Benzodiazepínico - Flumazenil.**

O flumazenil é um dos derivados 1,4-benzodiazepínicos com alta afinidade pelo receptor de benzodiazepínicos e atua como antagonista benzodiazepínico competitivo, sendo o único atualmente disponível para o uso em clínica (FILE e ANDREWS, 1994). Flumazenil bloqueia a ação dos benzodiazepínicos, mas não antagoniza os efeitos de outros sedativo-hipnóticos, do etanol, dos opióides ou de anestésicos gerais sobre o SNC.

O flumazenil foi aprovado para uso na reversão dos efeitos depressores da superdosagem de benzodiazepínicos, bem como para acelerar a recuperação após o uso desses agentes em procedimentos anestésicos e diagnósticos (KATZUNG, 2006).

III – OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar, se a exposição aguda ao fipronil é capaz de provocar efeitos neurocomportamentais em ratos e se o neurotransmissor GABA seria importante nestes efeitos.

Objetivos Específicos

- 1- Avaliar a atividade neurocomportamental de ratos expostos agudamente ao fipronil utilizando a Arena de Campo Aberto;
- 2 - Avaliar a atividade neurocomportamental de ratos expostos agudamente ao fipronil utilizando o Labirinto em Cruz Elevado;
- 3 - Estudar a influência do agonista gabaérgico diazepam nos efeitos comportamentais do fipronil;
- 4 - Estudar a influência do antagonista benzodiazepínico flumazenil nos efeitos comportamentais do fipronil;

IV - MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais: para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados 120 ratos Wistar jovens (45-50 dias de idade), machos, fornecidos pelo Biotério Central da Unesp de Botucatu. Os animais foram mantidos no Biotério do Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX) sob condições padrão (temperatura controlada a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, luz 12x12 horas, umidade 70-80%, água e ração ad libitum) para aclimação e crescimento, até o momento de sua utilização nos experimentos. O projeto foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP de Botucatu.

2. Drogas utilizadas

⇒ Fipronil: Frontline[®] (Merial Saúde Animal Ltda – São Paulo, Brasil);

⇒ Diazepam: Dienpax[®] - ampolas medicamentosas contendo diazepam 10mg/2mL (Sanofi-Syntelabo).

⇒ Flumazenil (Roche Diagnostics GmbH – Rio de Janeiro, Brasil) – Lote BS9911SA01.

3. Procedimento Experimental

3.1. Experimento piloto: obtenção da dose de fipronil e o tempo esperado para o aparecimento de efeito a serem utilizados nos experimentos. Para encontrar a dose ideal para ser utilizada neste trabalho, realizou-se um experimento piloto baseando-se no trabalho de OHI et al. (2004), os quais utilizaram o fipronil nas doses de 70, 140 e 280 mg/kg e observaram que nestas doses o mesmo provocava efeitos reprodutivos adversos. Estas três doses foram testadas em grupos de 10 animais cada uma comparando-se com um grupo controle, também de 10 animais. A maior dose que causou efeito comportamental nos animais foi a de 280 mg/kg e esta foi a dose escolhida para ser utilizada nos experimentos.

Trinta animais foram divididos em 3 grupos (n=10) e foram testados os tempos de 1, 2 e 4 horas após a aplicação tópica do fipronil, para o aparecimento de efeito sobre o comportamento. Escolheu-se o tempo de 3,5 horas.

3.2. Grupos de tratamento (N=15): experimento para testar a influência do diazepam e do flumazenil sobre os efeitos comportamentais do fipronil:

- Controle (CT): os animais receberam apenas manipulação de forma idêntica aos tratados, administrando-se topicamente numa única vez sobre o seu dorso, apenas óleo de milho (0,3ml).

- Grupo fipronil (F): os animais receberam fipronil na dose de 280 mg/kg, aplicado topicamente, sobre o seu dorso (0,25 – 0,3ml)

- Grupo fipronil mais diazepam (F+DZ): os animais receberam fipronil na dose de 280 mg/kg, aplicado topicamente sobre o seu dorso. Após 3 horas da aplicação de fipronil, foi administrado diazepam, na dose de 5 mg/kg, por via intraperitoneal (ip).

- Grupo fipronil mais flumazenil (F+FZ): os animais receberam fipronil na dose de 280 mg/kg, aplicado topicamente, sobre o seu dorso. Após 3 horas da aplicação de fipronil foi administrado flumazenil, na dose de 4 mg/kg, por via intraperitoneal (ip).

Após 3 horas da aplicação do óleo de milho ou do fipronil e após 30 minutos da aplicação do diazepam ou do flumazenil, o comportamento dos animais de todos os grupos de tratamento foi avaliado em Arena de Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado.

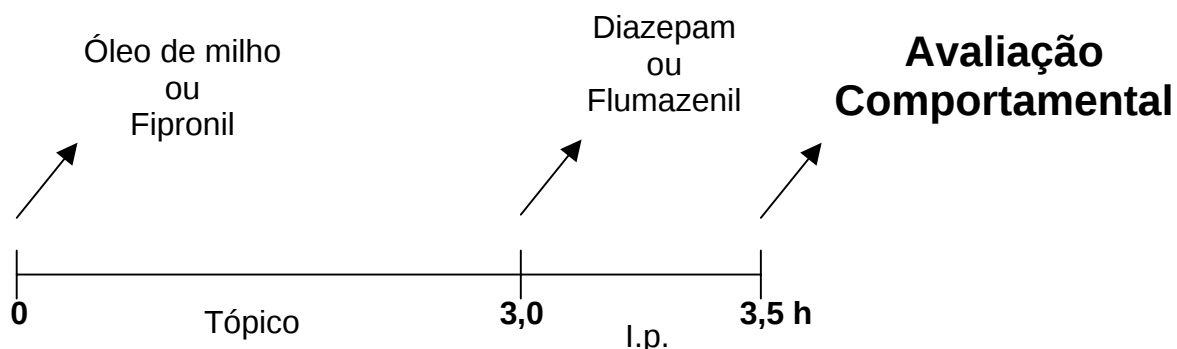


Figura 4 - Esquema do protocolo experimental para administração dos agentes químicos.

3.3. Avaliação Neurocomportamental

3.3.1. Arena de Campo Aberto: a atividade geral dos animais foi avaliada por meio de observação direta em arena de campo aberto, construída conforme especificações modificadas por Broadhurst (1960). Para as observações comportamentais, os animais foram colocados no centro da arena e, durante 3 minutos, foram registrados os parâmetros descritos a seguir:

Congelamento: tempo, em segundos, em que o animal permanece em imobilidade tônica, geralmente com o ventre rente ao chão, os olhos bem abertos e respiração irregular.

Limpeza: tempo, em segundos, em que o animal executa movimentos com as patas anteriores em direção aos pavilhões auriculares e/ou movimentos de lambeo dirigidos, principalmente, às porções laterais do corpo e região genital;

Locomoção: número de vezes em que o animal adentra com as quatro patas em uma das divisões da arena;

Levantar: número de vezes em que o animal se coloca sobre as patas traseiras, com o tronco perpendicular à arena, tendo a cabeça dirigida para cima e, tocando ou não com as patas anteriores, as paredes do campo aberto;

3.3.2. Labirinto em Cruz Elevado: este teste comportamental foi descrito por Pellow e Chopin (1985), e convalidado por Pellow e File (1986), para o estudo de drogas ansiolíticas e ansiogênicas em ratos. Este teste fundamenta-se na aversão dos roedores a 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. Os animais foram colocados no espaço central do labirinto com a cabeça voltada para o espaço aberto e serão registrados o número de vezes e o tempo em segundos em que o animal entra e permanece nos braços abertos e fechados, a cada minuto, durante 5 minutos.

O índice de ansiedade corresponde à razão entre o número de entradas nos braços abertos e o número total de entradas. Este índice é diretamente proporcional ao efeito ansiolítico do animal (PELLOW e CHOPIN, 1985).

Ao final de cada sessão, na arena e no labirinto, os aparelhos foram limpos com álcool etílico 5%, v/v para disfarçar o cheiro do animal anterior.

4. Análise Estatística dos Resultados

Os resultados experimentais obtidos em cada grupo de tratamento foram comparados estatisticamente por meio do programa INSTAT 3.0 (GraphPad Software) utilizando-se análise de variância (ANOVA) complementada, *a posteriori*, com o teste de Tukey-Kramer sempre que encontrado $p < 0,05$ (SNEDECOR e COCHRAN, 1980). Os grupos controle e fipronil foram comparados, em separado, com fipronil mais diazepam ou fipronil mais flumazenil.

Os resultados dos grupos F+DZ e F+FZ não foram comparados entre si.

V – RESULTADOS

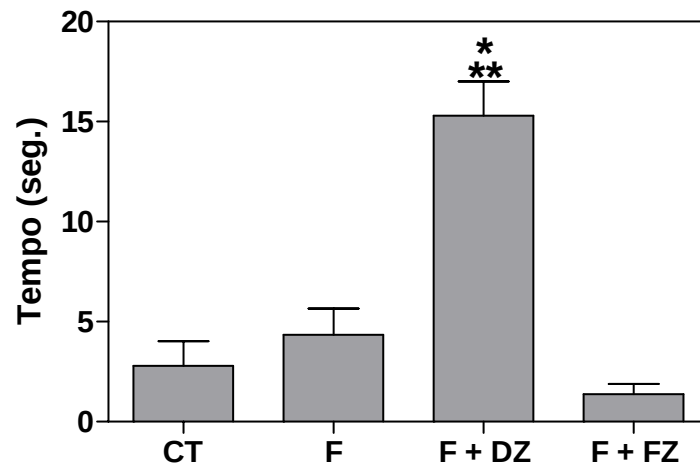
A tabela 1 e os gráficos de 1 a 4, contêm os resultados da avaliação comportamental realizada em Arena e Campo Aberto.

