ANA PAULA MARTINS

**Efeitos neurocomportamentais do fipronil
administrado em dose única a ratos**

São Paulo

2009

ANA PAULA MARTINS

**Efeitos neurocomportamentais do fipronil
administrado em dose única a ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia Experimental e Comparada

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa

São Paulo

2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2092
FMVZ

Martins, Ana Paula

Efeitos neurocomportamentais do fipronil administrado em dose única a ratos / Ana Paula Martins. – São Paulo : A. P. Martins, 2009.

85 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Helenice Souza Spinosa.

1. Fipronil. 2. GABA. 3. Comportamento. 4. Convulsão.
5. Neurotransmissão. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos neurocomportamentais do fipronil administrado em dose única a ratos", protocolado sob o nº998/2006, utilizando 168 (cento e sessenta e oito) ratos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 18/10/06".

(We certify that the Research "Neurobehavioral effects of acute fipronil administration in rats", protocol number 998/2006, utilizing 168 (one hundred sixty eight) rats, under the responsibility of Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 10/18/2006).

São Paulo, 18 de outubro de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do Autor: MARTINS, Ana Paula

Título: Efeitos neurocomportamentais do fipronil administrado em dose única a ratos

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia
Experimental e Comparada da Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____

Prof Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____

Prof Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____

Dedico este trabalho

Aos animais que deram sua vida em razão da ciência.

A minha mãe Maria pela sua dedicação e incentivo nos momentos mais difíceis e nos momentos mais felizes.

A meu pai Heroíno in memoriam que me proporcionou tudo isso.

A minha irmã Ana Lúcia, minha companheira para tudo e meu irmão Marcelo

Ao Luiz pelo carinho

Aos meus queridos cães de estimação: Frank e Maya, que descansam em paz, Shakty e Luíza sempre companheiras.

Aos amigos felinos: Mimi, Princesa e Manuela...

Agradecimentos

A Profa. Helenice de Souza Spinosa pela dedicação, orientação e exemplo de profissionalismo,

A amiga Andrea pela colaboração e companheirismo,

Aos professores do departamento de Patologia: Jorge Camilo Flório, Maria Martha Bernardi pela ajuda e conhecimento científico,

Aos Colegas do departamento, funcionários do Biotério, secretárias do departamento de Patologia, funcionários do laboratório de farmacologia.

RESUMO

MARTINS, A. P. **Efeitos neurocomportamentais do fipronil administrado em dose única a ratos.** [Neurobehavioral effects of acute fipronil administration in rats]. 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O fipronil é um inseticida fenilpirazol de amplo espectro, empregado na Medicina Veterinária e na Agricultura para o controle de pragas; é um potente inibidor do canal de cloreto ligado ao ácido gama aminobutírico (GABA), um dos neurotransmissores responsáveis por efeitos inibitórios no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos. Embora vários estudos procurem compreender os mecanismos da toxicidade neuronal dos praguicidas em mamíferos, há poucos relacionados aos efeitos neurocomportamentais. Neste trabalho estudou-se os efeitos da exposição aguda a ao fipronil, utilizando-se modelos comportamentais ligados ao sistema GABAérgico: campo-aberto (CA), labirinto em cruz elevado (LCE), dose convulsivante mínima (DCM) com picrotoxina e pentilenotetrazol, e avaliação dos níveis cerebrais de alguns neurotransmissores e metabólitos. Ratos Wistar machos receberam, por via intragástrica (*gavage*), dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 100,0 mg/Kg) ou água destilada 1 mL/Kg. No CA, uma hora após o tratamento, houve redução significativa da distância percorrida, da velocidade média, do tempo em movimento e do número de levantamentos nos animais tratados. No LCE, observou-se diminuição da distância percorrida e número de entradas nos braços fechados e diminuição do número de movimentos iniciados na arena, nos animais tratados. Quanto às convulsões, foi observada redução significativa apenas na DCM de pentilenotetrazol em animais expostos a maior dose de fipronil. Uma hora após o tratamento não foram observadas alterações relevantes nos níveis dos neurotransmissores (noradrenalina; dopamina, serotonina e GABA) e seus metabólitos no córtex, no hipotálamo e no *striatum*. Finalizando, os resultados do presente estudo mostraram que ratos expostos a dose única de fipronil apresentaram alterações comportamentais, caracterizadas por redução da atividade motora no campo aberto, no labirinto em cruz elevado e na dose convulsivante mínima do pentilenotetrazol. Além disso, a maior dose de fipronil (100,0 mg/Kg) causou a morte de 60% dos ratos, num período entre 24 horas a 7 dias após a exposição oral. Esses efeitos

comportamentais do fipronil não puderam ser atribuídos a um único sistema de neurotransmissão central.

Palavras-chave: Fipronil. GABA. Comportamento. Convulsão. Neurotransmissão.

ABSTRACT

MARTINS, A. P. **Neurobehavioral effects of acute fipronil administration in rats.** [Efeitos neurocomportamentais do fipronil administrado em dose única a ratos]. 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The Fipronil is a phenylpyrazole insecticide with broad spectrum, both in Veterinary Medicine, and in Agriculture it has been used for the control of nuisances, is a potent inhibitor of chloride channel connected to the gamma aminobutyric acid (GABA), one of the neurotransmitters responsible for inhibitory effects on the central nervous system (CNS) of mammals. Although several studies try to understand the mechanism of neuronal toxicity of pesticide in mammalian, there are few studies related to neurobehavioral effects. Thus, the present study investigated the effects of fipronil acute exposure, being observed some behaviors models connected to GABAergic system, as open field, elevated plus maze (EPM), as well as in the seizures induced by picrotoxinin and pentylentetrazole and determinate the brain levels of some neurotransmitter and metabolic levels. Male Wistar rats received by intragastric (gavage), single dose of fipronil (1.0; 10.0; 30.0 or 100.0 mg/Kg) or distilled water. In open field, one hour after treatment, there was a significant reduction of distance moved, average speed, time moving and the number of surveys in treated animals. In the EPM, it was observed decrease in the distance moved, in the number of entries in the closed arms and decrease the number of started movements in the arena, in treated animals. As for seizures, a significant decrease was observed only in minimum convulsant dose of pentylentetrazole in animals exposed to higher dose of fipronil. One hour after treatment were not observed any relevant changes in the levels of neurotransmitters (norepinephrine, dopamine, serotonin and GABA) and its metabolites in the cortex, the hypothalamus and the striatum. Finally, the results of this study showed that rats exposed to single dose of fipronil showed behavioral changes, characterized by reduction of motor activity in the open field, in the elevated plus-maze and the minimum convulsant dose of pentylentetrazole. Moreover, the higher dose of fipronil (100.0 mg/Kg) caused the death of 60% of rats, over a period from 24 hours to 7 days after oral exposure.

These behavioral effects of fipronil could not be attributed to a single system of central neurotransmission.

Key words: Fipronil. GABA. Behavior. Seizure. Neurotrasmission.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do fipronil.....	20
Figura 2 – EthoVision®. A - Computador com <i>software</i> instalado e monitores. B - câmera filmadora. C – campo aberto.....	33
Figura 3 – Campo aberto e ilustração das diferentes áreas da arena do campo aberto (vista de cima) identificadas pelo Ethovision®, subdividida em zona interna, zona média (centro); e zona externa, zona de tigmotaxia (periferia).....	34
Figura 4 – Labirinto em cruz elevado (LCE) e ilustração esquemática das diferentes áreas identificadas pelo Ethovision®, subdividida em zona central, braços abertos e braços fechados.....	36
Figura 5 – Infusão de droga convulsivante. A - gaiola contendo rato com agulha introduzida subcutaneamente na região dorso-cervical. B - aparelho de infusão contínua (Harward-Apparatus/Withdrawal Pumps H.94). C - detalhe da seringa com a cânula, acoplada ao aparelho de infusão.....	35
Figura 6 - Comportamento de ratos observados no campo aberto <u>uma hora</u> após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, seguida do teste Tukey-Kramer, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).....	46
Figura 7 - Comportamento de ratos observados no campo aberto <u>24 horas</u> após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, $p > 0,05$).....	48
Figura 8 - Comportamento de ratos observados no campo aberto <u>48 horas</u> após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA seguida do teste Tukey-Kramer, * $p < 0,05$).....	50
Figura 9 - Comportamento de ratos observados no labirinto em cruz elevado <u>uma hora</u> após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, seguida do teste Tukey-Kramer, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).....	54

Figura 10 - Comportamento de ratos observados no labirinto em cruz elevado 24 horas após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, $p>0,05$).....	56
Figura 11 - Comportamento de ratos observados no labirinto em cruz elevado 48 horas após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, $p>0,05$).....	58
Figura 12 - Dose convulsivante mínima (DCM) de picrotoxina (mg/Kg), uma hora após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 6 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).....	59
Figura 13 - Dose convulsivante mínima (DCM) de pentilenotetrazol (mg/Kg), uma hora após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 6 por grupo. (ANOVA, seguida do teste Tukey-Kramer, $*p<0,05$).....	60
Figura 14 - Concentração de neurotransmissores e respectivos metabólitos em ng/g de tecido no córtex , uma hora após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, $p>0,05$). Noradrenalina (NOR) e seu metabólito ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (VMA); dopamina (DA), seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) e ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC); e serotonina (5 HT) e seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético (5HIAA).....	63
Figura 15 - Concentração de neurotransmissores e respectivos metabólitos em ng/g de tecido no striatum , uma hora após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média (ANOVA, seguida do Teste de Tukey-Kramer $*p<0,05$). Noradrenalina (NOR) e seu metabólito ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (VMA); dopamina (DA), seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) e ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC); e serotonina (5 HT) e seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético (5HIAA).....	65

- Figura 16 - Concentração de neurotransmissores e respectivos metabólitos em ng/g de tecido no **hipotálamo**, **uma hora** após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 100,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média (ANOVA, $p>0,05$). Noradrenalina (NOR) e seu metabólito ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (VMA); dopamina (DA), seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) e ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC); e serotonina (5 HT) e seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético (5HIAA)..... 67
- Figura 17 - Relações DOPAC/DA, HVA/DA e 5HIAA/5-HT, HVA/NOR como indicadores da taxa de renovação (*turnover*) de DA, 5-HT e NOR, respectivamente no **córtex** de ratos tratados com dose única de 1,0; 10,0; 30,0 e 100,0 mg/Kg, de fipronil ou 1mL/Kg de água destilada. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. (ANOVA, $p>0,05$)..... 69
- Figura 18 - Relações DOPAC/DA, HVA/DA e 5HIAA/5-HT, HVA/NOR como indicadores da taxa de renovação (*turnover*) de DA, 5HT e NOR, respectivamente em **striatum** de ratos tratados com dose única de 1,0; 10,0; 30,0 e 100,0 mg/Kg, de fipronil ou 1mL/Kg de água destilada. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. (ANOVA, seguida do teste de Tukey-kramer; ^{a,b} $p<0,01$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes..... 70
- Figura 19 - Relações DOPAC/DA, HVA/DA e 5HIAA/5-HT, HVA/NOR como indicadores da taxa de renovação (*turnover*) de DA, 5HT e NOR, respectivamente em **hipotálamo** de ratos tratados com dose única de 1,0; 10,0; 30,0 e 100,0 mg/Kg, de fipronil ou 1mL/Kg de água destilada. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. (ANOVA, $p>0,05$)..... 71
- Figura 20 - Concentração do neurotransmissor GABA em µg/g de tecido no **córtex** e no **striatum** **uma hora** após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 100,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média (ANOVA, $p>0,05$)..... 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comportamento de ratos observados no campo aberto <u>uma hora</u> após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, seguida do teste Tukey-Kramer, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).....	45
Tabela 2 - Comportamento de ratos observados no campo aberto <u>24 horas</u> após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, $p > 0,05$).....	47
Tabela 3 - Comportamento de ratos observados no campo aberto <u>48 horas</u> após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA seguida do teste Tukey-Kramer, * $p < 0,05$).....	49
Tabela 4 - Comportamento de ratos observados no labirinto em cruz elevado <u>uma hora</u> após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, seguida do teste Tukey-Kramer, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).....	53
Tabela 5 - Comportamento de ratos observados no labirinto em cruz elevado <u>24 horas</u> após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, $p > 0,05$).....	55
Tabela 6 - Comportamento de ratos observados no labirinto em cruz elevado <u>48 horas</u> após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, $p > 0,05$).....	57
Tabela 7 - Dose convulsivante mínima (DCM) de picrotoxina (mg/Kg), <u>uma hora</u> após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, $p > 0,05$).....	59

Tabela 8 - Dose convulsivante mínima (DCM) de pentilenotetrazol (mg/Kg), <u>uma hora</u> após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, seguida do teste Tukey-Kramer, *p<0,05).....	60
Tabela 9 - Concentração de neurotransmissores e respectivos metabólitos em ng/g de tecido no córtex , <u>uma hora</u> após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, p>0,05).....	62
Tabela 10 - Concentração de neurotransmissores e respectivos metabólitos em ng/g de tecido no striatum , <u>uma hora</u> após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, seguida do Teste de Tukey-Kramer *p<0,05).....	64
Tabela 11 - Concentração de neurotransmissores em ng/g de tecido no hipotálamo , <u>uma hora</u> após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média (ANOVA, p>0,05).....	66
Tabela 12 - Relações DOPAC/DA, HVA/DA e 5HIAA/5-HT, VMA/NOR como indicadores da taxa de renovação (<i>turnover</i>) de DA, 5HT e NOR, respectivamente em córtex , striatum e hipotálamo de ratos tratados com dose única de 1,0; 10,0; 30,0 e 100,0 mg/Kg, de fipronil ou 1mL/Kg de água destilada. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. (ANOVA, seguida do teste de Tukey-kramer; ^{a,b} p<0,01). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes.....	68
Tabela 13 - Concentração do neurotransmissor ácido gamaminobutírico GABA em µg/g de tecido no córtex e no striatum , <u>uma hora</u> após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> . São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média (ANOVA, p>0,05).....	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Sobre o fipronil	20
2.2 Sobre modelos de avaliação comportamental.....	25
2.2.1 Campo Aberto.....	25
2.2.2 Labirinto em Cruz Elevado.....	27
2.2.3 Convulsões químicas.....	28
3 OBJETIVO.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Animais.....	30
4.2 Drogas.....	30
4.3 Reagentes e soluções para dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos.....	31
4.4 Equipamentos, aparelhos, vidrarias e outros.....	31
4.5 Procedimentos.....	32
4.5.1 Avaliação comportamental.....	32
4.5.1.1 <i>Campo aberto</i>	34
4.5.1.2 <i>Labirinto em cruz elevado</i>	35
4.5.2 Convulsões químicas.....	36
4.5.3 Determinação dos níveis de neurotransmissores e metabólitos.....	38
4.6 Delineamento Experimental.....	41
4.6.1 Experimento 1: Efeitos da administração aguda de fipronil sobre a atividade geral de ratos no Campo Aberto.....	41

4.6.2 Experimento 2: Efeitos da administração aguda de fipronil sobre o comportamento de ratos no Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	41
4.6.3 Experimento 3: Efeitos da administração aguda de fipronil sobre a dose convulsivante mínima (DCM) de picrotoxina em ratos.....	41
4.6.4 Experimento 4: Efeitos da administração aguda de fipronil sobre a dose convulsivante mínima (DCM) de pentilenotetrazol em ratos.....	42
4.6.5 Experimento 5: Efeitos da administração aguda de fipronil sobre a determinação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos.....	42
4.7 Análise estatística.....	42
5 RESULTADOS.....	43
5.1 Experimento 1: Efeitos da administração de dose única de fipronil sobre A atividade geral de ratos no Campo Aberto.....	43
5.2 Experimento 2: Efeitos da administração aguda de fipronil sobre o comportamento de ratos no labirinto em cruz elevado (LCE).....	51
5.3 Experimento 03: Efeitos da administração aguda de fipronil sobre a dose convulsivante mínima (DCM) de picrotoxina em ratos.....	59
5.4 Experimento 04: Efeitos da administração aguda de fipronil sobre a dose convulsivante mínima (DCM) de pentilenotetrazol em ratos.....	60
5.5 Experimento 05: Efeitos da administração aguda de fipronil sobre a determinação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos.....	61
6 DISCUSSÃO.....	73
7 CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS.....	80

1 INTRODUÇÃO

O fipronil foi o primeiro praguicida fenilpirazol obtido a partir da síntese em laboratório (Rhône Poulenc Agro); surgiu na década de 1990, sendo classificado como praguicida de segunda geração e classificação toxicológica, classe II pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos – EPA – (U.S.EPA, 2001; IKEDA et al., 2004; SZEGEDI et al., 2005; KADAR; FAUCON, 2006; PARIKSHIT et al., 2006).