Tabela 1 – Resultados da avaliação comportamental realizada em Arena de Campo Aberto em animais controle e recebendo fipronil, fipronil mais diazepam e fipronil mais flumazenil.

Comportamento	Grupos Experimentais			
	Controle	Fipronil	Fipronil + Diazepam	Fipronil + Flumazenil
Congelamento (s)	2,79 ±1,24	4,34 ±1,31	15,29 * ±1,72 **	1,37 ±0,52
Limpeza (s)	6,69 ±0,60	13,06 * ±3,14	0,53 * ±0,09 **	21,74 * ±2,34 **
Locomoção (nº.)	52,15 ±2,47	49,50 ±3,16	28,16 * ±5,91 **	48,10 ±3,54
Levantar (nº.)	1,62 ±0,31	7,07 * ±0,74	3,20 ** ±0,84	12,27 * ±0,82 **

Os valores representam a Média ± Erro Padrão da Média. *p<0,05 do Controle
**p<0,05 do Fipronil (Tukey-Kramer).

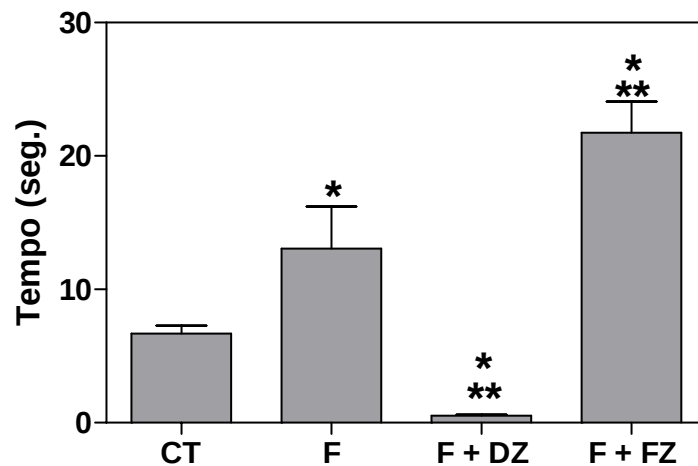
Gráfico 1 - Comportamento de congelamento em ratos controles agudamente ao fipronil, fipronil mais diazepam e fipronil mais flumazenil (N=15).



Os valores representam a Média $\pm$ Erro Padrão da Média. CT = Controle F = Fipronil DZ = Diazepam FZ = Flumazenil * $p < 0,05$ do Controle ** $p < 0,05$ do Fipronil (Tukey-Kramer).

No gráfico 1, observa-se que administração de fipronil provocou um aumento (55%), estatisticamente não significante, no comportamento de congelamento dos animais em relação ao controle. Administração de fipronil mais diazepam provocou um aumento estatisticamente significante do comportamento de congelamento, em relação ao controle e em relação ao fipronil. A administração de fipronil mais flumazenil provocou uma diminuição estatisticamente não significante do comportamento de congelamento, em relação ao controle (51%) e ao fipronil (68%).

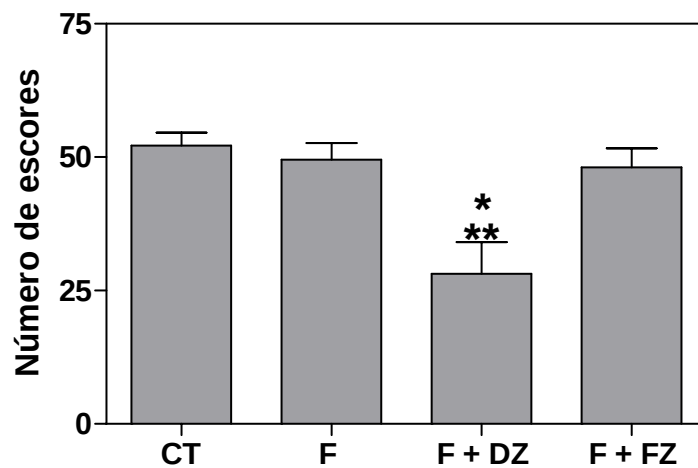
Gráfico 2 - Comportamento de limpeza em ratos controles e expostos agudamente ao fipronil, ao fipronil mais diazepam e ao fipronil mais flumazenil (N=15).



Os valores representam a Média $\pm$ Erro Padrão da Média. CT = Controle F = Fipronil DZ = Diazepam FZ = Flumazenil * $p < 0,05$ do Controle ** $p < 0,05$ do Fipronil (Tukey-Kramer).

No gráfico 2, observa-se que administração de fipronil provocou um aumento, estatisticamente significativo, no comportamento de limpeza dos animais em relação ao controle. Administração de fipronil mais diazepam provocou uma diminuição estatisticamente significativa, no comportamento de limpeza dos animais em relação ao controle e em relação ao fipronil. A administração de fipronil mais flumazenil provocou um aumento estatisticamente significativo do comportamento de limpeza em relação ao controle e ao fipronil.

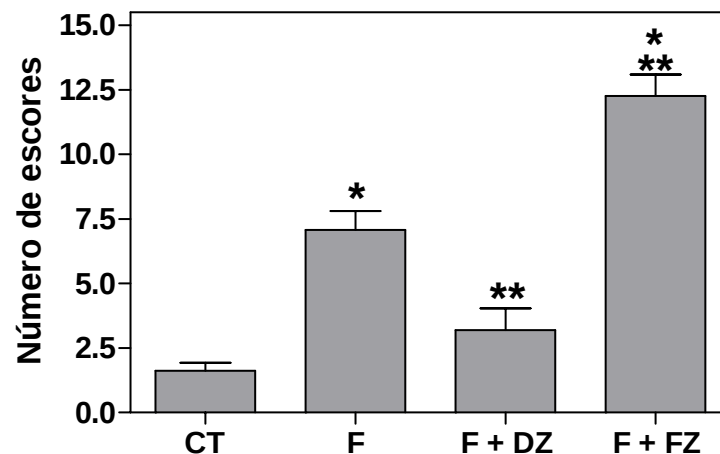
Gráfico 3 - Comportamento de locomoção em ratos controles e expostos agudamente ao fipronil, ao fipronil mais diazepam e ao fipronil mais flumazenil (N=15).



Os valores representam a Média $\pm$ Erro Padrão da Média. CT = Controle F = Fipronil DZ = Diazepam FZ = Flumazenil * $p < 0,05$ do Controle ** $p < 0,05$ do Fipronil (Tukey-Kramer).

No gráfico 3, observa-se que administração de fipronil não modificou o comportamento de locomoção dos animais em relação ao controle. Administração de fipronil mais diazepam provocou uma diminuição estatisticamente significativa, no comportamento de locomoção dos animais em relação ao controle e em relação ao fipronil. A administração de fipronil mais flumazenil não modificou o comportamento de locomoção dos animais em relação ao controle e ao fipronil.

Gráfico 4 - Comportamento de levantar em ratos controles e expostos agudamente ao fipronil, ao fipronil mais diazepam e ao fipronil mais flumazenil (N=15).



Os valores representam a Média $\pm$ Erro Padrão da Média. CT = Controle F = Fipronil DZ = Diazepam FZ = Flumazenil * $p < 0,05$ do Controle ** $p < 0,05$ do Fipronil (Tukey-Kramer).

No gráfico 4, observa-se que administração de fipronil provocou um aumento, estatisticamente significativo, no comportamento de levantar dos animais em relação ao controle. Administração de fipronil mais diazepam provocou um aumento (98%), estatisticamente não significativo, no comportamento de levantar dos animais em relação ao controle. Administração de fipronil mais diazepam provocou uma diminuição, estatisticamente significativa, no comportamento de levantar dos animais em relação ao fipronil. A administração de fipronil mais flumazenil provocou um aumento estatisticamente significativo do comportamento de locomoção em relação ao controle e em relação ao fipronil.

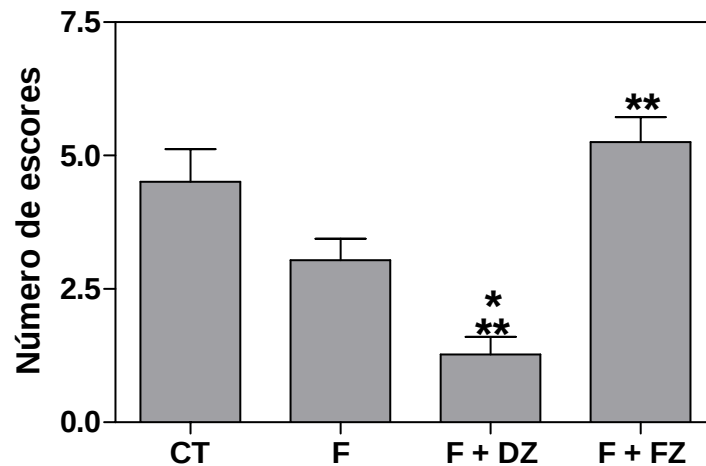
A tabela 2 e os gráficos de 5 a 8, contêm os resultados da avaliação comportamental realizada no Labirinto em Cruz Elevado.

Tabela 2 – Resultados da avaliação comportamental realizada no Labirinto em Cruz Elevado em animais controle e recebendo fipronil, fipronil mais diazepam e fipronil mais flumazenil.

Comportamento	Grupos Experimentais			
	Controle	Fipronil	Fipronil + Diazepam	Fipronil + Flumazenil
Número de entradas nos braços abertos	4,51 ±0,61	3,04 ±0,40	1,27 * ±0,33 **	5,25 ** ±0,47
Número de entradas nos braços fechados	7,76 ±0,73	6,52 ±0,62	1,80 * ±0,50 **	8,27 ±0,72
Tempo de permanência nos braços abertos	40,46 ±8,48	44,20 ±7,90	124,61 * ±32,19 **	27,21 ±3,25
Tempo de permanência nos braços fechados	177,63 ±11,64	191,15 ±15,84	110,73 ** ±22,29	241,12 ±23,74

Os valores representam a Média ± Erro Padrão da Média. *p<0,05 do Controle
**p<0,05 do Fipronil (Tukey-Kramer).