Esse praguicida possui amplo espectro de ação e foi desenvolvido para inibir seletivamente receptores do ácido gama amino butírico (GABA) associado a canais de cloreto de insetos (GARSSADI et al., 1994; CHODOROWSKI et al., 2004; ZHAO et al., 2004; DRYDEN et al., 2005; HAGIMORI et al., 2005; KOCKI et al., 2005; RAYMOND-DELPECH et al., 2005; GROSMAN et al., 2006). A alta afinidade para os insetos quando comparado aos receptores GABA de mamíferos resulta em uma menor toxicidade para estes, em vista de outros inseticidas que bloqueiam este mesmo canal (MOHAMED et al., 2004; ZHAO et al., 2004). Em insetos, o fipronil leva a morte por hiperexcitação e paralisia (ZHAO et al., 2004).

Em Medicina Veterinária o fipronil tem sido amplamente utilizado para o controle de pulgas, carrapatos e piolhos mastigadores de bovinos, cães e gatos. Em Agricultura este agente é usado como inseticida, formicida e cupinicida em culturas de algodão, arroz, batata, cevada, feijão, soja, milho, cana-de-açúcar, trigo e pastagens (HAINZL; CASIDA, 1996; MOHAMED et al., 2004; SZEGEDI et al., 2005; KADAR; FAUCON, 2006; PARIKSHIT et al., 2006). Segundo monografia apresentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária o fipronil pode também ser utilizado como produto domissanitário no controle de formigas em apresentações em isca granulada ou pó seco, para produtos de venda livre para jardinagem amadora. Para entidades profissionais o fipronil pode-se apresentar na forma de pasta-isca, iscas e líquidos. Pode ser utilizado também como preservante de madeira (ANVISA, 2008).

No Brasil o fipronil pode ser encontrado comercialmente como Frontline[®], Fiprox[®], TopLine[®] de uso veterinário para administração em cães, felinos, bovinos (COMPÊNDIO DE PRODUTOS VETERINÁRIOS – SINDAN, 2008) e também pode estar associado a outras moléculas como o metoprene. O fipronil de uso agrícola é comercializado como Blitz[®], Klap[®] e Regent[®] (COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS, 1999).

A ampla margem de utilização do fipronil em agricultura, como produto domissanitário e como parasiticida em medicina veterinária pode permitir que organismos não-alvo sejam expostos ao praguicida por meio do contato direto ou através do meio ambiente.

Embora vários estudos procurem compreender os mecanismos da toxicidade neuronal dos praguicidas em mamíferos, há poucos relacionados aos efeitos neurocomportamentais (SZEGEDI et al., 2005). Deve ser salientado que estudos neurocomportamentais podem ser bastante úteis para se avaliar os efeitos da exposição a substâncias químicas. Em particular, o estudo neurocomportamental da exposição aguda a altas doses do fipronil pode ser importante para fornecer informações úteis para o auxílio diagnóstico e tratamento da intoxicação, principalmente nos casos de exposições acidentais tanto em animais, como em seres humanos.

Neste trabalho, considerando que o fipronil inibe seletivamente receptores do GABA associado a canais de cloreto, pretende-se estudar os efeitos da exposição aguda de ratos ao fipronil, avaliando-se comportamentos envolvidos com o sistema GABAérgico (campo-aberto, labirinto em cruz elevado e convulsões induzida quimicamente) e os níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no sistema nervoso central.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Sobre o fipronil

O fipronil tem como nome químico 5 amino-1-(2,6- dicloro- α,α,α trifluor-p-toluil)-4-trifluormetil sulfinilpirazol-3-carbonitrila. A figura 1 ilustra sua estrutura química.

Figura 1 - Estrutura química do fipronil

O fipronil inibe seletivamente receptores do ácido gama amino butírico (GABA) associado a canais de cloreto de insetos (GARSSADI *et al.*, 1994; CHODOROWSKI *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2004; DRYDEN *et al.*, 2005; HAGIMORI *et al.*, 2005; KOCKI *et al.*, 2005; RAYMOND-DELPECH *et al.*, 2005; GROSMAN *et al.*, 2006). A molécula de fipronil inibe não competitivamente o GABA, fixando-se no receptor no interior do canal de cloro, inibindo o fluxo celular dos íons, anulando assim o efeito neuroregulador do GABA (SARTOR; SANTARÉM, 2006).

Já foi mostrado também que este praguicida se liga tanto a receptores GABA_A , quanto a GABA_C de mamíferos (IKEDA *et al.*, 2001; 2002; GUNNELL *et al.*, 2003).

Os receptores GABA_A de mamíferos são glicoproteínas transmembranas heteroligoméricas compostas de cinco subunidades de sete famílias. Pelo menos uma subunidade α , uma β e uma γ são necessárias para o funcionamento total dos receptores. *In vitro* o fipronil se liga a um receptor homoligomérico $\beta 3$ ou a um receptor nativo de insetos com alta afinidade. A ligação a receptores heteroligoméricos de mamíferos é relativamente fraca (MOHAMED et al., 2004). A ligação do fipronil aos receptores GABA em insetos apresenta uma afinidade 100 vezes maior, quando comparados aos receptores GABA de mamíferos (ZHAO et al., 2005).

Ratra et al. (2002) sugerem que receptor GABA_C é também um alvo potencial de ação do fipronil, devido a uma homologia existente entre os receptores GABA_A e GABA_C.

IKEDA et al. (2004) demonstraram experimentalmente que as ações mais importantes do fipronil em receptores GABA_A são a redução no tempo médio de abertura do canal de cloreto (o canal abre mais rápido) e aumento no tempo médio de fechamento do mesmo (o canal permanece mais tempo aberto), o que se manifesta como uma diminuição na frequência de abertura do canal.

O GABA é um neurotransmissor inibitório que regula virtualmente a excitabilidade de todos os neurônios do sistema nervoso central, e tem sido associado a eventos fisiológicos e fisiopatológicos, que envolvem a função e/ou a disfunção cerebral. A ansiedade e as convulsões são algumas das manifestações que envolvem a neurotransmissão GABAérgica, em particular, o receptor GABA_A (BALDESSARINI, 1996).

A alta afinidade do fipronil pelos receptores dos insetos quando comparado aos receptores GABA de mamíferos resulta em uma menor toxicidade para estes, em vista de outros inseticidas que bloqueiam este mesmo canal (MOHAMED et al, 2004; ZHAO et al, 2004). Apesar da menor toxicidade do fipronil para os mamíferos, foram relatados casos de intoxicação humana pelo praguicida no Sri Lanka e os sinais e sintomas observados foram suores, tremores, náusea, vômitos, agitação e convulsões tônico-clônicas (MOHAMED et al., 2004).

A absorção do fipronil (em formulação a 79% em solução aquosa) pela via dermal é baixa; apenas cerca de 1% da dose administrada em ratos foi absorvida (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997).

Em outro estudo feito em ratos, o fipronil radiomarcado foi administrado por via oral na dose de 4 mg/Kg de peso corporal, sendo o pico plasmático alcançado 5,5 horas após o tratamento; a meia-vida de eliminação foi de 183 horas em machos e 245 horas em fêmeas. O fipronil radiomarcado se distribui por todos os tecidos, com maior predomínio no tecido adiposo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997).

O grupamento CF_3 do fipronil na posição 4 (tri-fluor-metil-sulfinil-pirazol), confere a estrutura maior lipossolubilidade, alteração nas propriedades eletrônicas, na biotransformação, na efetividade e nos aspectos toxicológicos, quando comparado, por exemplo, ao etiprole (outro praguicida fenilpirazol), que tem um C_2H_5 na posição 4 (CABONI et al., 2003).

Nos mamíferos, o fipronil pode ser detectado nos tecidos e na urina e é biotransformado a um composto fipronil sulfona (principal metabólito). O fipronil sulfona é formado rapidamente em seres humanos por meio do citocromo P450 e *in vitro*, este composto é formado no sistema CYP3A4 recombinante e em microsomas hepáticos de seres humanos (ZHAO et al., 2005).

Ensaio sobre ligações a receptores indicam que a ligação do composto sulfona aos receptores GABA de seres humanos e camundongos possuem alta afinidade (MOHAMED et al., 2004; ZHAO et al., 2005). O composto sulfona apresenta toxicidade equivalente ao fipronil (MOHAMED et al., 2004).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a ingestão diária aceitável de fipronil é de 0,0002 mg/Kg de peso corporal (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008).

O fipronil é considerado tóxico para mamíferos, quando expostos pela via oral. A dose letal 50% (LD50%) do fipronil de grau técnico, por via oral para ratos é de 97 mg/kg e em camundongos é de 95 mg/Kg. Por outro lado, a toxicidade aguda do fipronil pela via dermal é baixa a (LD50); por via dermal para coelhos é de 354 mg/Kg e para ratos é considerada maior que 2000 mg/kg (U.S.EPA, 2001).

O quadro de toxicidade aguda para roedores é caracterizada por tremores, alteração na locomoção, agitação, crises convulsivas e mortes, em doses acima de 50 mg/Kg, por via intraperitoneal (ip). Em camundongos, a LD50 do fipronil, por via ip, é de 41 mg/Kg de peso corporal e do composto sulfonado é de 50 mg/Kg. O fipronil em altas doses promove a morte dos animais entre dois dias, enquanto que

as alterações no sistema nervoso central são observadas em até sete horas após a exposição ao fipronil (MOHAMED et al., 2004).

Um estudo foi realizado em ratos machos e fêmeas para a avaliação aguda da neurotoxicidade do fipronil técnico (grau de pureza 96,7%), utilizando as seguintes doses: 0; 0,5; 5 ou 50 mg/Kg. Observou-se que cinco machos e cinco fêmeas morreram em até dois dias após o tratamento com a maior dose testada. Na necropsia, os animais apresentaram hemorragia cerebral difusa. Sete horas após o tratamento, nos animais da maior dose testada foram observados sinais de depressão e de estimulação do sistema nervoso central. Os sinais de estimulação: tremores, convulsões tônico-clônicas, mioclonias além de diminuição do tônus muscular, sendo descrito também que os animais arrastam os membros posteriores e apresentavam hipersensibilidade a estímulos de toque e sonoros. Os sinais indicativos de depressão foram diminuição no número de levantamentos, diminuição dos reflexos e diminuição da temperatura corporal. A atividade motora foi reduzida em 90% dos animais 8 horas após o tratamento. O NOEL (*No Observed Effect Level* ou nível de efeito não observável) foi de 0,5 mg/Kg diminuição da força muscular, os animais arrastam os membros posteriores (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997).

O fipronil é convertido a derivados fipronil sulfona, fipronil desulfinil, fipronil sulfeto e fipronil amida por hidrólise (CABONI et al., 2003). O fipronil, bem como os seus produtos de biotransformação, são mais tóxicos para os invertebrados que para os mamíferos, podendo também causar dano ao meio ambiente aquático em baixas concentrações (KONWICK et al., 2006).

Em peixes, o fipronil causa efeitos neurotóxicos, degeneração da notocorda e defeitos locomotores em embriões de peixes e larvas relacionados a um subtipo de receptor de glicina (STEHR et al., 2006). Os produtos de degradação do fipronil são considerados extremamente tóxicos para peixes (*Rainbow trout*, *Bluegil sunfish*) e para invertebrados aquáticos e aves (U.S. EPA, 2001; ZHAO et al., 2005).

Estudos sobre a degradação do fipronil no solo têm sido realizados, mas a relação entre sua adsorção e degradação ainda não está bem esclarecida. Apesar de sua alta estabilidade em soluções aquosas ácidas e neutras, com uma meia-vida de 1390 dias, em um pH de 7,1 (22°C) (U.S. EPA, 2001), o fipronil sofre degradação através de hidrólise, fotólise, oxidação e redução (MASUTTI; MERMUT, 2007).

O composto derivado desulfinil é formado fotoquimicamente e seu surgimento é rápido, sendo a principal via de degradação no ambiente. A meia-vida do fipronil pela fotólise é de 4,1 horas (U.S. EPA, 2001). O derivado sulfeto é formado por redução ao passo que o metabólito sulfona é formado por oxidação do substituinte sulfinil. O derivado amida resulta da hidrólise do grupo nitrila do fipronil (MASUTTI; MERMUT, 2007).

A meia vida do fipronil em vários solos mantidos sob condições aeróbicas varia de 0,6 a 10,3 meses, dependendo das características do solo. O fipronil sofre degradação nesse meio por processos biótico e abiótico. A degradação biótica representa a principal forma de degradação do fipronil no solo e os microorganismos do solo e/ou seus sistemas enzimáticos estão envolvidos na degradação e na formação dos metabólitos do fipronil (MASUTTI; MERMUT, 2007).

Sob condições normais de uso, fipronil pode ser degradado principalmente a fipronil sulfona, via oxidação biótico-abiótica, e a um fotoproduto desulfinil, via fotólise (ZHAO et al., 2005).

O fipronil apresenta uma pressão de vapor relativamente baixa e não volatiliza, portanto só será encontrado no ar quando utilizado na forma de spray (U.S EPA, 2001).

O fipronil é um dos vários praguicidas conhecidos que induzem câncer de tireóide em ratos, provavelmente como resultado de sua capacidade de aumentar o metabolismo hepático dos hormônios tireoidianos e de sua excreção (DAS et al., 2006). DAS et al. (2006) também destacam que estudos recentes empregando hepatócitos de seres humanos e de ratos têm demonstrado que os praguicidas são capazes de induzir muitas enzimas metabólicas nestas células e, dentre eles, o fipronil.

Ensaio de toxicidade reprodutiva revelam que os efeitos adversos do fipronil sobre o aparelho reprodutor de ratas estão relacionados às alterações provocadas no sistema endócrino dos animais. Estes agentes são chamados de desreguladores endócrinos e podem causar uma variedade de efeitos adversos à saúde incluindo alterações do desenvolvimento comportamental e riscos reprodutivos; a administração aguda de fipronil, por via tópica, a ratas gestantes, resultou no aumento dos níveis de progesterona, na diminuição dos níveis de estradiol, aumento da duração do ciclo estral e diminuição na porcentagem de gestação (OHI et al., 2004).

2.2 Sobre modelos de avaliação comportamental

Embora vários estudos procurem compreender os mecanismos da toxicidade neuronal dos praguicidas em mamíferos, há poucos relacionados aos efeitos neurocomportamentais (SZEDEDI et al., 2005). Deve ser salientado que estudos neurocomportamentais podem ser bastante úteis para se avaliar os efeitos da exposição prolongada a baixas doses de substâncias químicas. Os modelos a seguir, tem sido utilizados para estudar substâncias com a ação no sistema nervoso central, como aquelas que interferem com o sistema GABAérgico central.

2.2.1 Campo Aberto

O campo aberto foi criado em 1934 e é bastante utilizado para avaliar a atividade locomotora, exploração e emocionalidade de roedores (BROADHURST, 1960). Consiste em uma arena circular sob alta luminosidade, onde a emocionalidade era medida por meio do comportamento do animal observando-se a defecação e atividade locomotora (LISTER, 1990). Embora a defecação seja freqüentemente alterada por uma série de fatores desvinculados da ansiedade, a locomoção pode assumir variados padrões diante de situações aversivas, desde o congelamento (*freezing*) até a fuga, refletindo assim, a reatividade emocional (ARCHER, 1973).

Um dos fatos relevantes na observação do comportamento de um animal é a sua tendência a movimentar-se. A esta movimentação, que ocorre mesmo na ausência de estímulos e que parece não estar ligada aos ajustes do próprio animal ao meio ambiente, deu-se o nome de atividade geral, atividade espontânea ou, ainda, comportamento casual (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1980).

Como ambientes abertos são naturalmente aversivos para os ratos, os animais mostram tendência a permanecer mais tempo na periferia de um campo aberto do que no centro (ARCHER, 1973); este comportamento é chamado de tigmotaxia (TREIT e FUNDYTUS, 1988). Assim, com base na tendência natural de permanecerem próximos aos perímetros, quando em um ambiente novo, verificou-se que o comportamento de tigmotaxia era sensível aos ansiolíticos (TREIT; FUNDYTUS, 1988).

Dependendo do nível de estimulação do ambiente, o campo aberto é um modelo exploratório em que podem ser verificadas: a ansiedade, caso os estímulos ansiogênicos sejam suficientes para indicar perigo; a exploração, caso os estímulos ansiogênicos não sejam excessivos a ponto de inibir o comportamento do animal; e a atividade locomotora, após períodos de habituação, em que a arena deixa de constituir novidade (ARCHER, 1973; KELLEY, 1993; ZIMMERMANN et al., 2000).

Além da locomoção, o levantar no campo aberto pode ser a manifestação de um processo exploratório de aproximação das regiões modificadas do ambiente (BROADHURST, 1960). Este parâmetro tende a aumentar de frequência frente a uma estimulação nova (WATSON, 1960; GARG, 1969 apud BERNARDI; PALERMO-NETO, 1980).

O comportamento de *grooming* ou de limpeza observado no campo aberto, tem sido tomado como a expressão de um decréscimo na emocionalidade e mostra independência das situações de medo (HAHN et al., 1970; VALLE¹, 1971 apud BERNARDI; PALERMO-NETO, 1980).

¹VALLE, F. P. Rats performance on repeated test in open-field as a function of age. **Psychonomic Science**, v. 23, p. 333-335, 1971.

2.2.2 Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um excelente modelo para avaliar os benzodiazepínicos, drogas com ação GABAérgica e via glutamato (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2003). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório e tem sido associado com um amplo espectro de funções fisiológicas e em estados de doenças incluindo ansiedade e depressão (ZHENG et al., 2008). O comportamento do animal neste aparelho é considerado um modelo experimental de ansiedade, pois induz impulso exploratório nos braços abertos e ao mesmo tempo impulso de medo a espaços abertos, conduzindo ao conflito entre exploração e esquia (MONTGOMERY, 1955).

O comportamento no labirinto em cruz elevado (LCE) foi proposto como modelo para avaliação de drogas ansiolíticas do grupo dos benzodiazepínicos em ratos (FILE; HYDE, 1979). O LCE foi validado farmacologicamente por Pellow em 1985. Este modelo leva em conta o comportamento do rato que procura locomover-se em ambientes fechados (túneis) para evitar predadores, preferindo a permanência nos braços fechados em relação à permanência nos braços abertos.

Segundo Pellow et al., (1985) estudos pilotos demonstraram que animais inseridos em um novo ambiente antes de serem colocados no LCE, apresentam maior atividade geral e podem aumentar a exploração dos braços abertos.

Ambientes abertos, sem proteção lateral, são naturalmente aversivos para o roedor (BARNETT, 1966). A exposição aos braços abertos do LCE produz significativamente mais ansiedade quando comparada à exposição aos braços fechados. Drogas ansiolíticas elevam o tempo gasto pelos roedores nos braços abertos quando comparados com o tempo gasto nos braços fechados e, em contraste, drogas ansiogênicas diminuem o tempo gasto nos braços abertos (PELLOW; FILE, 1985).

2.2.3 Convulsões químicas

As causas da epilepsia estão associadas com falhas de controle da inibição, as quais incluem liberação insuficiente de GABA, a perda de interneurônios GABAérgicos, mudanças nos circuitos envolvendo interneurônios GABAérgicos e a expressão alterada de receptores GABA (KANG et al., 2008).

As convulsões químicas podem ser induzidas tanto pela picrotoxina como pelo pentilenotetrazol. A picrotoxina é um agente convulsivante, que atua bloqueando o canal de cloreto associado ao receptor de GABA_A; é considerada um antagonista não competitivo do GABA, e no passado tinha uso clínico como estimulante respiratório, agora obsoleto devido ao risco de induzir convulsões (RANG et al., 2004).

O pentilenotetrazol é um estimulante central e respiratório que foi usado na depressão respiratória; também fazia parte de preparações indicadas em vários distúrbios respiratórios, inclusive tosse e também no tratamento da hipotensão (EIKMEIER-AUGELLO, 2002). Seu mecanismo de ação ainda é desconhecido.

A avaliação da atividade convulsivante do pentilenotetrazol em modelos animais tem se mostrado útil para estudar fármacos com possível atividade antiepilética. O fato de fármacos antiepiléticos inibirem as convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol tem sido correlacionado com sua eficácia contra as crises de ausência (RANG et al., 2004).

3 OBJETIVO

Estudar os efeitos da exposição aguda de ratos ao fipronil empregando-se modelos comportamentais envolvidos com o sistema GABAérgico e avaliações neuroquímicas. Para tanto foram investigados:

- comportamento no campo aberto;
- comportamento no labirinto em cruz elevado;
- convulsão induzida por picrotoxina e pentilenotetrazol;
- níveis de neurotransmissores e seus metabólitos em regiões do sistema nervoso central.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar adultos, de mesma linhagem, com aproximadamente 90 dias, pesando entre 300 g – 400 g, provenientes do biotério da FMVZ-USP através de cruzamentos sucessivos.

No biotério os animais foram alojados em gaiolas plásticas com tampas metálicas, medindo 40 x 50 x 20 cm. Todos os animais foram mantidos em sala com temperatura controlada por meio de aparelhos de ar condicionado ($20 \pm 3^{\circ}\text{C}$) e com ciclo de 12 horas de claro e escuro, sendo a luz acesa às 6:00 horas.

Água e comida foram fornecidas *ad libitum* aos animais durante todo o procedimento experimental.

4.2 Drogas

Fipronil – Regent 800 WG[®] (BASF)

Picrotoxina (Sigma[®])

Pentilenotetrazol (Serva[®])

Foi utilizado o fipronil de uso agrícola, na apresentação em grânulo dispersível em água, sendo conservado ao abrigo da luz, em local seco e arejado. Imediatamente antes da administração, por *gavage*, do fipronil foi feita a diluição em água destilada. As doses de fipronil empregadas foram 1,0; 10,0; 30,0; 100,0 mg/Kg de peso corpóreo, enquanto os animais do grupo controle receberam, pela mesma via, idêntico volume de água destilada (isto é, 1mL/Kg).

A picrotoxina foi diluída em água destilada a fim de se obter uma concentração de 7 mg/mL.

O pentilenotetrazol foi diluído em água destilada a fim de se obter uma concentração de 70 mg/mL.

4.3 Reagentes e soluções para dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos

Ácido cítrico (Merck[®]);
Ácido clorídrico (Merck[®]);
Ácido 3,4 di-hidroxifenilacético (DOPAC) (Sigma[®]);
Ácido etilenodiaminotetracético tetrasódico (EDTA) (Merck[®]);
Ácido heptanossulfônico (Merck[®]);
Ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA) (Sigma[®]);
Ácido homovanílico (HVA) (Sigma[®]);
Ácido vanilmandélico (VMA) (Sigma[®]);
Ácido ortofosfórico (Sigma[®]);
Ácido perclórico (Sigma[®]);
Água ultra pura (Milli-Q[®]);
Cloridrato de dopamina (DA) (Sigma[®]);
Cloridrato de noradrenalina (NOR) (Sigma[®]);
Cloridrato de serotonina (5-HT) (Sigma[®]);
Fosfato de sódio dibásico (Sigma[®]);
Fosfato de sódio monobásico (Sigma[®]);
Gás hélio (White Martins[®]);
Metabissulfito de sódio (Sigma[®]);
Metanol absoluto (Merck[®]);
Tiosulfato de sódio (Merck[®]);

4.4 Equipamentos, aparelhos, vidrarias e outros.

Água destilada;
Agulhas para seringa; (20,0 x 5,5) mm
Balança Analítica Mettler[®] AE 200;
Balanças Ohaus[®] LS-2000g e LS-200g;
Campo aberto (100 cm de diâmetro e parede metálica com 32,5 cm de altura)

Caneta sonicadora (Lab-Line[®]);

Centrífuga (EPPENDORF 5804 R[®]);

Cromatógrafo líquido de alta eficiência;

Cronômetros;

Detector eletroquímico (HPLC – ED) Shimadzu CL-10 pv;

Gaiolas de vidro;

Labirinto em cruz elevado (constituído por dois braços abertos opostos de 50 X 10 cm e dois braços fechados opostos de 50 X 10 X 40 cm dispostos em ângulo de 90⁰);

4.5 Procedimentos

4.5.1 Avaliação comportamental

A avaliação comportamental foi realizada com o auxílio do Ethovision[®] (NOLDUS INFORMATION TECHNOLOGY, 1997), o qual consiste em um sistema de rastreamento em vídeo, análise de movimento e reconhecimento comportamental.

O sistema é composto pelo programa Ethovision Pro-color 1.9 e pelos itens de hardware, câmera filmadora (CCD- Íris Color Sony), monitor de vídeo (Sony), computador com placa de captura de vídeo, monitor SVGA, teclado e mouse, além de cabos e conectores (Figura 2).

Figura 2 – EthoVision®. A - Computador com *software* instalado e monitores. B - câmera filmadora. C – campo aberto.

A partir das imagens recebidas pela câmera filmadora e digitalizadas na placa de captura, o programa gera coordenadas espaciais (X e Y) do centro de gravidade do animal em intervalos de tempo determinados, segundo taxa de amostragem de 6,66 amostras por segundo.

As coordenadas são geradas pelo método da subtração, ideal para rastrear um animal branco em uma arena cinza, no qual o sistema subtrai a imagem de cada amostra dos pontos da imagem de referência (imagem do campo aberto ou do labirinto em cruz elevado vazios, sem o animal, capturada antes do experimento).

Os parâmetros automáticos calculados pelo Ethovision® foram:

- Na zona (*in zone*) – Resultados quanto à duração (tempo passado na zona) e à frequência (número de vezes que o animal entrou na zona).
- Distância percorrida em cm – Calculado pela somatória das distâncias, medidas em linha reta, movidas pelo animal entre duas amostras consecutivas.
- Movimento – Resultados quanto à duração (tempo em movimento) e à frequência (número de movimentos iniciados).

Foram também avaliados parâmetros semi-automáticos. Assim, simultaneamente ao rastreamento feito pelo Ethovision®, foi possível o registro de eventos comportamentais, permitindo ao experimentador associar a ocorrência de um dado comportamento observado no monitor com uma letra pré-escolhida no teclado e, desta forma, registrar o tempo de duração e o número de ocorrências de comportamentos pré-determinados, na arena e em cada zona. Segundo esse método, a duração do comportamento correspondia ao tempo em que se mantinha a tecla pressionada, enquanto o número de ocorrências era registrado conforme o número de vezes que se pressionava a tecla. Considerando que o sistema armazenou e calculou os dados segundo a localização do animal, e foi o experimentador quem observou o comportamento, essa etapa foi chamada de registro semi-automático do comportamento. Os comportamentos assim registros quanto à duração e frequência foram a auto-limpeza e o levantar.

4.5.1.1 Campo aberto

O campo aberto é constituído de uma arena circular de metal protegida em todo o perímetro por parede vertical. O aparelho de cor preta fosca, com as seguintes dimensões: 100 cm de diâmetro e parede metálica com 32,5 cm de altura (Figuras 2C e 3).

Figura 3 – Campo aberto e ilustração das diferentes áreas da arena do campo aberto (vista de cima) identificadas pelo Ethovision®, subdividida em zona interna, zona média (centro); e zona externa, zona de tigmotaxia (periferia)

A arena desenhada no Ethovision continha quatro zonas principais: interna, média, externa e zona de tigmotaxia (tigmo), sendo essa última delimitada a uma distância de 10 cm da parede do aparelho (Figura 3). O termo tigmotaxia remete ao comportamento do roedor de manter contato com objetos ou perímetros no ambiente, o que, no caso do campo aberto, significa explorar o ambiente junto à zona próxima as paredes, por essa razão denominada zona de tigmotaxia (TREIT e FUNDYTUS, 1988).