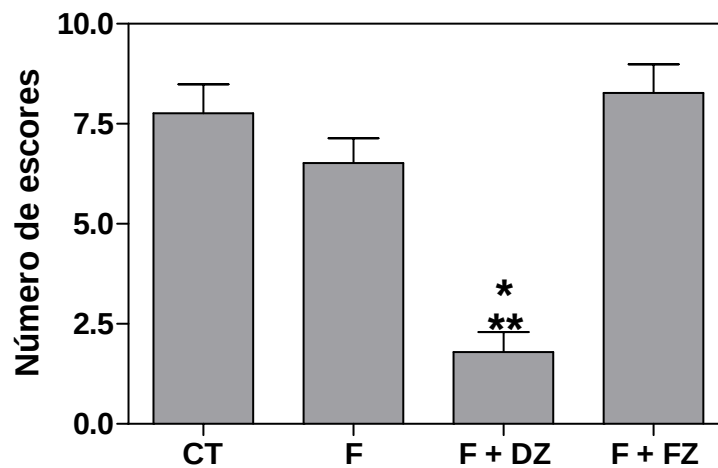
Gráfico 5 - Comportamento da entrada nos braços abertos em ratos controles e expostos agudamente ao fipronil, ao fipronil mais diazepam e ao fipronil mais flumazenil (N=15).



Os valores representam a Média $\pm$ Erro Padrão da Média. CT = Controle F = Fipronil DZ = Diazepam FZ = Flumazenil * $p < 0,05$ do Controle ** $p < 0,05$ do Fipronil (Tukey-Kramer).

No gráfico 5, observa-se que administração de fipronil provocou uma diminuição (33%), estatisticamente não significante, no comportamento de entrada nos braços abertos dos animais em relação ao controle. Administração de fipronil mais diazepam provocou uma diminuição estatisticamente significante, no comportamento de entrada nos braços abertos dos animais em relação ao controle e em relação ao fipronil. A administração de fipronil mais flumazenil provocou um aumento no comportamento de entrada nos braços abertos, estatisticamente não significante, em relação ao controle (16%) e um aumento, estatisticamente significante, no comportamento de entrada nos braços abertos em relação ao fipronil.

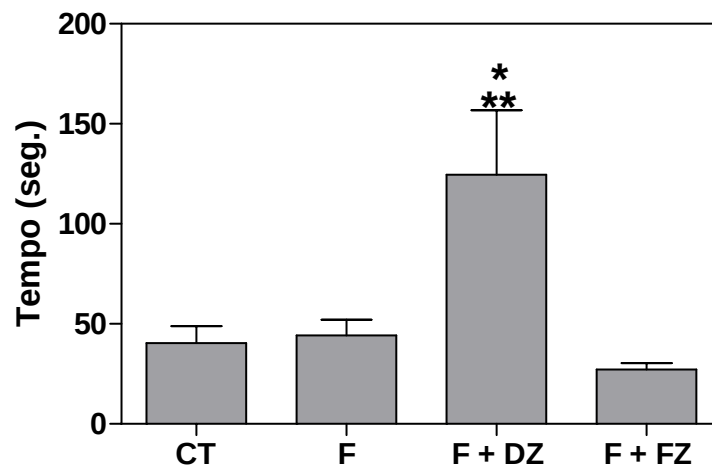
Gráfico 6 - Comportamento da entrada nos braços fechados em ratos controles e expostos agudamente ao fipronil, ao fipronil mais diazepam e ao fipronil mais flumazenil (N=15).



Os valores representam a Média $\pm$ Erro Padrão da Média. CT = Controle F = Fipronil DZ = Diazepam FZ = Flumazenil * $p < 0,05$ do Controle ** $p < 0,05$ do Fipronil (Tukey-Kramer).

No gráfico 6, observa-se que administração de fipronil provocou uma diminuição (16%), estatisticamente não significativa, no comportamento de entrada nos braços fechados em relação ao controle. Administração de fipronil mais diazepam provocou uma diminuição, estatisticamente significativa, no comportamento de entrada nos braços fechados em relação ao controle e em relação ao fipronil. A administração de fipronil mais flumazenil provocou um aumento (27%), estatisticamente não significativa, comportamento de entrada nos braços fechados em relação ao fipronil.

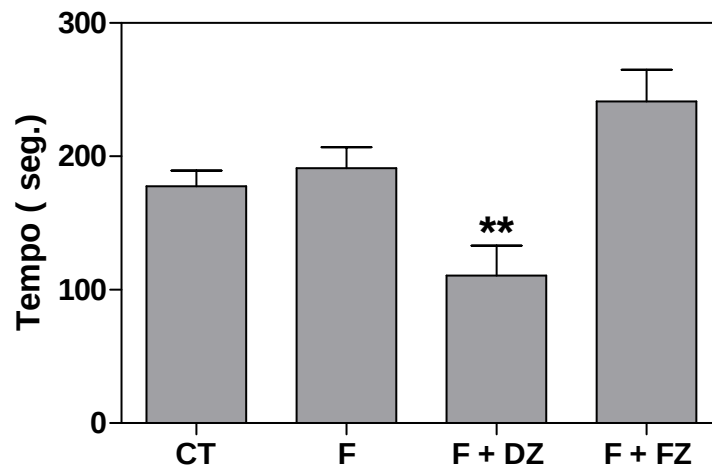
Gráfico 7 – Tempo de permanência nos braços abertos em ratos controles e expostos agudamente ao fipronil, ao fipronil mais diazepam e ao fipronil mais flumazenil (N=15).



Os valores representam a Média $\pm$ Erro Padrão da Média. CT = Controle F = Fipronil DZ = Diazepam FZ = Flumazenil * $p < 0,05$ do Controle ** $p < 0,05$ do Fipronil (Tukey-Kramer).

No gráfico 7, observa-se que administração de fipronil não modificou o tempo de permanência nos braços abertos em relação ao controle. Administração de fipronil mais diazepam provocou um aumento, estatisticamente significativo, no tempo de permanência nos braços abertos em relação ao controle e em relação ao fipronil. A administração de fipronil mais flumazenil provocou uma diminuição, estatisticamente não significativa, no tempo de permanência nos braços fechados em relação ao controle (33%) e em relação ao fipronil (38%).

Gráfico 8 – Tempo de permanência nos braços fechados em ratos controles e expostos agudamente ao fipronil, ao fipronil mais diazepam e ao fipronil mais flumazenil (N=15).



Os valores representam a Média $\pm$ Erro Padrão da Média. CT = Controle F = Fipronil DZ = Diazepam FZ = Flumazenil ** $p < 0,05$ do Fipronil (Tukey-Kramer).

No gráfico 8, observa-se que administração de fipronil não modificou o tempo de permanência nos braços fechados em relação ao controle. Administração de fipronil mais diazepam provocou uma diminuição, estatisticamente não significativa, no tempo de permanência nos braços fechados em relação ao controle (38%) e uma diminuição estatisticamente significativa em relação ao fipronil. A administração de fipronil mais flumazenil provocou um aumento, estatisticamente não significativo, no tempo de permanência nos braços fechados em relação ao controle (36%) e em relação ao fipronil (26%).

VI - DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que ratos Wistar expostos agudamente ao fipronil têm alterações comportamentais e que estas alterações podem, em parte, ser mediadas pelo GABA.

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

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 agora reconhecida como um indicador padrão de toxicidade em humanos e animais, expostos aguda e cronicamente a baixas concentrações de agentes químicos considerados por terem potencial neurotóxico (CLÁUDIO et al., 2000; WORMLEY et al., 2004).

Nos experimentos desenvolvidos neste trabalho, utilizando a atividade neurocomportamental para avaliar neurotoxicidade, observaram-se efeitos importantes de interação nos animais expostos ao fipronil e diazepam bem como fipronil e flumazenil.

O teste de campo aberto é considerado como um indicador do estado emocional do animal (ARCHER, 1973) e é comumente utilizado para triagem farmacológica de drogas que atuam sobre o sistema nervoso central (EIDMAN et al., 1990). Neste teste, os comportamentos de locomoção e de levantar são considerados, respectivamente, como medidas das atividades locomotora e exploratória, enquanto que os de limpeza e de congelamento são positivamente correlacionados com medo ou emocionalidade (HENDERSON, 1970; ARCHER, 1973; EIDMAN et al., 1990; BARROS et al., 1994; BHATTACHARYA, 1994).

No presente experimento, as alterações observadas nos animais recebendo fipronil foram: aumento dos comportamentos de congelamento, limpeza e levantar. Se por um lado apenas o comportamento de levantar foi

estatisticamente significativa, por outro lado, não se pode desprezar a significância biológica do percentual de aumento dos comportamentos de congelamento e limpeza (55% e 95% respectivamente). Assim, pode-se sugerir que o fipronil aumenta a emocionalidade e a atividade exploratória dos animais sem modificar sua atividade locomotora. Esses resultados contradizem os resultados de Archer (1973) sugerindo que emocionalidade aumentada poderia inibir exploração.

O teste do labirinto em cruz elevado é considerado um indicador do estado de ansiedade do animal (PELLOW e FILE, 1986) e um número maior de entradas nos braços fechados juntamente com um tempo maior de permanência nos mesmos refletem um grau de ansiedade elevado nos animais. Nos experimentos o fipronil diminuiu de forma não significativa as entradas nos braços abertos e fechados do labirinto, sem mudar o tempo de permanência em ambos. Isto sugere que o praguicida não influenciou o estado de ansiedade dos animais. Por outro lado, a relação de entradas fechado/aberto, foi maior nos animais recebendo o fipronil ($Ct=1,72$; $F=2,14$). Isto parece confirmar a maior atividade exploratória observada na arena de campo aberto nos animais recebendo o fipronil.