Uma hora após o tratamento com dose única de fipronil, cada animal foi colocado individualmente no centro da arena e observado por 5 minutos entre as 8:00 e 13:00 h, intercalando-se animais dos grupo e experimentais, sendo avaliado os seguintes parâmetros:

- Distância percorrida (cm) - Calculado pela somatória das distâncias, medidas em linha reta, movidas pelo animal entre duas amostras consecutivas.

- Frequência de levantar - É o número de vezes que o animal adquire a postura de permanecer apoiado nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, tendo a cabeça dirigida para cima, podendo ou não tocar com as patas anteriores a parede do campo aberto. Esse parâmetro foi avaliado em toda a arena e na zona de tigmotaxia.

- Tempo de limpeza - É o tempo, em segundos, que o animal lambe as patas e/ou os pêlos, fazendo sua higiene (*grooming*). Esse parâmetro foi avaliado em toda a arena e na zona de tigmotaxia.

Entre as observações de cada animal, a arena foi higienizada com solução de álcool 5%.

4.5.1.2 Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz levado (Figura 4) é feito de madeira e é constituído por dois braços abertos, opostos, de 50 cm de comprimento e 10 cm de largura cada um, e por dois braços fechados, também opostos, com dimensões idênticas, porém apresentando paredes laterais de 40 cm de altura. No cruzamento dos braços forma-se um compartimento aberto de 10 x 10 cm, denominado centro. O labirinto é apoiado em um suporte de madeira, que o faz ficar a 50 cm do chão.

Cada animal foi colocado individualmente no centro do labirinto sempre de frente para o mesmo braço fechado e observado por um período de 5 minutos.

Foram registrados os seguintes parâmetros:

- Distância percorrida total.
- Número de movimentos iniciados.
- Tempo em movimento.
- Número de entradas nas áreas do labirinto.
- Tempo total de permanência nos braços abertos e fechados.

A introdução dos animais no labirinto em cruz elevado foi realizada imediatamente após a observação do animal no campo aberto, entre 8:00 e 13:00 h, intercalando-se animais dos grupo e experimentais. Entre as observações de cada animal, a arena foi limpa com solução de álcool 5%.

Figura 4 – Labirinto em cruz elevado (LCE) e ilustração esquemática das diferentes áreas identificadas pelo Ethovision®, subdividida em zona central, braços abertos e braços fechados.

4.5.2 Convulsões químicas

As convulsões químicas foram induzidas com: picrotoxina (7 mg/mL) e pentilenotetrazol (70 mg/mL). Estas drogas foram administradas através de um aparelho de infusão contínua (Harward-Apparatus/Withdrawal Pumps H.94), que permite controlar o volume e a velocidade de infusão (0,0136 mL/min) – Figura 5. As drogas foram administradas por via subcutânea (SC), na região dorso-cervical dos animais. Para tanto se introduziu uma agulha acoplada a uma cânula, conectada a

uma seringa contida no aparelho de infusão (Figura 5B e C). A agulha foi fixada com esparadrapo no animal. Desta forma, foi possível calcular a dose convulsivante mínima (DCM) para cada droga. Durante a administração da droga convulsivante, cada animal foi observado em gaiolas com paredes de vidro medindo 90 x 40 x 50 cm (Figura 5A). A administração da droga convulsivante foi imediatamente interrompida quando se observou o aparecimento de convulsão tônico-clônica e, conhecendo-se o volume administrado e o peso do animal, foi calculada a DCM em mg/Kg de cada animal (Figura 5).

Figura 5 – Infusão de droga convulsivante. A - gaiola contendo rato com agulha introduzida subcutaneamente na região dorso-cervical. B - aparelho de infusão contínua (Harvard-Apparatus/Withdrawal Pumps H.94). C - detalhe da seringa com a cânula, acoplada ao aparelho de infusão

4.5.3 Determinação dos níveis de neurotransmissores e metabólitos

Os ratos foram decapitados com auxílio da guilhotina. Após a decaptação os encéfalos foram retirados do crânio e lavados em solução de cloreto de sódio 0,9% gelada (4°C), sendo, em seguida, dissecado sobre placa de gelo, rodeado por gelo seco. As amostras encefálicas de interesse (hipotálamo, córtex e estriado) foram coletadas e colocadas separadamente em tubos de polipropileno do tipo *ependorf* e estocados em nitrogênio líquido (-80°C); todo este procedimento foi realizado em intervalo de tempo inferior à 3 minutos.

As estruturas foram pesadas, diluídos em uma solução de ácido perclórico 0,1 M (8,68 mL de ácido perclórico, 200 mg de metabissulfito de sódio (Na₂S₂O₅), 200 mg de ácido diaminoetilenotetracético dissódico (EDTA), q.s.p. 1000 mL de água MilliQ). Antes da diluição, para cada 50 mL de ácido perclórico foram adicionados 10 µL de 3,4 diidroxibenzilamina (DHBA). O DHBA foi escolhido como padrão interno por ter as mesmas características físico-químicas que as monoaminas a serem dosadas. Após a diluição, o material foi homogeneizado empregando-se a caneta sonicadora (Lab Line Instruments), durante 2 ou 3 minutos sob refrigeração com gelo seco.

Os homogenatos obtidos foram conservados em geladeira por toda a noite (*overnight*) para a precipitação de proteínas e ácidos nucleicos, interferentes nas amostras. Na manhã seguinte o material foi centrifugado a 11.000 g durante 20 minutos. Os sobrenadantes foram retirados e acondicionados em tubos tipo *ependorf* armazenados em freezer (-80 °C) para posterior análise dos neurotransmissores e seus metabólitos.

As monoaminas, dopamina (DA), seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) e ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC); serotonina (5-HT) e seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético (5HIAA), e noradrenalina (NOR) e seu metabólito ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (VMA) foram dosadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), com detector eletroquímico (ED), conforme descrito por Felício et al. (1996). Sucintamente, utilizou-se um cromatógrafo composto de um recipiente injetor (válvula) de 20 µL, bombas de fluxo A e B, um sistema controlador (monitoramento de fluxo, pressão e temperatura), uma coluna cromatográfica (C-18

medindo 150 x 4,6 mm com partículas de 5 µm – Shimpak) com filtro de linha, um detector eletroquímico e um integrador modulado Chromatopac. A técnica utilizada é a de cromatografia em fase reversa com pareamento iônico. Esta técnica fundamenta-se na cromatografia de partição ou absorção. As condições de trabalho empregadas foram temperatura 50 °C; tempo de obtenção dos picos: até 16 min, sendo que cada amostra será corrida por 28 min.

A fase móvel para o HPLC utilizada foi um sistema isocrático formado por um tampão citrato 0,02 M, metanol 92/8 (v/v), 0,12 mM EDTA sódico e 0,0556% de ácido 1-heptanosulfônico (HSA). O pH foi ajustado para 3 com ácido ortofosfórico (H₃PO₄). A fase móvel foi filtrada com membranas milipore de 0,22 µm em sistema à vácuo e deaerada por 15 min com fluxo constante de um degaseificador a hélio, antes de ser instalada no HPLC. Em seguida circula-se no sistema cromatográfico fechado por 12 horas (*overnight*) para estabilização da coluna e da linha de base, operando em fluxo constante de 1,0 mL/min. O detector foi mantido com um potencial de 0,8 V no eletrodo de trabalho.

A caracterização das diferentes substâncias analisadas se deu pelo tempo de retenção, reflexo da polaridade destes compostos. Desta forma, substâncias mais polares apresentaram um tempo de retenção menor.

Os padrões das monoaminas em concentrações de 1 mM de dopamina e seus metabólitos DOPAC e HVA, serotonina e seu metabólito 5HIAA, e de noradrenalina foram diluídos em solução de ácido clorídrico 0,1 M contendo 0,02% de Na₂S₂O₅, distribuídos em tubos de polipropileno do tipo *ependorf* de 1,5 mL e em seguida congelados em freezer -80 °C por período não superior a 2 meses. No momento da análise os padrões foram descongelados e diluídos 2.500 a 10.000 vezes com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M. Todos os dias antes do início das corridas analíticas, foram injetados intercaladamente os padrões. A curva de calibração é obtida com o auxílio de 3 concentrações diferentes de padrão.

Para a dosagem dos aminoácidos, 100 µL dos homogenatos de cada amostra armazenados em tubos tipo *ependorf* foram acondicionados em caixa térmica com gelo seco e levadas para o Instituto Butantan (Unidade de Bioquímica e Biofísica sob os cuidados do Dr. Ivo Lebrun). As amostras foram liofilizadas e armazenadas. No momento da dosagem do aminoácido (GABA), as amostras foram novamente diluídas.

Para a avaliação do GABA a derivação com fenil-isotiocianato e HPLC (HP modelo Chemstation série 1100) com coluna 4,6 x 250 nm Beckman 5 μ Ultrasphere ODS-PHT, e um injetor de amostras (válvula para 1,0 mL) (HEINRIKSON; MEREDITH, 1984) foram usados.

4.6 Delineamento Experimental

4.6.1 Experimento 1: Efeitos da administração aguda de fipronil sobre a atividade geral de ratos no Campo Aberto.

Os ratos receberam fipronil (1,0; 10,0; 30,0; ou 100,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água, por *gavage*, em dose única (N = 10 animais por grupo). Uma hora, 24 e 48 horas e 7 dias após a administração os ratos foram colocados no campo aberto e observados por 5 minutos, conforme descrito no item 4.5.1.1, intercalando-se os animais dos diferentes grupos.

4.6.2 Experimento 2: Efeitos da administração aguda de fipronil sobre o comportamento de ratos no Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

Os mesmos animais provenientes do Experimento 1 foram utilizados neste experimento. Imediatamente após a observação no campo aberto, os animais foram inseridos e observados no labirinto em cruz elevado, conforme descrito no item 4.5.1.2.

4.6.3 Experimento 3: Efeitos da administração aguda de fipronil sobre a dose convulsivante mínima (DCM) de picrotoxina em ratos.

Os ratos receberam fipronil (1,0; 10,0; 30,0; ou 100,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água, por *gavage* (N = 6 animais por grupo). Uma hora após a administração, os ratos receberam, picrotoxina (7 mg/mL), por via subcutânea, conforme descrito no item 4.5.2. Imediatamente após a manifestação de convulsão tônico-clônica, suspendeu-se a administração da droga, sendo possível calcular a dose convulsivante mínima (DCM) para cada animal.

4.6.4 Experimento 4: Efeitos da administração aguda de fipronil sobre a dose convulsivante mínima (DCM) de pentilenotetrazol em ratos.

Os ratos receberam fipronil (1,0; 10,0; 30,0; ou 100,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água, por *gavage* (N = 6 animais por grupo). Uma hora após a administração, os ratos receberam, pentilenotetrazol (70 mg/mL), por via subcutânea, conforme descrito no item 4.5.2. Imediatamente após a manifestação de convulsão tônico-clônica, suspendeu-se a administração da droga, sendo possível calcular a dose convulsivante mínima (DCM) para cada animal.

4.6.5 Experimento 5: Efeitos da administração aguda de fipronil sobre a determinação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos.

Os ratos receberam fipronil (1,0; 10,0; 30,0; ou 100,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água, por *gavage* (N = 10 animais por grupo). Uma hora após a administração os ratos foram submetidos à eutanásia por decapitação em guilhotina, sendo feita a coleta dos tecidos para posterior determinação dos níveis de neurotransmissores e metabólitos, conforme descrito no item 4.5.3.

4.7 Análise Estatística

Empregou-se o software Graph Pad InStat v 3.01(GraphPad, 1998).

Foi utilizada a análise de variância ANOVA para dados paramétricos, seguido do teste de Tukey-Kramer para avaliar as possíveis diferenças entre os grupos.

O nível de significância crítico admitido para a rejeição da hipótese de nulidade foi de uma probabilidade de até 5% ($p < 0,05$) em todas as análises empregadas.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1: Efeitos da administração de dose única de fipronil sobre a atividade geral de ratos no Campo Aberto.

Os efeitos da administração de dose única de fipronil sobre a atividade geral de ratos observados no campo aberto são apresentados nas tabelas 1-3 e ilustrados pelas figuras 6-8.

Em relação à **distância percorrida**, a análise de variância ANOVA, seguida do teste de Tukey-Kramer mostrou que houve redução significativa entre os animais dos grupos tratados com fipronil e aqueles do grupo controle, uma hora após o tratamento, nas seguintes zonas do campo aberto: ARENA [$F(4,45) = 5,757$] para as doses de 1,0; 30,0; 100,0 mg/Kg ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,01$ respectivamente) e TIGMO [$F(4,45) = 6,141$; $p < 0,01$] para as doses de 1,0; 30,0; 100,0 mg/Kg. Não foram observadas diferenças entre os grupos nas demais áreas do campo aberto – tabela 1 e figura 6.

Considerando o **número de levantamentos**, a análise de variância ANOVA, seguida do teste de Tukey-Kramer, apontou redução significante desse parâmetro nos animais tratados com as doses de 30,0 e 100,0 mg/Kg em relação àqueles do grupo controle, uma hora após o tratamento, apenas na ARENA [$F(4,45) = 5,573$; $p < 0,01$] e na zona TIGMO [$F(4,45) = 5,986$; $p < 0,01$] – Tabela 1 e Figura 6.

A análise de variância ANOVA mostrou que não houve diferença entre o **tempo de grooming** (auto-limpeza) dos animais tratados, uma hora após o tratamento com fipronil e aquele dos animais do grupo controle na ARENA do campo aberto [$F(4,45) = 0,89$; $p > 0,05$] e na zona TIGMO [$F(4,45) = 1,03$; $p > 0,05$] como mostram a tabela 1 e a figura 6.

A análise de variância ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, mostrou também redução significativa entre o **tempo em movimento** dos animais tratados, **uma hora** após o tratamento com fipronil e aqueles dos animais do grupo controle na arena do campo aberto para as doses de 30,0 e 100,0 mg/Kg [$F(4,45) = 0,89$; $p < 0,05$] e na zona de tigmotaxia para as doses de 1,0 e 100 mg/Kg [$F(4,45) = 4,016$; $p < 0,05$], como mostram a tabela 1 e a figura 6.

A **velocidade média**, segundo a análise de variância ANOVA, seguida pelo teste de Tukey-Kramer, foi reduzida de forma significativa entre os animais tratados, **uma hora** após o tratamento com fipronil e aqueles dos animais do grupo controle na arena do campo aberto para as doses de 1,0; 30,0 e 100,0 mg/Kg [$F(4,45) = 5,761$; $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,01$ respectivamente] e na zona de tigmotaxia para as doses de 1,0; 30,0 e 100,0 mg/Kg [$F(4,45) = 5,673$; $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,01$ respectivamente] como mostram a tabela 1 e a figura 6.

Os parâmetros avaliados **distância percorrida, número de levantamentos, velocidade média, tempo de grooming, tempo em movimento e velocidade média** não sofreram alterações significantes, segundo a análise de variância ANOVA entre os animais tratados, **24 e 48 horas** após o tratamento com fipronil e aqueles dos animais do grupo controle como mostram as Tabelas 2-3 e as Figura 7-8, exceto após 48 horas do tratamento, a análise de variância ANOVA, seguida pelo teste de Tukey-kramer mostrou um aumento entre o **tempo de grooming** dos animais da dose de 10,0 mg/kg na arena [$F(4,42) = 3,184$; $p < 0,05$] e na zona de tigo [$F(4,42) = 3,184$; $p < 0,05$] quando comparados ao grupo controle.