O diazepam, um fármaco anticonvulsivante do grupo dos benzodiazepínicos, tem sido utilizado para estudar os efeitos neurotóxicos de substâncias que exercem ação inibitória sobre o complexo canal ionóforo cloro-receptor $GABA_A$ ligando-se na interface proteína lipídeo da membrana do receptor, levando como consequência, a efeitos estimulantes do sistema nervoso central e convulsões (GAMMOM et al., 1981; VALENTINE, 1990). Como o diazepam exerce uma ação estimulante sobre a transmissão gabaérgica (MOREIRA et al., 2000) e o fipronil bloqueia o GABA (HAINZL e CASIDA, 1996; OZOE et al., 2000; TANG et al., 2004), nossa suposição era a de que nos animais experimentais o diazepam fosse capaz de antagonizar os efeitos comportamentais do fipronil, se realmente o GABA estivesse envolvido no mecanismo de ação de toxicidade neurocomportamental do praguicida. Seguindo esta linha de raciocínio, a ação antagonista do diazepam, no presente experimento, pôde ser observada nos comportamentos de limpeza, levantar e na permanência nos braços fechados.

Considerando que ansiedade pode ser encarada como um componente do estado emocional (CRAIG et al., 1995), o efeito do diazepam sobre a alteração da ansiedade observada na permanência dos animais no braço fechado do labirinto é consistente com as interações do benzodiazepínico sobre a emocionalidade dos animais recebendo fipronil, detectada no teste da arena de campo aberto, por meio dos comportamentos de limpeza e levantar e reforça a sugestão do envolvimento do GABA nos efeitos neurocomportamentais do fipronil.

Do mesmo modo, o flumazenil, um antagonista do GABA (HALL et al., 2004), também tem sido utilizado para estudar a ação de drogas sobre a transmissão gabaérgica. Utilizando o flumazenil, esperava-se que, ao contrário do que foi observado anteriormente com o diazepam, nos animais experimentais o flumazenil fosse capaz de intensificar os efeitos do fipronil, se realmente o GABA estivesse envolvido no seu mecanismo de ação neurotóxica. A ação intensificadora do flumazenil sobre efeitos do fipronil pôde ser observada nos comportamentos de limpeza, levantar e na permanência nos braços fechados. Isto confirma o que foi observado com o diazepam e também reforça a sugestão do envolvimento do GABA nos efeitos neurocomportamentais do fipronil.

Não existem dados de literatura sobre influência do diazepam ou flumazenil na ação neurocomportamental de agentes químicos do grupo dos fenilpirazóis, do qual o fipronil é integrante. Este fato dificulta a comparação dos presentes resultados com os de outros autores, porém, valoriza e atribui a este estudo um caráter inédito.

Observando as ações do diazepam e do flumazenil sobre os comportamentos de congelamento, na arena de campo aberto, e entradas nos braços abertos e fechados, no labirinto em cruz elevado, pôde-se notar que ocorreu o inverso do que se esperaria, quando diazepam e/ou flumazenil foram administrados conjuntamente com o fipronil, ou seja, o diazepam parece ter potenciado enquanto o flumazenil parece ter antagonizado o fipronil. Isto poderia sugerir talvez uma mediação diferente daquela exercida pelo GABA nas alterações observadas. Será que, à semelhança de outros pesticidas como, por exemplo, os inseticidas organoclorados, o fipronil poderia estar

modificando a extrusão do cálcio celular neuronal interferindo com a enzima de membrana celular, ATPase $\text{Ca}^{+}\text{Mg}^{+}$ -dependente?

VII – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho de pesquisa nos permitem concluir que:

- Exposição aguda ao fipronil na dose de 280mg/kg, promove alterações neurocomportamentais em ratos;
- As alterações neurocomportamentais envolvem componentes principalmente de medo, emocionalidade e atividade exploratória dos animais;
- O diazepam e o flumazenil influenciam determinados comportamentos alterados pelo fipronil;
- O GABA pode estar envolvido nos efeitos comportamentais do fipronil;
- Não se exclui outro mecanismo de ação envolvido nos efeitos comportamentais do fipronil.

VIII – BIBLIOGRAFIA *

- ACP. **Evaluation of fipronil use as a public hygiene insecticide.** Advisory Committee on Pesticides. Food and Environmental Protection Act 1985, part III. York: Pesticides Safety Directorate, MAFF, 1999.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim. Behav.**, v.21, p.205-235, 1973.
- BARROS, H.M.T.; TANNHAUSER, S.L.; TANNHAUSER, M.A.L.; TANNHAUSER, M. The effects of GABAergic drugs on grooming behavior in the open field. **Pharmacol. Toxicol.**, v.74, p.339-344, 1994.
- BEKKEDAL, M.; ROSSI, J.; PANKSEPP, J. Fetal and neonatal exposure to trimethylolpropane phosphate alters rat social behavior and emotional responsivity. **Neurotoxicol. Teratol.**, v.21, p.435-443, 1999.
- BELAYNEH, Y.T. **Amendment III to the USAID/Madagascar supplemental environmental assessment for locust control program: options for including fipronil as an anti-locust insecticide.** Washington: United States Agency for International Development (USAID), 1998.
- BHATTACHARYA, S.K. Behavioural studies on BR-16A (Mental ®), a herbal psychotropic formulation. **Indian J. Exp. Biol.**, v.32, p.37-43, 1994.
- BOBÉ, A.; COOPER, J.; COSTE, C.M.; MULLER, M-A. Behaviour of fipronil in soil under Sahelian plain field conditions. **Pestic. Sci.**, v.52, p.275-281, 1998.
- BROADHURST, P.L. Experiments in psychogenetics. In: EYSENK, H.J. **Experiments in personality.** London: Rutledge and Keagan Paul, 1960, p. 31-61.
- CASTRO, V.; SILVEIRA, M.; PEREZ, M. Application of clinical indicators of exposition in the evaluation of agriculture health: the Sumaré case – Brazil. **Int. J. Sustain. Dev. World Ecol.**, v.6, p.172-184, 1999.
- CASTRO, V.L.S.S. Aspectos da Exposição Ambiental aos Agroquímicos no Desenvolvimento Animal. **Cad. Ciênc. Tecnol.**, v.21, n.3, p.469-497, 2004.

- CHELONIS, J.; FLAKE, R.; BALDWIN, R.; BLAKE, B.; PAULE, M.
Developmental aspects of timing behavior in children. **Neurotoxicol. Teratol.**, v.26, p.461-476, 2004.
- CHODOROWSKI, Z.; ANAND, J.S. Accidental dermal and inhalation exposure with fipronil- a case report. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v.42, n.2, p.189-190, 2004.
- CLAUDIO, I.; KWA, W.C.; RUSSEL, A.L.; WALLINGA, D. Testing methods for developmental neurotoxicity of environmental chemicals. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.164, p.1-14, 2000.
- CLAUDIO, L.; BEARER, C.F.; WALLINGA, D. Assessment of the U.S.Environmental Protection Agency methods for identification of razards to developing organisms, part I: The reproduction and fertility testing guidelines. **Am. J. Ind. Med.**, v.35, p.543-553, 1999.
- COSTA, L.; ASCHER, M.; VITALONE, A.; SYVERSEN, T.; SOLDIN, O.
Developmental neuropathology of environmental agents. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.44, p.87-110, 2004.
- COSTOLI, T.; SGOIFO, A.; STILLI, D.; FLUGGE, G.; ADRIANI, W.; LAVIOLA, G.; FUCHS, E.; PEDRAZZINI, T.; MUSSO, E. Behavioural, neural and cardiovascular adaptations in mice lacking the NPY1 receptor. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.29, p.113-123, 2005.
- CRAIG, K.J.; BROWN, K.J.; BAUM, A. Environmental factors in the etiology of anxiety. In: BLOOM, R.E.; KUPFER, D.J. (Eds). **Psycopharmacology**. New York: Raven Press, 1995. p.1325-1339.
- DAM, K.; SEIDLER, F.J.; SLOTKIN, T.A. Chlorpyrifos exposure during a critical neonatal period elicits gender-seletive deficits in the development of coordination skills and locomotor activity. **Dev. Brain Res.**, v.121, p.179-187, 2000.
- DAS, P.C.; CAO, Y.; CHERRINGTON, N.; HODGSON, E.; ROSE, R.L. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in humam hepatocytes. **Chem. Biol. Interact.**, v.164, p.200-214, 2006.

- DESPRÉS, C.; RICHER, F.; ROBERGE, M.C.; LAMOUREX, D.; BEUTER, A.
Standardization of quantitative tests for preclinical detection of neuromotor dysfunctions in pediatric neurotoxicology. **Neurotoxicology**, v.26, n.3, p.385-395, 2005.
- DOURSON, M.; CHARNLEY, G.; SCHEUPLEIN, R. Differential Sensitivity of Children and Adults to Chemical Toxicity II. Risk and Regulation. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v.35, p.448-467, 2002.
- EIDMAN, D.S.; BENEDITO, M.A.C.; LEITE, J.R. Daily changes in pentylenetetrazol-induced convulsions and open-field behavior in rats. **Physiol. Behav.**, v.47, p.853-856, 1990.
- FAO. Pesticide residues in food. In: Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues on Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues, 1998, Lyon. **Reported** Rome: FAO, 1998. (FAO Plant Production and Protection Paper, 145).
- FILE, S.E.; ANDREWS, N. F2692: Flumazenil-reversible anxiolytic effects but inactive on [³H]-Ro 15-4513 binding. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.48, p.223-227, 1994.
- FUNG, H.T.; CHAN, K.K.; CHING, W.M.; KAM, C.W. A case of accidental ingestion of ant bait containing fipronil. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v.41, n.3, p.245-248, 2003.
- GAMMON, D.W.; LAWRENCE, L.J.; CASIDA, J.E. Two of classes of Pyrethroid action in the cockroach. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v.15, p. 181-191, 1981.
- GRANT, D.B.; BLOOMQUIST, J.R.; AYAD, H.H.; CHALMERS, A.E. A comparison of mammalian and insect GABA receptor chloride channels. **Pestic. Sci.**, v.30, p.355-356, 1990.
- GRANT, D.B.; CHALMERS, A.E.; WOLFF, M.A. Fipronil: action at the GABA receptor. **Rev. Toxicol.**, v.2, p.147-156, 1998.
- GREENLEE, A.; ELLIS, T.; BERG, R. Low-dose agrochemicals and lawn-care pesticides induce developmental toxicity in murine preimplantation embryos. **Environ. Health Perspect.**, v.112, p.703-709, 2004.