No intervalo de observações do comportamento dos animais, entre 24 e 48 horas após o tratamento com o fipronil, houve morte de 4 animais expostos a maior dose utilizada de 100,0 mg/Kg, um destes animais foi inserido e avaliado no campo aberto, porém segundos após a inserção no LCE foi a óbito. Os animais apresentaram mioclonias e convulsões antes da morte, antes de serem inseridos no campo aberto. Entre o período de 48 horas e 7 dias após o tratamento com o fipronil, houve morte de mais 2 animais expostos a 100,0 mg/Kg. No total foram 6 mortes de animais expostos a dose de 100 mg/Kg.

Devido a alta letalidade e o número reduzido de animais no período de 7 dias após o tratamento, não foi possível realizar a análise estatística neste período.

Tabela 1 - Comportamento de ratos observados no campo aberto uma hora após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 100,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, seguida do teste Tukey-Kramer, *p<0,05, **p<0,01)

Parâmetros	Zonas	Controle	Fipronil (mg/kg)			
			1 (N=10)	10 (N=10)	30 (N=10)	100 (N=10)
Distancia percorrida (cm)	Arena	2764,10 ± 256,23	1874,0 ± 125,62*	2398,80 ± 242,76	1792,40 ± 161,11**	1696,8 ± 125,46**
	Tigmo	2453,90 ± 199,84	1651,90 ± 73,94**	2069,00 ± 213,02	1602,90 ± 150,30**	1488,9 ± 132,55**
	Externa	240,36 ± 64,50	159,23 ± 46,07	246,87 ± 42,97	123,28 ± 23,95	135,64 ± 20,56
	Média	53,80 ± 13,05	40,97 ± 14,64	55,42 ± 22,02	35,04 ± 9,79	48,20 ± 14,99
	Interna	13,05 ± 6,90	21,78 ± 8,03	27,56 ± 13,01	31,17 ± 15,07	24,05 ± 8,84
Número de levantamentos	Arena	9,90 ± 2,27	4,90 ± 1,03	7,50 ± 1,85	2,00 ± 0,53**	2,20 ± 0,71**
	Tigmo	8,80 ± 1,99	4,50 ± 0,93	6,10 ± 1,41	1,70 ± 0,42**	2,00 ± 0,53**
	Externa	0,90 ± 0,34	0,30 ± 0,15	1,20 ± 0,48	0,20 ± 0,13	0,10 ± 0,10
Tempo de grooming (s)	Arena	28,80 ± 6,97	47,76 ± 8,64	29,89 ± 8,04	38,46 ± 9,25	35,62 ± 7,28
	Tigmo	28,38 ± 7,08	47,58 ± 8,66	28,05 ± 7,21	37,84 ± 9,05	35,62 ± 7,28
Tempo em movimento (s)	Arena	131,69 ± 16,12	78,00 ± 8,09	115,80 ± 17,91	75,60 ± 13,72*	73,72 ± 8,15*
	Tigmo	116,22 ± 13,38	68,50 ± 6,16*	100,44 ± 14,94	69,52 ± 13,03	65,70 ± 7,95*
	Externa	11,92 ± 3,24	6,81 ± 2,24	11,85 ± 2,83	4,56 ± 1,31	5,40 ± 1,07
	Média	2,80 ± 0,71	2,10 ± 0,64	2,80 ± 1,11	1,00 ± 0,36	2,07 ± 0,75
	Interna	0,57 ± 0,34	0,58 ± 0,36	0,70 ± 0,38	0,51 ± 0,39	0,55 ± 0,22
Velocidade média (cm/s)	Arena	9,21 ± 0,85	6,24 ± 0,41*	8,00 ± 0,80	5,97 ± 0,53**	5,66 ± 0,41**
	Tigmo	9,05 ± 0,83	6,08 ± 0,34*	7,97 ± 0,81	5,93 ± 0,55**	5,73 ± 0,37**
	Externa	11,14 ± 0,96	7,55 ± 0,86	9,42 ± 1,40	8,56 ± 1,80	6,62 ± 0,66
	Média	11,85 ± 2,02	9,45 ± 2,02	6,63 ± 1,48	2,49 ± 8,47	7,31 ± 1,01
	Interna	8,23 ± 4,17	5,86 ± 2,95	3,16 ± 1,12	4,08 ± 1,33	8,38 ± 2,58

Figura 6 - Comportamento de ratos observados no campo aberto uma hora após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, seguida do teste Tukey-Kramer, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Tabela 2 - Comportamento de ratos observados no campo aberto **24 horas** após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, $p > 0,05$)

Parâmetros	Zonas	Controle	Fipronil (mg/kg)			
			1 (N=9)	10 (N=10)	30 (N=10)	100 (N=10)
Distancia percorrida (cm)	Arena	2345,80 ± 461,20	1667,90 ± 286,17	1664,80 ± 114,76	1783,10 ± 176,90	2090,90 ± 618,96
	Tigmo	2112,10 ± 326,25	1623,60 ± 265,08	1616,60 ± 100,49	1751,40 ± 174,48	1730,30 ± 336,47
	Externa	106,93 ± 65,02	37,75 ± 22,06	43,34 ± 14,98	26,29 ± 8,40	43,48 ± 15,75
	Média	18,46 ± 12,19	2,74 ± 2,37	2,42 ± 2,10	2,24 ± 2,24	18,27 ± 6,81
	Interna	3,64 ± 3,05	2,58 ± 2,58	2,47 ± 2,47	3,12 ± 3,12	4,86 ± 3,20
Número de levantamentos	Arena	6,70 ± 2,74	2,33 ± 0,50	3,00 ± 0,55	2,20 ± 1,01	1,10 ± 0,27
	Tigmo	6,40 ± 2,70	2,33 ± 0,50	2,90 ± 0,52	2,20 ± 1,01	1,10 ± 0,27
Tempo de grooming (s)	Arena	24,06 ± 7,17	44,50 ± 13,82	52,08 ± 10,21	48,88 ± 15,57	56,25 ± 16,68
	Tigmo	23,95 ± 7,20	43,40 ± 14,15	52,06 ± 10,21	48,87 ± 15,57	56,01 ± 16,74
Tempo em movimento (s)	Arena	79,74 ± 18,75	59,51 ± 17,53	60,60 ± 7,72	73,44 ± 12,60	59,17 ± 9,84
	Tigmo	74,47 ± 16,08	58,25 ± 16,90	57,79 ± 6,78	71,88 ± 12,41	56,04 ± 9,26
	Externa	3,99 ± 2,77	1,08 ± 0,86	2,49 ± 1,01	1,35 ± 0,50	1,74 ± 0,67
	Média	0,84 ± 0,52	0,11 ± 0,078	0,13 ± 0,10	0,10 ± 0,10	0,55 ± 0,24
	Interna	0,12 ± 0,10	0,06 ± 0,06	0,18 ± 0,18	0,10 ± 0,10	0,12 ± 0,08
Velocidade média (cm/s)	Arena	7,82 ± 1,53	5,56 ± 0,95	5,55 ± 0,38	5,94 ± 0,59	6,97 ± 2,06
	Tigmo	7,42 ± 1,28	5,53 ± 0,93	5,52 ± 0,37	5,92 ± 0,58	6,01 ± 1,20
	Externa	8,21 ± 2,42	5,77 ± 1,61	5,81 ± 1,28	6,56 ± 1,12	6,83 ± 1,40
	Média	4,41 ± 2,57	4,30 ± 3,58	2,42 ± 2,00	2,13 ± 2,13	4,57 ± 1,38
	Interna	6,76 ± 4,56	3,87 ± 3,87	1,37 ± 1,37	0,59 ± 0,59	1,83 ± 1,06

Figura 7 - Comportamento de ratos observados no campo aberto **24 horas** após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, $p > 0,05$)

Tabela 3 - Comportamento de ratos observados no campo aberto **48 horas** após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 100,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA seguida do teste Tukey-Kramer, *p<0,05)

Parâmetros	Zonas	Controle	Fipronil (mg/kg)			
			1 (N=10)	10 (N=10)	30 (N=10)	100 (N=7)
Distancia percorrida (cm)	Arena	1562,90 ± 234,88	1318,90 ± 152,42	1851,40 ± 223,55	1660,20 ± 251,27	1470,60 ± 105,07
	Tigmo	1484,90 ± 188,84	1287,10 ± 143,43	1784,90 ± 215,52	1605,60 ± 243,30	1289,50 ± 138,31
	Externa	51,93 ± 30,50	31,16 ± 10,37	48,09 ± 18,70	37,79 ± 12,39	65,81 ± 32,91
	Média	14,87 ± 12,06	5,09 ± 3,39	14,83 ± 6,84	15,64 ± 6,73	14,66 ± 7,75
	Interna	8,51 ± 6,46	1,78 ± 1,78	3,55 ± 2,28	0,66 ± 0,66	5,34 ± 4,20
Número de levantamentos	Arena	1,50 ± 0,47	1,30 ± 0,39	2,90 ± 0,56	1,70 ± 0,65	7,00 ± 5,83
	Tigmo	1,50 ± 0,47	1,30 ± 0,39	2,90 ± 0,56	1,70 ± 0,65	1,42 ± 0,36
Tempo de grooming (s)	Arena	19,11 ± 5,67	30,66 ± 9,39	60,58 ± 13,32*	44,82 ± 10,39	21,00 ± 5,96
	Tigmo	19,09 ± 5,67	30,66 ± 9,39	60,58 ± 13,32*	44,77 ± 10,39	21,00 ± 5,96
Tempo em movimento (s)	Arena	46,84 ± 13,73	48,27 ± 7,91	66,15 ± 12,47	63,37 ± 17,57	67,88 ± 23,91
	Tigmo	43,81 ± 11,91	38,29 ± 9,77	62,92 ± 11,93	61,17 ± 17,18	41,46 ± 10,05
	Externa	1,92 ± 1,12	1,42 ± 0,52	2,32 ± 0,89	1,26 ± 0,62	1,56 ± 0,60
	Média	0,60 ± 0,45	0,18 ± 0,12	0,67 ± 0,29	0,82 ± 0,39	0,68 ± 0,47
	Interna	0,40 ± 0,34	0,07 ± 0,07	0,22 ± 0,16	0,07 ± 0,07	0,23 ± 0,15
Velocidade média (cm/s)	Arena	5,21 ± 0,78	4,39 ± 0,50	6,17 ± 0,74	5,53 ± 0,83	7,31 ± 2,50
	Tigmo	5,18 ± 0,76	4,34 ± 0,48	6,09 ± 0,73	5,49 ± 0,83	7,72 ± 2,95
	Externa	4,37 ± 1,58	6,50 ± 2,17	6,45 ± 2,27	6,39 ± 1,55	5,37 ± 1,81
	Média	6,47 ± 4,02	5,80 ± 3,92	8,22 ± 4,14	4,54 ± 2,00	3,82 ± 1,96
	Interna	4,77 ± 3,68	2,37 ± 2,37	5,80 ± 3,06	0,88 ± 0,88	3,25 ± 2,12

Figura 8 - Comportamento de ratos observados no campo aberto **48 horas** após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA seguida do teste Tukey-Kramer, * $p < 0,05$)

5.2 Experimento 2: Efeitos da administração aguda de fipronil sobre o comportamento de ratos no labirinto em cruz elevado (LCE)

Os efeitos da administração de dose única de fipronil sobre o comportamento de ratos no LCE são apresentados nas Tabelas 4-6 e ilustrados pelas Figuras 9-11.

Análise de variância ANOVA, seguida do teste de Tukey-Kramer demonstrou redução significativa do **número de entradas** nos braços fechados em ratos, uma hora após o tratamento com doses de 30,0 e 100,0 mg/Kg de fipronil, quando comparados com animais do grupo controle [$F(4,45) = 3,186$; $p < 0,05$]. Não foram observadas diferenças significantes entre os animais tratados e os animais do grupo controle, em relação ao **número de entradas** nos braços abertos [$F(4,45) = 1,091$; $p > 0,05$] e na área central do labirinto em cruz elevado [$F(4,45) = 2,469$; $p > 0,05$] tabela 4 e figura 9.

Análise de variância ANOVA não apontou diferenças significantes entre os grupos controle e tratados, uma hora após o tratamento, em relação ao **tempo de permanência** nos braços fechados [$F(4,45) = 1,381$; $p > 0,05$] nos braços abertos [$F(4,45) = 0,4285$; $p > 0,05$] e na área central [$F(4,45) = 1,037$; $p > 0,05$] – tabela 4 e figura 9.

A **distância percorrida** nos braços fechados foi reduzida em animais expostos a dose de 30 mg/Kg de fipronil, uma hora após o tratamento, quando comparados com animais do grupo controle [$F(4,45) = 2,958$, $p < 0,05$] – tabela 4 e figura 9.

A análise de variância ANOVA, seguida do teste de Tukey-Kramer, mostrou diferença significativa no **número de movimentos iniciados** na arena do LCE entre animais tratados com fipronil nas doses de 1,0; 30,0 e 100,0 mg/Kg, uma hora após o tratamento, e aqueles do grupo controle [$F(4,45) = 3,657$; $p < 0,05$] – tabela 4 e figura 9.

Os parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado: **distância percorrida, número de entradas, tempo de permanência, tempo em movimento e número de movimentos iniciados** não sofreram alterações significantes, segundo a análise de variância ANOVA entre os animais tratados, **24 e 48h** após o tratamento com fipronil e aqueles dos animais do grupo controle como mostram as tabelas 5-6 e as figuras 10-11.