- HAINZL, D.; CASIDA, J.E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.93, p.12746-12767, 1996.
- HAINZL, D.; COLE, L.M.; CASIDA, J.E. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfanyl photoproduct. **Chem. Res. Toxicol.**, v.11, p.1529-1535, 1998.
- HALL, B.J.; CHEBIB, M.; HANRAHAN, J.R.; JOHNSTON, G.A.R. Flumazenil-independent positive modulation of γ -aminobutyric acid action by 6-methylflavone at human recombinant $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ and $\alpha_1\beta_2$ GABA_A receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v.491, p.1-8, 2004.
- HENDERSON, N.D. Behavioral reactions of Wistar rats to conditioned fear stimuli novelty and noxious stimulation. **J. Psychol.**, v.75, p.19-34, 1970.
- HUGNET, C.; CADORE, J.L.; BOURDOISEAU, G. Use of fipronil spray (0,25%) for the treatment of *Damalinia equi* (*Wereckiella equi*) infestation. **Prat. Vet. Equine**, v.31, p.65-68, 1999.
- JENNINGS, K.A.; KELLER, R.J.; ATIEH, B.H.; DOSS, R.B.; GUPTA, R.C. Human exposure to fipronil from dogs treated with Frontline. **Vet. Hum. Toxicol.**, v.44, p. 303-303, 2002.
- KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clinica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 991p.
- KIMMEL, C. Currents approaches to risk assessment for developmental neurotoxicology In: SLIKKER, W.; CHANG, L. (Ed.). **Handbook of developmental neurotoxicology**. San Diego: Academic Press, 1998. p.675-685.
- LATCHININSKY, A.V. Discontinuous applications of fipronil against acridids in Rússia: do barriers work? **Adv. Appl. Acridol.**, v.1, p.5-9, 2000.
- 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.**, v.22, n.11, p.573-580, 2001.

- MONOGRAFIA BASF S/A. Monografia para registro técnico do produto formulado Regent 800 WG no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agro.basf.com.br> Acesso em: abr. 2005.
- MOREIRA, E.G.; NASCIMENTO, N.; ROGÉRIO, J.R.; VASSILIEFF, V.S. Gabaergic-Benzodiazepine system is involved in the crotoxin-induced anxiogenic effect. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.65, n.1, p.7-13, 2000.
- OHI, M.; DALSENTER, P.R.; ANDRADE, A.J.M.; NASCIMENTO, A.J. Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. **Toxicol. Lett.**, v.146, n.2, p.121-127, 2004.
- OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003.
- OZOE, Y.; YAGI, K.; NAKAMURA, M.; AKAMATSU, M.; MIYAKE, T.; MATSUMURA, F. Fipronil-related heterocyclic compounds: structure-activity relationship for interaction with γ -aminobutyric acid- and voltage-gated ion channels and insecticide action. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 66, n.2, p.92-104, 2000.
- PEI, Z.; YITONG, L.; BAOFENG, L.; GAN, J.J. Dynamics of fipronil residue in vegetable-field ecosystem. **Chemosphere**, v.57, p.1691-1969, 2004.
- PELLOW, S.; CHOPIN, M. The effect os putative anxiogenic compounds (FG 7142, CGS 8216 and Ro 15-1788) on the rat corticosterone response. **Physiol. Behav.**, v.35, p. 587-590, 1985.
- PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory acitivity in an elevated plus maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 24, p.525-529, 1986.
- PENALIGGON, J. Getting to grips with fleas on pet dogs and cats. **Pestic. Outl.**, v.8, p.19-23, 1997.
- POHL, H.; SMITH-SIMON, C.; HICKS, H. Health effects classification and its role in the derivation of minimal risk levels: developmental effects. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 28, p.55-60, 1998.
- POSTAL, J.M.R.; JEANIN, P.C.; CONSALVI, P.J. Field efficacy of a mechanical pump spray formulation containing 0,25% fipronil in the treatment and control of flea infestations and associated dermatological signs in dogs and cats. **Vet. Dermatol.**, v.6, p.153-158, 1995.

- RHÔNE-POULENC. Atelier International Fipronil/lutte antiacridienne. Lyon: Rhône-Poulenc Agrochimie, 1995.
- ROSE, R.L.; HODGSON, E.; ROE, R.M. Pesticides. In: MARQUARDT, H.; SCHAFER, S.G.; MCCLELLAN, R.; WELSCH, F. (Eds.). **Toxicology**. San Diego : Academic Press, 1999. p. 663-697.
- RUST, M.K. Advances in the control of *Ctenocephalides felis* (cat flea) on cats and dogs. **Trends Parasitol.**, v.21, n.5, 2005.
- SARTER, M. Animal cognition: defining the issues. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.28, p.645-650, 2004.
- SCHARF, M.E.; SIEGFRIED, B.D. Toxicity and neurophysiological effects of fipronil and fipronil sulfone on the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Arch. Insect Biochem.**, v.40, p.150-156, 1999.
- SIMPSON, E.; DAVIS, S. Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis – some new perspectives. **Endocrinology**, v.142, p.589-4594, 2001.
- SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. **Statistical methods**. 7. ed. Ames: State Univerty Press, 1980. p.593.
- SZEGEDI, V.; BÁRDOS,G.; DÉTÁRI, L.; TÓTH, A.; BANCZEROWSKI-PELYHE, I.; VILAGI, I. Transient alterations in neuronal and behavioral activity following bensultap and fipronil treatment in rats. **Toxicology**, v.214. p.67-76, 2005.
- TANG, J.; USMANI, K.A.; HODGSON, E.; ROSE, R.L. In vitro metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam. **Chem. Biol. Interact.**, v.147, n.3, p.319-329, 2004.
- TINGLE, C.C.D.; ROTHER, J.A.; DEWHURST, C.F.; LAUER, S.; KING, W.J. Fipronil: Environmental Fate, Ecotoxicology, and Humam Health Concerns. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v.176, p.1-66, 2003.
- U.S. EPA. Fipronil pesticide fact sheet. EPA 737-F-96-005. Washington: U.S.Environmental Protection Agency, 1996. 7p. Avaiaile from: <http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/199ay-12/pr-736DIR/Facts>

- 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. Washington: Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, USEPA, 1998.
- U.S.EPA. Environmental Fate of Fipronil. Washington: U.S.EPA Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, 2001. 17p. Available from: <http://www.pw.ucr.edu/textfiles/fipronil.pdf>
- VALENTINE, W.N. Pyrethrine and pyrethroid insecticides. **Vet. Clin. North. Am. Small Anim.**, v.20, p.375-382, 1990.
- VOGEL, G.; HAGLER, M. Effects of neonatally administered inpridole on adult behaviors of rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.55, p.155-161, 1996.
- WILDE, G.E.; WHIWORTH, R.J.; CLAASSEN, M.; SHUFRAN, R.A. Seed treatment for control of wheat insects and its effect on yield. **J. Agric. Urban Entomol.**, v.18, p.1-11, 2001.
- WORMLEY, D.D.; RAMESH, A.; HOOD, D.B. Environmental contaminant-mixture effects on CNS development, plasticity, and behavior. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.197, p.49-65, 2004.
- ZIMMERMANN, A.; STAUFFACHER, M.; LANGHANS, W.; WÜRBEL, H. Enrichment-dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. **Behav. Brain Res.**, v.121, p.11-20, 2001.

TRABALHO CIENTÍFICO

IX - Trabalho científico

Manuscrito enviado para publicação, de acordo com as normas da revista Toxicology Letters.

Title

INFLUENCE OF DIAZEPAM AND FLUMAZENIL ON OPEN-FIELD AND ELEVATED PLUS MAZE BEHAVIORS IN RATS EXPOSED TO FIPRONIL.

Terçariol, P.R. G. and Godinho, A.F.*

Sao Paulo State University (UNESP of Botucatu), Toxicological Assistance Center (CEATOX), Biosciences Institute, Sao Paulo, Brazil.

*Corresponding author. E-mail: godinho@ibb.unesp.br

Abstract

The present study investigates diazepam and flumazenil influence on neurobehavioral effects of exposition to pesticide fipronil (Frontline[®] Top Spot) in young rats. The pesticide was topically applied (single dose) to rats receiving concurrent diazepam or flumazenil administration. Fipronil exposed rats in the open-field (OF) tests showed increased freezing, grooming, and rearing while elevated plus maze (EPM) tests showed none significant alterations although seems that fipronil decrease entry in both open and closed arms. In OF, diazepam intensified fipronil effect on freezing and antagonized on grooming and rearing while flumazenil antagonized fipronil effect on freezing and intensified fipronil effect on grooming and rearing. In EPM, diazepam intensified fipronil effect on entry in both open and closed arms while flumazenil antagonize this effect. Our studies suggest that fipronil exposition induces behavioral alterations in young rats correlated with fear; emotionality and exploratory behavior without modify locomotor activity of animals or anxiety status. The fact of diazepam and flumazenil influence these alterations suggests GABA mediation on observed fipronil effects but other mechanism of fipronil neurotoxicity is not discarded.

Key Words

Fipronil, GABA, diazepam, flumazenil, behavior.

1. Introduction

In recent years there is great concern that pesticides and other chemicals substances may modify the normal functioning of human and wildlife endocrine system. These hormonally active agents (endocrine disruptor chemicals) may cause a variety of adverse health effects including developmental, reproductive and behavioral hazards (Carlos et al., 2004). It has long known that exposure to pesticides can induce neurotoxicity in rodents, as well as in others species including humans (Ecobichon, 2001).

Fipronil (5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl] –4-(1,R,S)-[(trifluoromethyl)sulfinyl]-1-H-pyrazole-3-carbonitrile) is a highly active, broad spectrum pesticide from the phenyl pyrazole family, which targets the gamma-amino butyric acid (GABA) receptor (Hosie et al., 1995; Moffat, 1993; Ratra et al., 2001)

Agriculturally, fipronil has been used on pests of a wide variety of food crops (Ngim and Crosby, 2001; Scharf and Siegfried, 1999; Wilde et al., 2001). In non-agricultural applications this pesticide is used to control veterinary pests (Jennings et al., 2002) and has also been designated by EPA as one of alternatives to the organophosphates (OP) for termite and fire ant control. Concerns for fipronil effects on public health have been raised because of the wide range of uses in both, commercially and in home applications of these pesticides (Jennings et al., 2002; Tingle et al., 2003).

Fipronil is much more toxic toward insects than toward mammals (Cole et al., 1993; Hainzl and Casida, 1996; Matsuda et al., 2001) being their selectivity due to its greater potency in blocking insect GABA-gated chloride channels than their mammalian counterparts (Hainzl and Casida, 1996; Hainzl et al., 1998). The sulfone metabolite, as well as a photodegradation product, fipronil desulfinyl, have been reported to be more toxic to insects, mammals, fish and birds than the parent compound itself (Das et al., 2006).

Although neurotoxicity has been well characterized, and the action mode is available in mammals, information regarding the potential neurobehavioral effects of this class of compound is limited and there are only a few data concerning detailed neurophysiological effects (Fung et al., 2003). Behavioral investigations, however, might be very important in cases when animals or humans are exposed either to low doses of chemicals for a long time, or to a single high dose during an accident.

The purpose of the present study was first to elucidate whether fipronil poses behavioral hazards to male rats acutely exposed by topical administration of a formulated product, since topical application is the most popular form of therapeutic use of this pesticide. A sufficient number of well-validate endpoints were investigated in order to provide a comprehensive risk assessment of the entire central nervous system and the involvement of GABA.

2. Material and Methods

2.1. Materials

Fipronil (FrontLine[®] TopSpot[™]) commercial formulation, containing 10% fipronil was obtained from Merial Saúde Animal Ltda (São Paulo/SP, Brazil). Flumazenil was obtained from Roche Diagnostics GmbH - Rio de Janeiro/RJ, Brazil. Diazepam was purchased of Sanofi/Sintelabo – Sao Paulo/SP, Brazil.

2.2. Animals

Male Wistar rats (40 days old) were obtained from the stock of the Sao Paulo State University and kept under specific conditions on a constant 12 h light/dark cycle and controlled temperature ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$). Standard pellet food (BioBase[®], Santa Catarina/SC, Brazil) and tap water were available ad libitum. The Committee of Ethics in Experimentation Animal (CEEa) of the College of Medicine Veterinary and Zootechnia, Sao Paulo State University (UNESP of Botucatu), approved the study.

2.3. Treatments

For treatments four experimental groups (N=15) were designed respectively as control (Ct – corn oil), fipronil (F - fipronil 280 mg/kg), fipronil plus diazepam (F+DZ – fipronil and after 3 h diazepam i.p., 5 mg/kg), and fipronil plus flumazenil (F+FZ – fipronil and after 3 h flumazenil i.p., 4 mg/kg). Fipronil and control animals were exposed as a single topic dose on the cervical region. The dose of 280 mg/kg was chose to be tested because it has been preconized as sufficient to cause adverse reproductive

effects in Wistar rats (Ohi et al., 2004). Animals were utilized in the behavioral tests 3.5 h after fipronil or 0.5 h after diazepam or flumazenil administration.

2.4. Behavioral tests

Behavioral evaluations of rats were performed using an open field and elevated plus maze tests in which the animals were tested at one time without previous habituation. These experimental models were chosen for behavioural evaluation because they are used to demonstrate drug-induced central nervous system effects (Godinho et al., 2002; Trombini et al., 2001). One day prior to testing, animals were transferred in their home cage into a sound-attenuated, temperature-controlled room, illuminated by dim red lights. The period of behavioral observation was defined between 9 a.m. and 11 p.m. To prevent observational bias the testers were blind to the exposure group.

2.4.1. Open-field studies

The open field behaviour was assessed using a wood box measuring 97 x 32.5 cm (diameter x height), similar to that described previously (Broadhurst, 1960). This was divided into three concentric circles, which were subdivided by painted black lines into 18 similar spaces. For open field observations, each rat was placed in the center of the arena and for the next 3 minutes was scored on the following parameters: ambulation frequency (number of floor units entered with the four paws), rearing frequency (number of times the animals stood on its hind legs), freezing duration (total time the animal was in a immobile state, often in a crouching posture with wide open eyes and irregular respiration, after it had remained motionless for at least 1 second), and grooming duration (total time the animal used to groom). The following grooming behaviours were considered: forepaw vibration, paw licking, washing of nose, face and head, body licking, genital grooming, scratching, and head-shaking. The open field was cleaned with 5% ethanol before each animal was introduced.

2.4.2. Elevated plus maze studies

The elevated plus maze behaviour was conducted as described previously (Pile and File, 1986) and was assessed using an apparatus consisting of two open and two enclosed arms of equal length and width (50 x 10 cm). The open arms had a 1-cm high Plexiglas edge while the enclosed arms are not entirely enclosed, but rather have walls that extend

40 cm high. The plus maze was elevated 50 cm above the floor. Each rat was placed in the center of the elevated plus maze facing one of the open arms, and number of entries with the four paws, and time spent (seconds) in the open or closed arms were recorded during a 3-min test period. The elevated plus maze test is based on the principle that exposure to an elevated and open arm maze leads to an approach conflict that is considerably stronger than that evoked by exposure to an enclosed maze arm. Thus, the total entries and time spent in both open and closed arms provides a measure of anxiety or fear-induced inhibition of normal exploratory activity (Pile and File, 1986). The elevated plus maze was carefully cleaned with 5% ethanol before each animal was introduced.

2.5. Statistical Analysis

The different data obtained were analyzed using Instat 3.0 (Graph Pad Software). Data were compared through one-way analyses of variance (ANOVA) and the Tukey-Kramer test was used for comparisons between means whenever the test for ANOVA was significant at $P < 0.05$ (Snedecor and Cochran, 1980).

3. Results

3.1. Fipronil effects

By comparing Ct and F animals, was determined the fipronil effects on the behavior. Fig. 1-4 shows the data obtained in the OF test. Data and ANOVA statistics revealed that acute fipronil administration increased significantly grooming ($p < 0.05$) and rearing ($p < 0.001$) behaviors and non significantly freezing behavior (55%). Locomotor activity was not modified by the fipronil administration. Fig. 5-8 shows the data obtained in the EPM. Data and ANOVA statistics revealed that acute fipronil administration provoked a non significant reduction in the open (33% lower) and closed entry arms (16% lower). The permanency time in the open and closed arms was not affected by the fipronil.

3.2. Influence of diazepam on the fipronil effects

Data presented here comparing control and fipronil animals with fipronil and concurrent diazepam animals. Fig. 1-4 shows, through data and ANOVA, that in the OF, diazepam

enhanced significantly ($p < 0.001$) fipronil effect on freezing behavior and antagonizes significantly fipronil effect on grooming ($p < 0.001$) and rearing ($p < 0.001$) behaviors. Fig 5-8 shows the data obtained with diazepam in the EPM. Data and ANOVA statistics indicate that the number of open ($p < 0.05$) and closed ($p < 0.001$) arms entries is significantly lower in the F+DZ in relation to that the obtained only with fipronil indicating an enhanced effect by the benzodiazepine. As the locomotion in OF and the permanence time in open and closed EPM arms had unchanged by the fipronil, the lowered locomotor activity and the elevated permanence time in open arms and the decreased permanence time in closed arms in F+DZ animals is probably the self diazepam effect expression.

3.3. Influence of flumazenil on the fipronil effects

Data presented here comparing control and fipronil animals with fipronil and concurrent flumazenil animals. Fig. 1-4 shows, through data and ANOVA, that in the OF, flumazenil antagonize not significantly the fipronil effect on freezing behavior (68%) and enhanced significantly the fipronil effect on grooming ($p < 0.05$) and rearing ($p < 0.001$) behaviors. On locomotion flumazenil presented none effect. Fig 5-8 shows the data obtained with flumazenil in the EPM. Data and ANOVA statistics indicate that the number of open arms entries in the F+FZ group was significantly higher ($p < 0.01$) that the obtained only with fipronil indicating an inverse effect. The closed arms entries and the open and closed arms permanence time were not modified by the flumazenil.

4. Discussion

The present study demonstrates that male Wistar rats acutely exposed to fipronil had behavioral alterations, parts of which are influenced by diazepam and flumazenil suggesting the involvement of GABA in these alterations.

In the present study, animals receiving fipronil presented increased freezing, grooming and rearing suggesting that the insecticide increases emotionality and exploratory activities without modify locomotor activity however locomotion also be related to exploration (Archer, 1973). The test of open field is considered as an indicator of the emotional state of the animal and is commonly used for pharmacological selection of drugs that act on the central nervous system (Eidman et al., 1990). In this test the

locomotion and rearing are considered respectively as measure of locomotor and exploratory activities, while that grooming and freezing are positively correlated with fear or emotionality (Archer, 1973; Barros et al., 1994; Bhattacharya, 1994; Eidman et al., 1990; Henderson, 1970).