Tabela 4 - Comportamento de ratos observados no labirinto em cruz elevado uma hora após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, seguida do teste Tukey-Kramer, *p<0,05, **p<0,01)

Parâmetros	Zonas	Controle	Fipronil (mg/kg)			
			1 (N=10)	10 (N=10)	30 (N=10)	100 (N=10)
Número de entradas	Braços Abertos	5,20 ± 1,37	3,20 ± 0,82	3,90 ± 0,72	4,00 ± 1,02	2,60 ± 0,47
	Braços Fechados	12,90 ± 2,71	6,70 ± 1,73	8,50 ± 1,49	5,70 ± 0,88*	5,60 ± 1,06*
	Área Central	13,90 ± 3,12	7,50 ± 2,31	7,40 ± 1,42	6,90 ± 1,60	6,00 ± 0,76
Tempo de permanência (s)	Braços Abertos	18,24 ± 4,37	11,01 ± 2,46	16,36 ± 4,23	16,42 ± 8,27	11,73 ± 2,66
	Braços Fechados	261,72 ± 9,10	282,50 ± 4,03	267,96 ± 6,26	241,89 ± 27,00	275,96 ± 3,78
	Área Central	18,69 ± 5,48	10,11 ± 2,10	13,12 ± 2,93	40,86 ± 26,98	11,91 ± 1,58
Distância Percorrida (cm)	Braços Abertos	90,41 ± 22,97	50,09 ± 14,14	79,67 ± 22,95	70,10 ± 33,05	47,77 ± 13,61
	Braços Fechados	1069,30 ± 125,85	827,07 ± 74,11	920,35 ± 55,06	692,17 ± 90,96*	774,38 ± 67,62
	Área Central	97,48 ± 26,71	50,50 ± 9,63	57,42 ± 12,51	92,53 ± 38,31	51,23 ± 6,03
	Arena	1269,80 ± 167,07	909,51 ± 74,11	1076,6 ± 70,42	863,24 ± 61,48*	875,45 ± 75,95*
Número de movimentos iniciados	Braços Abertos	1,50 ± 0,42	0,90 ± 0,34	1,30 ± 0,55	1,10 ± 0,54	0,60 ± 0,26
	Braços Fechados	13,50 ± 3,18	6,40 ± 1,31	9,30 ± 1,20	6,30 ± 1,26	7,40 ± 1,77
	Área Central	2,40 ± 0,90	0,70 ± 0,33	0,50 ± 0,26	1,10 ± 0,54	0,50 ± 0,22
	Arena	18,00 ± 3,87	7,80 ± 1,80*	11,50 ± 1,34	7,80 ± 1,42*	8,60 ± 1,90*
Tempo em movimento (s)	Braços Abertos	2,76 ± 0,89	1,62 ± 0,60	1,63 ± 0,70	2,11 ± 1,03	1,11 ± 0,54
	Braços Fechados	30,91 ± 7,29	13,65 ± 2,62*	19,29 ± 2,34	12,64 ± 2,08*	14,04 ± 2,63*
	Área Central	2,88 ± 0,90	0,53 ± 0,19**	0,88 ± 0,32*	0,49 ± 0,23**	0,52 ± 0,15**
	Arena	37,00 ± 8,54	16,41 ± 2,97*	22,38 ± 2,69	15,43 ± 2,56*	15,69 ± 2,79*

Figura 9 - Comportamento de ratos observados no labirinto em cruz elevado uma hora após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, seguida do teste Tukey-Kramer, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Tabela 5 - Comportamento de ratos observados no labirinto em cruz elevado **24 horas** após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, $p>0,05$)

Parâmetros	Zonas	Controle	Fipronil (mg/kg)			
			1 (N=9)	10 (N=10)	30 (N=10)	100 (N=10)
Número de entradas	Braços Abertos	4,70 ± 2,11	2,11 ± 0,80	1,70 ± 0,68	1,10 ± 0,67	1,90 ± 0,72
	Braços Fechados	10,70 ± 2,39	5,11 ± 1,80	7,70 ± 2,92	3,50 ± 0,84	3,10 ± 0,79
	Área Central	10,90 ± 4,01	5,33 ± 1,92	2,70 ± 1,06	3,30 ± 1,47	2,70 ± 0,91
Tempo de permanência (s)	Braços Abertos	16,75 ± 9,92	4,57 ± 1,31	9,01 ± 5,42	6,58 ± 3,38	8,14 ± 3,46
	Braços Fechados	264,12 ± 15,03	289,02 ± 3,58	255,53 ± 27,70	283,44 ± 7,93	257,43 ± 28,82
	Área Central	17,25 ± 5,93	8,08 ± 2,53	4,38 ± 1,81	9,88 ± 7,07	5,32 ± 2,06
Distância Percorrida (cm)	Braços Abertos	83,07 ± 54,89	13,41 ± 3,69	41,71 ± 27,96	21,81 ± 11,32	37,20 ± 15,76
	Braços Fechados	1108,50 ± 142,47	738,04 ± 91,09	835,16 ± 105,17	890,58 ± 289,62	782,09 ± 68,13
	Área Central	107,68 ± 34,05	34,40 ± 11,63	23,31 ± 9,18	37,57 ± 22,87	24,43 ± 7,62
	Arena	1303,40 ± 224,55	782,02 ± 100,91	915,37 ± 99,55	842,77 ± 86,46	1019,50 ± 310,42
Número de movimentos iniciados	Braços Abertos	1,30 ± 1,09	0,33 ± 0,23	0,70 ± 0,49	0,30 ± 0,21	0,40 ± 0,22
	Braços Fechados	12,00 ± 3,00	5,55 ± 2,02	6,10 ± 2,36	5,70 ± 1,58	6,0 ± 1,90
	Área Central	1,40 ± 0,65	0,77 ± 0,66	0,50 ± 0,22	0,50 ± 0,40	0,20 ± 0,13
	Arena	15,60 ± 4,02	6,33 ± 2,63	7,60 ± 2,32	6,60 ± 1,68	6,90 ± 1,82
Tempo em movimento (s)	Braços Abertos	1,83 ± 1,25	0,40 ± 0,23	1,38 ± 1,15	0,57 ± 0,49	1,20 ± 0,64
	Braços Fechados	30,84 ± 9,89	11,50 ± 4,35	12,55 ± 4,52	13,08 ± 4,22	12,21 ± 4,04
	Área Central	2,79 ± 1,44	0,23 ± 0,18	0,70 ± 0,27	0,51 ± 0,29	0,25 ± 0,12
	Arena	36,30 ± 12,74	11,80 ± 4,57	14,80 ± 4,48	14,19 ± 4,45	23,52 ± 9,55

Figura 10 - Comportamento de ratos observados no labirinto em cruz elevado **24 horas** após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, $p > 0,05$)

Tabela 6 - Comportamento de ratos observados no labirinto em cruz elevado **48 horas** após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, $p>0,05$)

Parâmetros	Zonas	Controle	Fipronil (mg/kg)			
			1 (N=10)	10 (N=10)	30 (N=10)	100 (N=6)
Número de entradas	Braços Abertos	3,10 ± 2,11	1,10 ± 0,50	2,40 ± 0,89	2,10 ± 0,82	2,33 ± 1,47
	Braços Fechados	11,10 ± 2,67	6,30 ± 1,75	11,50 ± 3,50	6,70 ± 1,82	8,83 ± 3,75
	Área Central	7,70 ± 2,88	3,20 ± 1,61	5,60 ± 1,96	5,10 ± 1,58	6,33 ± 3,63
Tempo de permanência (s)	Braços Abertos	20,77 ± 10,93	4,98 ± 2,74	18,45 ± 7,75	11,08 ± 4,30	5,37 ± 4,45
	Braços Fechados	263,19 ± 15,30	294,20 ± 3,73	271,67 ± 9,56	279,33 ± 6,14	285,68 ± 8,13
	Área Central	13,24 ± 6,14	3,46 ± 2,04	6,00 ± 2,69	8,34 ± 2,40	7,40 ± 3,91
Distância Percorrida (cm)	Braços Abertos	116,25 ± 69,85	23,93 ± 11,60	100,93 ± 41,03	59,41 ± 25,88	53,89 ± 50,69
	Braços Fechados	865,38 ± 145,09	638,48 ± 97,19	897,50 ± 102,39	848,46 ± 68,40	810,70 ± 180,87
	Área Central	66,21 ± 29,40	20,34 ± 11,37	43,07 ± 17,28	41,24 ± 13,79	41,13 ± 22,08
	Arena	1071,10 ± 221,17	665,80 ± 111,14	1059,90 ± 131,72	958,68 ± 103,83	940,54 ± 279,17
Número de movimentos iniciados	Braços Abertos	2,30 ± 1,77	0,40 ± 0,22	1,80 ± 0,69	0,90 ± 0,60	0,16 ± 0,16
	Braços Fechados	11,80 ± 3,58	4,70 ± 1,45	7,20 ± 2,04	7,90 ± 1,72	8,66 ± 5,41
	Área Central	0,80 ± 0,32	1,10 ± 0,73	1,50 ± 0,67	0,80 ± 0,41	1,16 ± 0,83
	Arena	15,30 ± 5,13	5,80 ± 2,08	10,60 ± 2,99	10,00 ± 2,53	10,16 ± 6,50
Tempo em movimento (s)	Braços Abertos	3,81 ± 2,89	1,13 ± 0,99	2,95 ± 1,28	1,77 ± 1,20	1,35 ± 1,35
	Braços Fechados	25,36 ± 8,42	8,38 ± 3,58	19,26 ± 5,84	17,17 ± 4,30	16,70 ± 10,12
	Área Central	1,93 ± 0,92	0,53 ± 0,27	1,63 ± 0,67	0,88 ± 0,52	0,80 ± 0,45
	Arena	32,07 ± 11,60	10,24 ± 3,86	23,97 ± 6,97	20,07 ± 5,60	19,05 ± 12,06

Figura 11 - Comportamento de ratos observados no labirinto em cruz elevado **48 horas** após receberem dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, $p > 0,05$)

5.3 Experimento 03: Efeitos da administração aguda de fipronil sobre a dose convulsivante mínima (DCM) de picrotoxina em ratos

A análise de variância ANOVA, seguida do teste de Tukey, não apontou diferença significativa da DCM de picrotoxina entre os grupos de animais tratados e dos animais do grupo controle [$F(4,25) = 1,790$; $p > 0,05$] – tabela 7 e figura 12.

Tabela 7- Dose convulsivante mínima (DCM) de picrotoxina (mg/Kg), uma hora após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 100,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, $p > 0,05$)

Droga	Controle	Fipronil (mg/kg)			
		1 (N=6)	10 (N=6)	30 (N=6)	100 (N=6)
Picrotoxina	8,35 ± 0,81	10,01 ± 0,78	8,74 ± 1,12	7,82 ± 0,92	6,92 ± 0,52

Figura 12 - Dose convulsivante mínima (DCM) de picrotoxina (mg/Kg), uma hora após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 100,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 6 por grupo. (ANOVA, $p > 0,05$)

5.4 Experimento 04: Efeitos da administração aguda de fipronil sobre a dose convulsivante mínima (DCM) de pentilenotetrazol em ratos

A análise de variância ANOVA, seguida do teste de Tukey, apontou diferenças significativas com a redução da DCM de pentilenotetrazol em animais tratados com 100,0 mg/Kg de fipronil em relação aos animais do grupo controle [$F(4,25) = 4,323$; $p < 0,05$] – tabela 8 e figura 13.

Tabela 8 - Dose convulsivante mínima (DCM) de pentilenotetrazol (mg/Kg), uma hora após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 100,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, seguida do teste Tukey-Kramer, * $p < 0,05$)

Droga	Controle	Fipronil (mg/kg)			
		1	10	30	100
		(N=6)	(N=6)	(N=6)	(N=6)
Pentilenotetrazol	98,15 ± 7,31	86,85 ± 6,46	65,91 ± 7,94	61,00 ± 12,70	52,44 ± 9,83*

Figura 13 - Dose convulsivante mínima (DCM) de pentilenotetrazol (mg/Kg), uma hora após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 100,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 6 por grupo. (ANOVA, seguida do teste Tukey-Kramer, * $p < 0,05$)

5.5 Experimento 05: Efeitos da administração aguda de fipronil sobre a determinação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos

A análise de variância ANOVA, não apontou diferenças significantes entre os animais tratados com o fipronil e os animais do grupo controle, em relação à concentração dos seguintes neurotransmissores e seus metabólitos no **córtex**: Noradrenalina (NOR) [F (4,44) = 0,2973; $p > 0,05$] e seu metabólito ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (VMA) [F (4,44) = 0,5580; $p > 0,05$]; dopamina (DA) [F(4,44) = 0,5858; $p > 0,05$] e seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) [F (4,44) = 0,8187; $p > 0,05$] e ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC) [F (4,44) = 0,3635; $p > 0,05$]; serotonina (5-HT) [F (4,44) = 0,2689; $p > 0,05$] e seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético (5HIAA). [F(4,44) = 0,1356; $p > 0,05$] – tabela 9 e figura 14.

A análise de variância ANOVA, não apontou diferenças significantes entre os grupos com relação à concentração dos seguintes neurotransmissores e seus metabólitos no **striatum**: Noradrenalina (NOR) [F (4,44) = 1,134; $p > 0,05$] e seu metabólito ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (VMA) [F (4,44) = 0,5450; $p > 0,05$]; dopamina (DA) [F(4,44) = 0,06914; $p > 0,05$] e seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) [F (4,44) = 0,2783; $p > 0,05$] e ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC) [F (4,44) = 0,1258; $p > 0,05$]; metabólito da serotonina ácido 5-hidroindol, 3-acético (5HIAA). [F(4,44) = 0,7444; $p > 0,05$]. Foi observado aumento significativo da concentração de serotonina (5-HT) nos animais tratados com a dose de 10 mg/Kg de fipronil, quando comparados ao grupo controle [F (4,44) = 2,936, $p < 0,05$] – tabela 10 e figura 15.

A análise de variância ANOVA, não apontou diferenças significantes em relação aos animais do grupo controle e os animais tratados com o fipronil com relação à concentração dos seguintes neurotransmissores e seus metabólitos no **hipotálamo**: Noradrenalina (NOR) [F (4,40) = 0,6779; $p > 0,05$] e seu metabólito ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (VMA) [F (4,40) = 0,6906; $p > 0,05$]; dopamina (DA) [F(4,40) = 0,3428; $p > 0,05$] e seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) [F (4,40) = 0,3797; $p > 0,05$] e ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC) [F (4,40) = 0,3493; $p > 0,05$]; serotonina (5-HT) [F (4,40) = 0,7628; $p > 0,05$] e seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético (5HIAA). [F(4,44) = 0,4988; $p > 0,05$] – tabela 11 e figura 16.

Tabela 9 - Concentração de neurotransmissores e respectivos metabólitos em ng/g de tecido no **córtex**, **uma hora** após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 100,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, $p > 0,05$)

Neurotrans- missores	Controle	Fipronil (mg/kg)			
		1	10	30	100
		(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=9)
NOR	515,89 ± 34,76	476,20 ± 39,69	481,83 ± 26,76	492,31 ± 29,74	474,90 ± 17,62
DA	1507,70 ± 245,68	1191,50 ± 263,06	1021,20 ± 198,12	1382,50 ± 283,81	1306,60 ± 218,19
5-HT	1170,40 ± 63,34	1225,40 ± 121,47	1198,10 ± 69,80	1305,00 ± 118,63	1221,50 ± 101,57
Metabólito	Controle	1	10	30	100
		(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=9)
		(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=9)
VMA	187,12 ± 22,49	242,24 ± 25,23	211,67 ± 28,97	197,93 ± 26,87	206,38 ± 36,41
DOPAC	249,16 ± 30,27	218,29 ± 42,50	201,99 ± 30,87	247,41 ± 41,03	246,70 ± 30,42
HVA	120,40 ± 12,89	100,98 ± 17,00	107,57 ± 15,71	139,54 ± 25,03	132,46 ± 16,61
5 HIAA	1062,60 ± 119,04	1637,60 ± 141,22	1538,50 ± 61,62	1601,40 ± 88,76	1561,30 ± 98,66

Noradrenalina (NOR) e seu metabólito ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (VMA); dopamina (DA), seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) e ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC); e serotonina (5-HT) e seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético (5HIAA).