Observations presented by Archer (1973) suggest that increased emocionalidade could inhibit exploration. The data obtained in the OF test suggesting increased emotionality in animals fipronil exposed contradict, in part, the observed by Archer since that locomotor activity was not affected while rearing was increased by fipronil administration. These data indicating dissociation between these two behaviors in animals exposed to insecticide are contrary with results of others authors that reports ambulation and rearing as positively correlated behaviors (Moreira, 1996, Satinder, 1968).

The test of the EPM is considered an indicator of the animal anxiety state (Pellow and File, 1986) and a higher entry number in the closed arms together with an elevated permanence time reflect both a increased degree of anxiety in the animals. In the EPM test fipronil reduced not significantly the open (32%) and closed (15%) arms entry, without changing the permanence time in both. This result suggests that the insecticide did not influence the anxiety state the animals. For another side, the relation between closed/opened entries was higher in the animals receiving the fipronil ($Ct=1.72$; $F=2.14$). This seems to confirm the highest exploratory activity of animals observed through rearing behavior in OF after fipronil exposition and reinforce the suggestion of a dissociation status between locomotion and rearing behaviors. However anxiety can be considered as a component of the emotional state (Craig et al., 1995), in present experiments fipronil was capable of affect emotionality without provoke interference in the animal's anxiety.

Diazepam, a pharmacological anticonvulsant pertaining to the benzodiazepines group, has been used to study neurotoxicity by substances which exert inhibitory action on the complex canal ionophore chlorine-receptor $GABA_A$ leaguings in the lipid protein interface of the receptor membrane, leading as consequence, to stimulants effects on central nervous system and producing convulsions (Gammom et al., 1981; Valentine, 1990).

As diazepam exerts a agonista action on the gabaergic transmission (Moreira et al., 2000) and the fipronil blocks the GABA (Hainzl and Casida, 1996; Ozoe et al., 2000; Tang et al., 2004), our assumption was that in the experimental animals diazepam might be capable to antagonize the fipronil behavioral effect if really GABA it he was involved in the action mechanism of insecticide neurobehavioral toxicity. In the present experiments the antagonistic diazepam action could be observed only in grooming and rearing behaviors. These observations might be indicative of a fipronil gabaergic effect on these behavioral alterations.

The permanence time in the EPM of animals that receive fipronil plus diazepam was higher in open arms (Fig 7) and lower in closed arms (fig 8), in comparison to which animals that receive only fipronil. Considering that anxiety to look as an emotional state component (Craig et al., 1995), these results is consistent with alterations of benzodiazepine on emotionality of animals fipronil exposed, detected in the OF test, through grooming and rearing behaviors, This observation strengths the suggestion of GABA involvement on behavioral effects of fipronil.

The GABA antagonist flumazenil also has been utilized to study the action of drugs that act on the gabaergic transmission (Hall et al., 2004). Their utilization on the present experiments was based in the fact that flumazenil might be capable of intensify the fipronil effect if GABA really it he was involved in its mechanism of behavioral toxicity. In fact an intensifier action of the fipronil effect, due flumazenil concurrent administration, could be observed in grooming and rearing behaviors assessed in Of. This confirms what it was observed with diazepam and also it strengthens the suggestion of a GABA involvement in the fipronil neurobehavioral effect.

Various authors had been demonstrated experimental behavioral alterations in animals exposed acutely or chronically to chemical agents type insecticide, however the lack of studies relating influence of diazepam or flumazenil in the neurobehavioral action of the chemical agents phenylpyrazoles derived of which fipronil is integrant, difficult a data comparison but enhances the importance of the present data.

A relevant aspect that deserves be cited is the results obtained with freezing behavior in OF test (Figure 1) and with open entry arms behavior in EPM test (Figure 5). In animals fipronil exposed and receiving concurrent diazepam or flumazenil administration was observed that occurs the inverse of the expected effect since that diazepam raise to a power and flumazenil antagonized the fipronil effects. Perhaps these results indicate a

different mediation mechanism of that one exerted by GABA it in the observed alterations.

Concluding, the results obtained in the present experiments to allow that fipronil provoke behavioral effects in young rats and that GABA is involved in these effects, although is not possible exclude other additional action mechanism for the observed effects.

References

- Archer, J., 1973. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim. Behav* 21, 205-235.
- Barros, H.M.T., Tannhauser, S.L., Tannhauser, M.A.L., Tannhauser, M., 1994. The effects of GABAergic drugs on grooming behavior in the open field. *Pharmacology Toxicology* 74, 339-344.
- Bhattacharya, S.K., 1994. Behavioural studies on BR-16A (Mental ®), a herbal psychotropic formulation. *Indian Journal of Experimental Biology* 32, 37-43.
- Broadhurst, P.L., 1960. Experiments in psychogenetics. In: Eysenk, H.J. (Ed). *Experiments in personality*. Rutledge and Keagan Paul, London. pp. 31-61.
- Carlos, B., Cinta, P., Donald, J.B., 2004. Experimental designs to assess endocrine disrupting effects in invertebrates A. Review. *Ecotoxicology* 13, 511-517.
- Cole, L.M., Nicholson, R.A., Casida, J.E., 1993. Action of phenyl-pyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 47-54.
- Craig, K.J.; Brown, K.J.; Baum, A., 1995. Environmental factors in the etiology of anxiety. In: Bloom, R.E.; Kupfer, D.J. (Eds). *Psychopharmacology*. Raven Press, New York. pp.1325-1339.
- 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. (Ed.) *Casarett & Doull's Toxicology – The basic science of poisons*. McGraw-Hill, New York, pp.763-810.

- Eidman, D.S., Benedito, M.A.C., Leite, J.R., 1990. Daily changes in pentylenetetrazol-induced convulsions and open-field behavior in rats. *Physiology & Behavior* 47, 853-856.
- Fung, H.T., Chan, K.K., Ching, W.M., Kam, C.W., 2003. A case of accidental ingestion of ant bait containing fipronil. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology* 41(3), 245-248.
- Gammon, D.W., Lawrence, L.J., Casida, J.E., 1981. Two of classes of Pyrethroid action in the cockroach. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 15, 181-191.
- Godinho, A.F., Trombini, T.V., Oliveira, E.C., 2002. Effects of elevated calcium on motor and exploratory activities of rats. *Brazilian Journal Medical and Biological Research* 35, 451-457.
- Hainzl, D., Casida, J.E., 1996. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. 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.
- Hall, B.J., Chebib, M., Hanrahan, J.R., Johnston, G.A.R., 2004. Flumazenil-independent positive modulation of γ -aminobutyric acid action by 6-methylflavone at human recombinant $\alpha_1\beta_2\gamma_2L$ and $\alpha_1\beta_2$ GABA_A receptors. *European Journal of Pharmacology* 491, 1-8.
- Henderson, N.D., 1970. Behavioral reactions of Wistar rats to conditioned fear stimuli novelty and noxious stimulation. *J. Psychol* 75, 19-34.
- Hosie, A.M., Baylis, H.A., Buckingham, S.D., Sattelle, D.B., 1995. Action of the insecticide fipronil, on dieldrin-sensitive and dieldrin-resistant GABA receptors of *Drosophila-melanogaster*. *Br. J. Pharmacol* 115, 909-912.
- Jennings, K.A., 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, 303-303.
- 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(11), 573-580.
- Moffat, A.S., 1993. New chemicals seek to outwit insects pests. *Science* 261, 550-551.

- Moreira, E.G., Nascimento, N., Rosa, G.J.M., Rogero, J.R., Vassilieff, V.S., 1996. Crotoxin-induced behavioral effects in rats. *Brazilian Journal Medical and Biological Research* 29, 629-632.
- Moreira, E.G., Nascimento, N., Rogério, J.R., Vassilieff, V.S., 2000. Gabaergic-Benzodiazepine system is involved in the crotoxin-induced ansiogenic effect. *Pharmacol. Biochem. and Behav.* 65, 7-13.
- 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.
- Ohi, M., Dalsenter, P.R., Andrade, A.J.M., Nascimento, A.J., 2004. Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. *Toxicology Letters* 146 (2), 121-127.
- Ozoe, Y., Yagi, K., Nakamura, M., Akamatsu, M., Miyake, T., Matsumura, F., 2000. Fipronil-related heterocyclic compounds: structure-activity relationship for interaction with γ -aminobutyric acid- and voltage-gated ion channels and insecticide action. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 66(2), 92-104.
- Pellow, S., File, S. E., 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24, 525-529.
- Ratra, G.S., Kamita, S.G., Casida, J.E., 2001. Role of human GABA(A) receptor beta 3 subunit in insecticide toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 172, 233-240.
- Satinder, K.P., 1968. A note on the correlation between open-field and escape avoidance behavior in the rat. *J. Psychol.* 69, 3-6.
- Scharf, M.E., Siegfried, B.D., 1999. Toxicity and neurophysiological effects of fipronil and fipronil sulfone on the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Arch. Insect Biochem.* 40, 150-156.
- Snedecor, G.W., Cochran, W.G., 1980. *Statistical Methods*. 7. ed. State University Press, Ames, p.593.
- Tang, J., Usmani, K.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(3), 319-329.

- Tingle, C.C.D., Rother, J.A., Dewhurst, C.F., Lauer, S., King, W.J., 2003. Fipronil: Environmental Fate, Ecotoxicology, and Human Health Concerns. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 176, 1-66.
- 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.
- Valetine, W.N., 1990. Pyrethrine and pyrethroid insecticides. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim.* 20, 375-382.
- Wilde, G.E., Whiworth, R.J., Claassen, M., Shufran, R.A., 2001. Seed treatment for control of wheat insects and its effect on yield. *J. Agr. Urban Entomol.* 18, 1-11.