Neurotransmissores e seus metabólitos no córtex

Figura 14 - Concentração de neurotransmissores e respectivos metabólitos em ng/g de tecido no **córtex**, **uma hora** após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, $p > 0,05$). Noradrenalina (NOR) e seu metabólito ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (VMA); dopamina (DA), seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) e ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC); e serotonina (5-HT) e seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético (5HIAA)

Tabela 10 - Concentração de neurotransmissores e respectivos metabólitos em ng/g de tecido no ***striatum***, **uma hora** após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 100,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (ANOVA, seguida do Teste de Tukey-Kramer *p<0,05)

Neurotrans- missores	Controle	Fipronil (mg/kg)			
		1	10	30	100
		(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=9)
NOR	328,44 ± 58,58	240,79 ± 26,93	603,30 ± 283,65	313,74 ± 60,88	276,66 ± 30,41
DA	5086,00 ± 970,66	4786,60 ± 1244,40	4854,90 ± 910,60	4826,10 ± 1036,10	4309,60 ± 973,55
5-HT	1078,50 ± 96,67	1017,20 ± 85,05	1540,60 ± 205,31*	1093,50 ± 102,20	1008,80 ± 134,36
Metabólito	Controle	1	10	30	100
		(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=9)
VMA	266,47 ± 21,48	284,26 ± 22,51	317,80 ± 48,43	356,25 ± 86,01	286,05 ± 24,84
DOPAC	803,29 ± 186,82	729,17 ± 165,95	720,13 ± 132,32	820,08 ± 130,05	692,67 ± 153,66
HVA	365,35 ± 86,83	307,87 ± 67,61	345,97 ± 62,53	399,85 ± 61,43	320,46 ± 65,36
5 HIAA	2531,30 ± 287,21	2415,80 ± 207,67	2846,30 ± 202,27	2810,20 ± 280,55	2376,40 ± 283,38

Noradrenalina (NOR) e seu metabólito ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (VMA); dopamina (DA), seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) e ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC); e serotonina (5-HT) e seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético (5HIAA).

Neurotransmissores e seus metabólitos no *striatum*

Figura 15 - Concentração de neurotransmissores e respectivos metabólitos em ng/g de tecido no *striatum*, uma hora após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média (ANOVA, seguida do Teste de Tukey-Kramer * $p < 0,05$). Noradrenalina (NOR) e seu metabólito ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (VMA); dopamina (DA), seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) e ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC); e serotonina (5-HT) e seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético (5HIAA)

Tabela 11 - Concentração de neurotransmissores em ng/g de tecido no **hipotálamo**, **uma hora** após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 100,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média (ANOVA, $p > 0,05$)

Neurotrans- missores	Controle	Fipronil (mg/kg)			
		1 (N=9)	10 (N=9)	30 (N=9)	100 (N=9)
NOR	2175,80 ± 205,58	1995,70 ± 231,96	1889,50 ± 310,99	1997,50 ± 160,22	1665,10 ± 199,36
DA	460,02 ± 53,44	720,96 ± 292,03	647,60 ± 200,75	688,31 ± 268,42	859,45 ± 321,25
5-HT	1819,00 ± 186,14	2018,70 ± 115,79	1734,70 ± 157,95	1946,90 ± 105,16	1970,80 ± 79,75

Metabólito	Controle	1 (N=10)	10 (N=10)	30 (N=10)	100 (N=9)
VMA	471,75 ± 138,84	619,90 ± 178,48	332,83 ± 59,08	410,33 ± 134,33	411,64 ± 103,86
DOPAC	120,05 ± 24,51	203,50 ± 63,22	183,13 ± 54,37	174,77 ± 60,30	185,24 ± 55,53
HVA	27,97 ± 5,23	40,28 ± 17,95	55,94 ± 28,61	42,51 ± 13,52	54,46 ± 19,37
5 HIAA	2423,60 ± 260,78	2546,90 ± 194,55	2166,60 ± 198,91	2416,80 ± 172,13	2420,10 ± 135,14

Noradrenalina (NOR) e seu metabólito ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (VMA); dopamina (DA), seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) e ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC); e serotonina (5-HT) e seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético (5HIAA).

Neurotransmissores e seus metabólitos no hipotálamo

Figura 16 - Concentração de neurotransmissores e respectivos metabólitos em ng/g de tecido no **hipotálamo**, uma hora após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média (ANOVA, $p > 0,05$). Noradrenalina (NOR) e seu metabólito ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (VMA); dopamina (DA), seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) e ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC); e serotonina (5-HT) e seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético (5HIAA)

Considerando as relações DOPAC/DA, HVA/DA, 5HIAA/5-HT e VMA/NOR como indicadores da taxa de renovação (*turnover*) de dopamina, serotonina e noradrenalina, no córtex e no hipotálamo a análise de variância ANOVA não mostrou diferenças entre os grupos. Para o córtex DOPAC/DA [$F(4,44) = 1,100$; $p > 0,05$]; HVA/DA [$F(4,44) = 0,2121$; $p > 0,05$]; $p > 0,05$]; 5HIAA/5-HT [$F(4,44) = 0,258$; $p > 0,05$]; VMA/NOR [$F(4,44) = 0,6635$; $p > 0,05$] – tabela 12 e figura 17. Para o hipotálamo DOPAC/DA [$F(4,40) = 0,3102$; $p > 0,05$]; HVA/DA [$F(4,40) = 0,7611$; $p > 0,05$]; 5HIAA/5-HT [$F(4,40) = 0,2526$; $p > 0,05$]; VMA/NOR [$F(4,40) = 0,2969$; $p > 0,05$] – tabela 12 e figura 19. Para o *striatum* as relações DOPAC/DA, HVA/DA e VMA/NOR não sofreram alterações DOPAC/DA [$F(4,44) = 1,773$; $p > 0,05$]; HVA/DA [$F(4,44) = 1,804$; $p > 0,05$]; VMA/NOR [$F(4,44) = 0,9397$; $p > 0,05$]. Enquanto a análise de

variância ANOVA, seguida do teste de Tukey-Kramer mostrou que a relação 5HIAA/5-HT [$F(4,44) = 4,615$; $p < 0,01$] foi alterada no grupo de animais tratados com a dose de 10 mg/kg quando comparados com os animais do grupo de 30 mg/Kg – tabela 12 e figura 18.

Tabela 12- Relações DOPAC/DA, HVA/DA e 5HIAA/5-HT, HVA/NOR como indicadores da taxa de renovação (*turnover*) de DA, 5HT e NOR, respectivamente em **córtex, striatum e hipotálamo** de ratos tratados com dose única de 1,0; 10,0; 30,0 e 100,0 mg/Kg, de fipronil ou 1mL/Kg de água destilada. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. (ANOVA, seguida do teste de Tukey-kramer; ^{a,b} $p < 0,01$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes.

Relação Neurotrans- missores/ Metabólitos	Controle	Fipronil (mg/kg)			
		1	10	30	100
		(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=9)
Córtex					
DOPAC/DA	0,19 ± 0,02	0,26 ± 0,05	0,22 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,01
HVA/DA	0,10 ± 0,02	0,14 ± 0,05	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,02
5 HIAA/5-HT	1.35 ± 0,04	1,35 ± 0,06	1,29 ± 0,04	1,28 ± 0,08	1,33 ± 0,09
VMA/NOR	0,38 ± 0,06	0,53 ± 0,07	0,45 ± 0,06	0,40 ± 0,06	0,44 ± 0,08
Striatum	Controle	1	10	30	100
		(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=9)
DOPAC/DA	0,148 ± 0,010	0,189 ± 0,035	0,144 ± 0,006	0,494 ± 0,246	0,158 ± 0,009
HVA/DA	0,068 ± 0,004	0,078 ± 0,008	0,070± 0,003	0,223 ± 0,109	0,079 ± 0,005
5 HIAA/5-HT	2,32 ± 0,08	2,39 ± 0,10	1,95± 0,13 ^a	2,59 ± 0,11 ^b	2,38 ± 0,08
VMA/NOR	1,23 ± 0,28	1,51 ± 0,38	0,82 ± 0,10	1,48 ± 0,35	1,18 ± 0,18
Hipotálamo	Controle	1	10	30	100
		(N=9)	(N=9)	(N=9)	(N=9)
DOPAC/DA	0,25 ± 0,04	0,30 ± 0,03	0,30 ± 0,05	0,27 ± 0,06	0,25 ± 0,02
HVA/DA	0,060 ± 0,005	0,056 ± 0,006	0,073± 0,011	0,069 ± 0,009	0,068 ± 0,007
5 HIAA/5-HT	5,75 ± 0,67	5,91 ± 0,89	4,91 ± 0,83	5,13 ± 0,60	5,55 ± 1,02
VMA/NOR	0,22 ± 0,07	0,28 ± 0,06	0,23 ± 0,06	0,19 ± 0,04	0,27 ± 0,05

Noradrenalina (NOR) e seu metabólito ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (VMA); dopamina (DA), seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) e ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC); e serotonina (5-HT) e seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético (5HIAA).

Figura 17 - Relações DOPAC/DA, HVA/DA e 5HIAA/5-HT, VMA/NOR como indicadores da taxa de renovação (*turnover*) de DA, 5-HT e NOR, respectivamente no **córtex** de ratos tratados com dose única de 1,0; 10,0; 30,0 e 100,0 mg/Kg, de fipronil ou 1mL/Kg de água destilada. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. (ANOVA, $p > 0,05$).

Figura 18 - Relações DOPAC/DA, HVA/DA e 5HIAA/5-HT, VMA/NOR como indicadores da taxa de renovação (*turnover*) de DA, 5-HT e NOR, respectivamente em *striatum* de ratos tratados com dose única de 1,0; 10,0; 30,0 e 100,0 mg/Kg, de fipronil ou 1mL/Kg de água destilada. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. (ANOVA, seguida do teste de Tukey-kramer; ^{a,b} $p < 0,01$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes.

Figura 19 - Relações DOPAC/DA, HVA/DA e 5HIAA/5-HT, VMA/NOR como indicadores da taxa de renovação (*turnover*) de DA, 5-HT e NOR, respectivamente em **hipotálamo** de ratos tratados com dose única de 1,0; 10,0; 30,0 e 100,0 mg/Kg, de fipronil ou 1mL/Kg de água destilada. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. (ANOVA, $p > 0,05$).

A análise de variância ANOVA não apontou diferenças significantes entre os grupos nas concentrações de GABA no **córtex** [$F(4,45) = 1,329$ $p > 0,05$] e no **striatum** [$F(4,45) = 1,199$ $p > 0,05$]. Não foi possível fazer a avaliação dos níveis do GABA no hipotálamo – tabela 13 e figura 20.

Tabela 13 - Concentração do neurotransmissor ácido gamaminobutírico GABA em $\mu\text{g/g}$ de tecido no **córtex** e no **striatum**, uma hora após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 100,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média (ANOVA, $p>0,05$)

Neurotransmissor ($\mu\text{g/g}$)	Controle	Fipronil (mg/kg)			
		1 (N=10)	10 (N=10)	30 (N=10)	100 (N=9)
GABA no córtex	457,43 $\pm$ 42,36	453,24 $\pm$ 42,75	386,94 $\pm$ 42,38	516,23 $\pm$ 43,95	439,64 $\pm$ 28,00
		1 (N=10)	10 (N=9)	30 (N=10)	100 (N=9)
GABA no striatum	436,20 $\pm$ 30,81	567,49 $\pm$ 77,79	491,35 $\pm$ 64,82	585,68 $\pm$ 66,16	573,40 $\pm$ 56,53

Figura 20 - Concentração do neurotransmissor GABA em $\mu\text{g/g}$ de tecido no **córtex** e no **striatum** uma hora após o tratamento de ratos com dose única de fipronil (1,0; 10,0; 30,0 ou 100,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média (ANOVA, $p>0,05$)

6 DISCUSSÃO

Durante o estudo foram observadas mortes de animais apenas na maior dose utilizada de 100,0 mg/Kg de fipronil. O intervalo de observações do comportamento dos animais, entre 24 e 48 horas após o tratamento com o fipronil, houve morte de 4 animais expostos a maior dose utilizada de 100,0 mg/Kg. Os animais apresentaram tremores, mioclonias e convulsão antes da morte. Um dos animais foi inserido e avaliado no campo aberto, e segundos após ser colocado no LCE, apresentou convulsões e morte. Entre o período de 48 horas e 7 dias após o tratamento com o fipronil, houve morte de mais 2 animais expostos a 100,0 mg/kg. No total foram 6 mortes de animais, em um grupo de 10 animais, ou seja, 60% dos animais tratados com a dose de 100,0 mg/Kg.

Estes dados confirmam as observações feitas por Mohamed et al., 2004, que a toxicidade aguda para roedores é caracterizada por tremores, alteração na locomoção, agitação, crises convulsivas e mortes, em doses acima de 50 mg/Kg, por via intraperitoneal (ip). Esses autores observaram em camundongos, que a dose letal 50% (LD50) do fipronil, por via ip, foi de 41 mg/Kg de peso corporal e aquela do composto sulfonado foi de 50 mg/Kg. Em altas doses a morte dos animais ocorreu entre dois dias, enquanto as alterações no sistema nervoso central foram observadas em até sete horas após a exposição ao fipronil.

O fipronil de grau técnico tem LD50 por via oral, para ratos de 97 mg/Kg (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997); portanto, a maior dose utilizada no presente experimento está próxima do valor da LD50 para ratos. Por outro lado, a menor dose utilizada no presente experimento, isto é, de 1 mg/Kg, apresenta-se próximo da NOEL descrita em estudo feitos em ratos para a avaliação da neurotoxicidade do fipronil (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997).

A morte tardia dos animais, a partir de 24 horas após a administração do fipronil, pode estar correlacionada a biotransformação do fipronil. De fato, em mamíferos, o fipronil é biotransformado a um composto fipronil sulfona (ZHAO et al., 2005). Ensaio sobre ligações a receptores indicam que a ligação do composto sulfona aos receptores GABA de seres humanos e camundongos possuem alta afinidade (MOHAMED et al., 2004; ZHAO et al., 2005) e, ainda este composto apresenta toxicidade equivalente ao fipronil (MOHAMED et al., 2004). Acrescente-

se, também, que a meia-vida de eliminação em ratos machos foi de 183 horas e 245 horas em fêmeas, sendo que o fipronil radiomarcado se distribui por todos os tecidos, com maior predomínio no tecido adiposo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997).