Figures

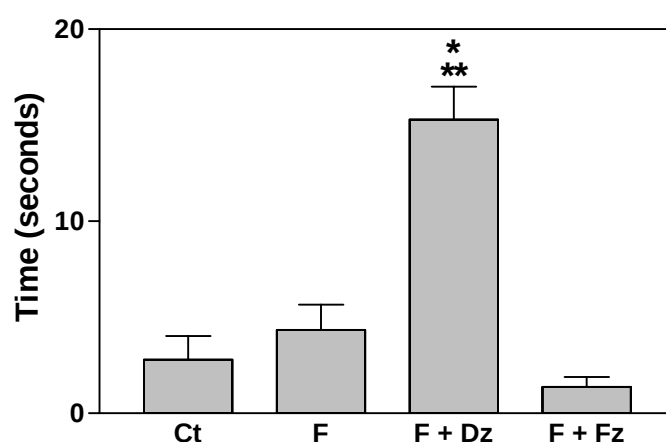


Fig. 1. Freezing behavior in rats (N=15) receiving acute control (Ct), fipronil (F), fipronil plus diazepam (F + DZ), and fipronil plus flumazenil (F +FZ) administration. Values represent the mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.001$ of control ** $p < 0.001$ of fipronil (Tukey-Kramer).

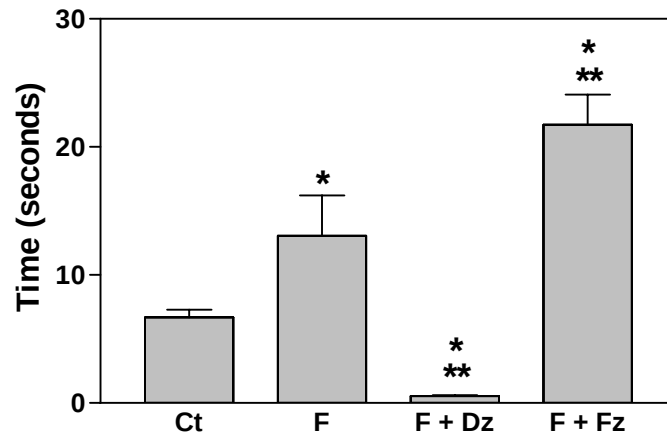


Fig. 2. Grooming behavior in rats (N=15) receiving acute control (Ct), fipronil (F), fipronil plus diazepam (F + DZ), and fipronil plus flumazenil (F +FZ) administration. Values represent the mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.01$ of control ** $p < 0.05$ – 0.001 of fipronil (Tukey-Kramer).

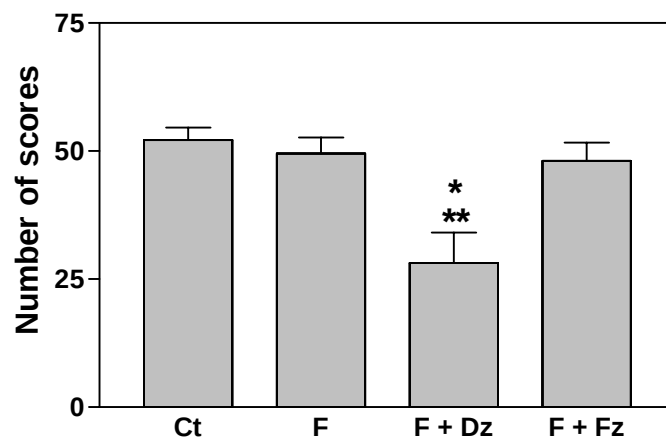


Fig. 3. Locomotor activity behavior in rats (N=15) receiving acute control (Ct), fipronil (F), fipronil plus diazepam (F + DZ), and fipronil plus flumazenil (F +FZ) administration. Values represent the mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$ of control ** $p < 0.05$ of fipronil (Tukey-Kramer).

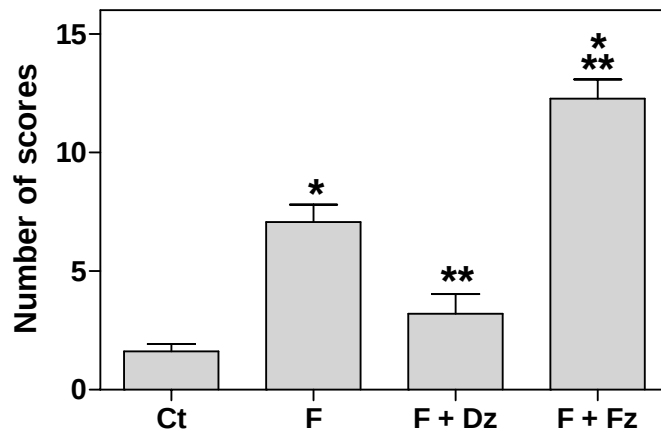


Fig. 4. Rearing behavior in rats (N=15) receiving acute control (Ct), fipronil (F), fipronil plus diazepam (F + DZ), and fipronil plus flumazenil (F +FZ) administration. Values represent the mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.001$ of control ** $p < 0.05-0.001$ of fipronil (Tukey-Kramer).

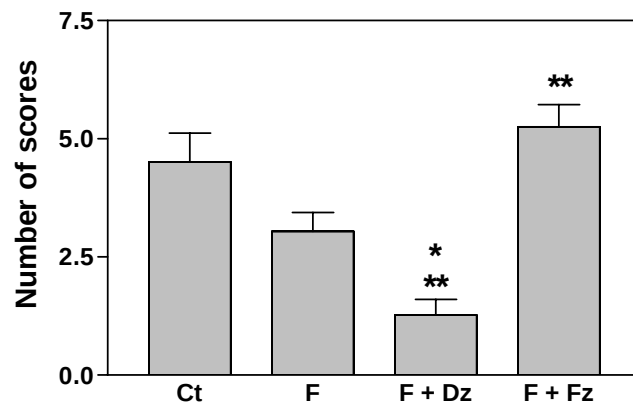


Fig. 5. Open entry arms behavior in rats (N=15) receiving acute control (Ct), fipronil (F), fipronil plus diazepam (F + DZ), and fipronil plus flumazenil (F +FZ) administration. Values represent the mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.01$ of control ** $p < 0.05$ of fipronil (Tukey-Kramer).

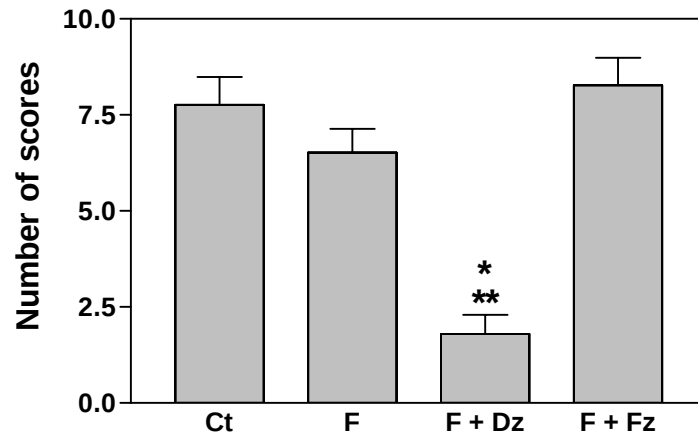


Fig. 6. Closed entry arms behavior in rats (N=15) receiving acute control (Ct), fipronil (F), fipronil plus diazepam (F + DZ), and fipronil plus flumazenil (F +FZ) administration. Values represent the mean $\pm$ S.E.M. * p < 0.001 of control ** p < 0.001 of fipronil (Tukey-Kramer).

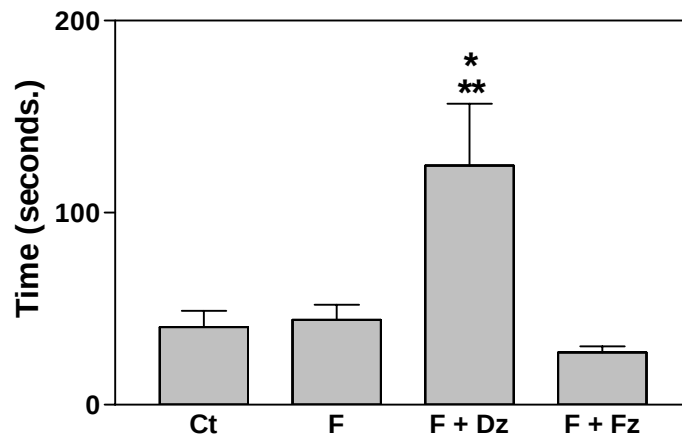


Fig. 7. Permanency time behavior in open arms in rats (N=15) receiving acute control (Ct), fipronil (F), fipronil plus diazepam (F + DZ), and fipronil plus flumazenil (F +FZ) administration. Values represent the mean $\pm$ S.E.M. * p < 0.01 of control ** p < 0.001 of fipronil (Tukey-Kramer).

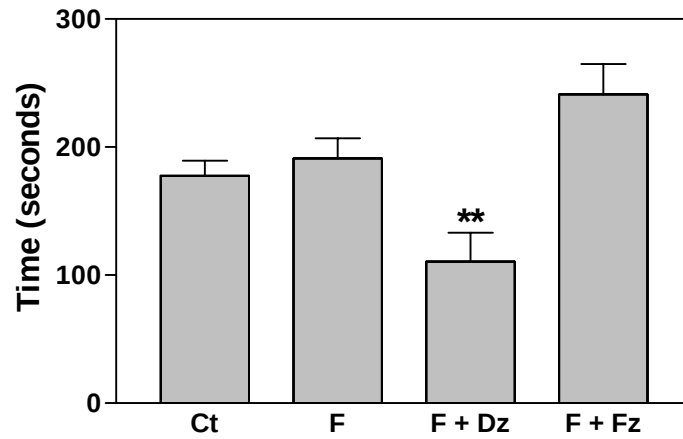


Fig. 8. Permanency time behavior in closed arms in rats (N=15) receiving acute control (Ct), fipronil (F), fipronil plus diazepam (F + DZ), and fipronil plus flumazenil (F +FZ) administration. Values represent the mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$ of control ** $p < 0.05$ of fipronil (Tukey-Kramer).