No experimento 1, estudou-se a atividade geral dos ratos tratados com 1,0; 10,0; 30,0 e 100,0 mg/Kg de fipronil ou 1 mL/Kg de água destilada observados em um campo aberto uma hora, 24 e 48 horas após o tratamento. Os resultados obtidos mostraram diferenças significantes entre os grupos principalmente uma hora após a exposição oral ao fipronil, sendo observada redução da distância percorrida e do tempo em movimento dos animais tratados; houve também redução significativa do número de levantamentos nos animais tratados com 30,0 e 100,0 mg/kg de fipronil, quando comparados com os ratos do grupo controle, um hora após a última administração. Deve ser salientado que a exposição repetida ao campo aberto promove habituação caracterizada pela redução do comportamento exploratório (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1980), fato esse observado no presente experimento, tanto em ratos do grupo controle, como naqueles dos grupos experimentais.

Estes dados demonstram os efeitos neurocomportamentais do fipronil, uma hora após sua administração, caracterizados por redução da atividade geral dos ratos, principalmente na atividade locomotora, reflexo da redução na atividade exploratória horizontal e também da atividade exploratória vertical.

O levantar pode ser tido como a manifestação de um processo exploratório de aproximação por parte do animal das regiões modificadas do ambiente, ou, de modo alternativo, como expressão de um estado de ativação generalizada da qual faltaria o componente exploratório (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1980).

No LCE foi observada, no presente estudo, redução significativa do número de entradas nos braços fechados em ratos, uma hora após o tratamento com doses de 30,0 e 100,0 mg/Kg de fipronil, redução da distância percorrida nos braços fechados nos animais expostos a dose de 30 mg/kg de fipronil e redução no número de movimentos iniciados na arena do LCE nos animais dos grupos das doses de 1,0; 30,0 e 100,0 mg/Kg. Não foram observadas diferenças significantes no número de entradas nos braços abertos. Estes dados confirmam as alterações observadas no campo aberto. Os animais apresentaram diminuição na atividade geral e menor

atividade exploratória, permanecendo mais tempo em local fechado (braços fechados).

Sabe-se que drogas ansiolíticas elevam o tempo gasto pelos roedores nos braços abertos quando comparados com o tempo gasto nos braços fechados e, em contraste, drogas ansiogênicas diminuem o tempo gasto nos braços abertos (PELLOW; FILE, 1985). Contudo, não se pode sugerir um ansiogênico do fipronil no LCE, pois foram observados efeitos relevantes no campo aberto que indicam comprometimento motor.

O controle das convulsões envolve o sistema GABAérgico (SPINOSA; BERNARDI, 2002). A susceptibilidade e a severidade da convulsão – que representa uma descarga elétrica neuronal anormal e excessiva, podendo ou não ser acompanhada por perda de consciência, movimentos motores e fenômenos viscerais sensoriais e psíquicos – são afetadas, entre outros, por manipulações de sistemas catecolaminérgicos, GABAérgicos, serotoninérgicos e colinérgicos centrais (SANDOVAL; PALERMO-NETO, 1985). Visando verificar os efeitos do fipronil em processos convulsivos, foram realizados os experimentos 3 e 4 nos quais a convulsão foi induzida quimicamente (picrotoxina e pentilenotetrazol).

A picrotoxina é um antagonista de receptores GABA_A e interage com um sítio específico no canal de cloreto, antagonizando seletivamente os efeitos inibitórios do GABA (GRAEFF, 1989).

O mecanismo de ação do pentilenotetrazol ainda não foi totalmente esclarecido. Esta droga parece interferir nos mecanismos GABAérgicos reduzindo seus efeitos inibitórios, além de possuir ação excitatória direta sobre os neurônios (OLSEN, 1982; FRANZ, 1985).

Os resultados obtidos na avaliação da dose convulsivante mínima foram: a diminuição significativa na dose de pentilenotetrazol necessária para a indução da convulsão em animais tratados com 100,0 mg/Kg de fipronil, quando comparado com os animais dos grupos controles, e ausência de efeitos significantes na dose convulsivante mínima da picrotoxina para a indução da convulsão em animais expostos ao fipronil. Esses achados mostram que o fipronil reduziu o limiar de convulsão induzido pelo pentilenotetrazol, reforçando a ação do fipronil no sistema nervoso central, por meio do envolvimento de diferentes sistemas de neurotransmissão nos seus efeito centrais, e não apenas do GABA, uma vez que em

ratos expostos ao fipronil não foi constatada alteração da dose convulsivante mínima da picrotoxina, droga de ação seletiva em receptores GABAérgicos.

O sistema nervoso central é uma reunião de sistemas neurais inter-relacionados que regulam sua própria atividade e as funções de outros sistemas por mecanismos dinâmicos e complexos, basicamente por meio da neurotransmissão química intercelular (BLOOM, 1996; NESTLER et al., 2001; COOPER et al., 2003 apud GOODMAN, GILMAN, 2006). Diferentes neurônios no sistema nervoso central liberam também diversos neurotransmissores.

A fim de avaliar os efeitos do fipronil nos níveis dos neurotransmissores e respectivos metabólitos em diferentes áreas do sistema nervoso central foi realizado o experimento 5. Avaliou-se também a relação metabólito/neurotransmissor como indicador da taxa de renovação (*turnover*).

A norepinefrina, dentre os neurotransmissores presentes no sistema nervoso central existe em quantidades relativamente grandes no hipotálamo e em algumas áreas do sistema límbico. Contudo, essa catecolamina também está presente em quantidades significativas, embora menores, na maioria das regiões do cérebro (NESTLER et al., 2001; COOPER et al., 2003 apud GOODMAN, GILMAN, 2006). No presente trabalho, em relação à determinação dos níveis de noradrenalina, não foram observadas alterações estatisticamente significantes no córtex, *striatum* e hipotálamo, sugerindo que esse neurotransmissor não está envolvido com os efeitos centrais do fipronil.

A dopamina é um neurotransmissor que se distribui irregularmente pelas várias porções do sistema nervoso central (BERNARDI et al., 1980). Na realidade, mais da metade da quantidade de catecolaminas presentes no cérebro corresponde à dopamina, sendo que níveis extremamente altos são encontrados nos núcleos da base (especialmente no núcleo caudado e putâmem, que se denomina neo-estriado no homem e *striatum* em roedores), núcleo acumbens, tubérculo olfatório, núcleo central da amígdala, eminência mediana e áreas bem delimitadas do córtex frontal (NESTLER et al., 2001; COOPER et al., 2003; SHEPHERD et al., 2003 apud GOODMAN; GILMAN, 2006).

A dopamina é, em grande parte, recaptada após a sua liberação das terminações nervosas por um transportador específico de dopamina, que pertence a grande família dos transportadores de monoaminas. Essa amina é metabolizada pela monoamina oxidase (MAO) e catecolamina O-metiltransferase (COMT), sendo

os principais produtos o ácido diidroxifenilacético (DOPAC) e o ácido homovanílico (HVA, derivado metóxi do DOPAC) (RANG et al., 2004).

Sabe-se que a dopamina estriatal está envolvida com a função motora (BERNARDI; PALERMO NETO, 1980; JANKOVIC, 1997) e ainda que outros neurotransmissores como o GABA e acetilcolina tem também papel relevante no controle motor (SOUZA; PALERMO NETO, 1981, 1982; JANKOVIC, 1997).

No presente experimento, considerando os níveis de dopamina não foram observadas alterações significantes desse neurotransmissor no córtex, no *striatum* e no hipotálamo dos animais tratados com o fipronil. Da mesma forma, com relação aos metabólitos (DOPAC e HVA) e também o *turnover* de dopamina, não foram observadas alterações estatisticamente significantes entre os grupos em nenhuma das áreas do cérebro avaliadas.

Esses dados sugerem a ausência da participação do sistema dopaminérgico nos efeitos central do fipronil, da mesma forma que foi observada com a outra catecolamina estudada, a norepinefrina.

A serotonina 5-HT assemelha-se à norepinefrina na sua síntese, armazenamento e liberação. Seu precursor é o triptofano, um aminoácido derivado da proteína dietética, cujo nível plasmático varia de modo considerável, de acordo com a ingestão de alimentos e o momento do dia (RANG et al., 2004).

A distribuição dos neurônios que contêm 5-HT assemelha-se à dos neurônios noradrenérgicos. Os corpos celulares são agrupados na ponte e na porção superior da medula oblonga próximo à linha mediana (rafe), sendo freqüentemente chamado de núcleos da rafe. Os núcleos de localização rostral projetam-se, através do feixe prosencefálico medial, para muitas partes do córtex, hipocampo, núcleos da base, sistema límbico e hipotálamo. As células de localização caudal projetam-se para o cerebelo, a medula oblonga e a medula espinhal (HANG et al., 2003).

A principal via de degradação da 5-HT envolve a desaminação oxidativa pela MAO, com formação de um intermediário acetaldeído; o aldeído é convertido em ácido 5-hidroxindolacético (5HIAA) por uma enzima ubíqua, a aldeído desidrogenase (SANDERS-BUSH; MAYER in GOODMAN, GILMAN, 2006).

No presente trabalho, a administração aguda do fipronil em ratos provocou um aumento estatisticamente significativo nos níveis de 5-HT apenas no *striatum* e em animais tratados com a dose de 10,0 mg/Kg. Em relação ao metabólito 5HIAA, não

se observou redução de seus níveis. Esses achados podem indicar pouca relevância também do sistema serotoninérgico nos efeitos centrais do fipronil.

A transmissão sináptica rápida na maioria das sinapses do sistema nervoso central é mediada pelos neurotransmissores aminoácidos, como o GABA, o glutamato e a glicina, os quais podem estar envolvidos na transmissão de até 90% de todas as sinapses do sistema nervoso central (SPINOSA et al, 2006).

Em relação aos níveis dos neurotransmissores GABA, no presente trabalho, não houve alteração significativa entre os grupos em nenhuma das regiões cerebrais estudadas (isto é, no córtex, no *striatum* e no hipotálamo), excluindo também a participação do GABA nos possíveis efeitos centrais do fipronil, embora esse inseticida sabidamente atue em receptores GABAérgicos.

Por outro lado, deve ser salientado que a ausência de alterações nas concentrações dos neurotransmissores (exceto da serotonina) e respectivos metabólitos nas três regiões cerebrais aqui estudadas, não exclui completamente a participação desses sistemas centrais de neurotransmissão nos efeitos do fipronil, pois talvez apenas uma hora após sua administração (quando os ratos foram submetidos a eutanásia para retirada dos tecidos cerebrais) não seja tempo suficiente para caracterizar a participação de um dado neurotransmissor, embora já seja possível observar alterações comportamentais relevantes. Talvez fosse necessário aguardar tempo maior para as dosagens neuroquímicas antes de submeter os animais tratados com fipronil à eutanásia, para melhor caracterizar os seus efeitos centrais empregando esse tipo de avaliação.

Finalizando, os resultados do presente estudo mostraram que ratos expostos a dose única de fipronil apresentaram alterações comportamentais, caracterizadas por redução da atividade motora no campo aberto, no labirinto em cruz elevado e na dose convulsivante mínima do pentilenotetrazol. Além disso, a maior dose de fipronil (100 mg/Kg) causou a morte de 60% dos ratos, num período entre 24 horas a 7 dias após a exposição oral. Esses efeitos comportamentais do fipronil não puderam ser atribuídos a um único sistema de neurotransmissão central.

7 CONCLUSÕES

- O fipronil reduziu a atividade motora observada no campo aberto de ratos tratados com 1,0; 30,0; 100,0 mg/Kg, por via oral, sendo esse efeito observado apenas uma hora após sua administração.
- No labirinto em cruz elevado (LCE) foi observada uma hora após o tratamento com fipronil redução do número de entradas nos braços fechados, da distância percorrida nos braços fechados e no número de movimentos iniciados, indicando maior permanência em braços fechados. Contudo, esses efeitos não podem ser atribuídos a um possível efeito ansiogênico do fipronil, uma vez que foi constatada redução da atividade motora dos ratos;
- A dose de 100,0 mg/Kg de fipronil provocou sinais de toxicidade, caracterizados por convulsão, tremores, mioclonias e morte em 60% dos animais tratados, num período entre 24 horas até 7 dias após a administração;
- O limiar das convulsões induzidas quimicamente pelo pentilenotetrazol foi reduzido em animais tratados com 100,0 mg/Kg p.c.de fipronil;
- Não foram constatadas alterações nos níveis dos neurotransmissores e respectivos metabólitos no cortex, *striatum* e hipotálamos dos ratos, uma hora após a exposição às diferentes doses de fipronil.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Monografia Fipronil (ANVISA). Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 03 ago. 2008.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behavior**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.

ARIAS, A. R.; FOURNET, A. Fipronil Insecticide: novel application against triatomine insect vectors of chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 4, p. 535-539, 2002.

BALDESSARINI, R. J. Drugs and the treatment of psychiatric disorders: psychosis and anxiety. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GILMAN, A. G. (Ed.). **The pharmacological basis of therapeutics**, 6. ed. New York : McGraw-Hill, 1996. cap 17, p. 399-430.

BARNETT, S. A. **The rat**: a study in behavior. Chicago: Aldine Publishing, 1966. 288 p.

BASF THE CHEMICAL COMPANY S/A. Regent 800 WG. Disponível em: <<http://www.agro.basf.com.br>>. Acesso em: 20 jan. 2008.

BERNARDI, M. M.; PALERMO-NETO, J. Atividade geral: conceito e medidas. **Psicologia**, v. 6, n. 1, p. 43-55, 1980.

BERNARDI, M.M.; PALERMO-NETO, J. Dopamina e a função motora. **Ciência e Cultura**, v. 32, n. 7, p. 857-861, 1980.

BROADHURST, P. L. Experiments in psychogenetics. In: EYSENK, H. J. **Experiments in personality**. London: Routledge and Kegan Paul, 1960. p. 31-71.

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

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193-1205, 2005.

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

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

DRYDEN, M. W.; SMITH, V.; PAYNE, P. A.; MCTIER, T. L. Comparative speed of kill of selamectin, imidacloprid, and fipronil-(S)-methoprene spot-on formulations against fleas on cats. **Veterinary Therapeutics**, v. 6, n. 3, p. 228-236, 2005.

EIDMAN, D. S.; BENEDITO, M. A. C.; LEITE, J. R. Daily changes in pentylenetetrazol-induced convulsions and open-field behavior in rats. **Physiology Behavior**, v. 47, p. 853-856, 1990.

EIKMEIER-AUGELLO, D. Estimulantes do sistema nervoso central. Hiperatividade. Obesidade. Narcolepsia. Estimulantes respiratórios. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 422-430.

FILE, S. E.; HYDE, J. R. G. A test of anxiety that distinguishes between the actions of benzodiazepines and those of minor tranquilizers and stimulants. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 11, p. 65-69, 1979.

FRANZ, D. N. Estimulantes do sistema nervoso central. In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1985. p. 381-385.

GARSSADI, S. I.; RÉGELY, K.; MÁNDI, Y.; BÉLÁDI, I. Inhibition of cytotoxicity of chicken granulocytes by serotonin and ketanserin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n. 40, p. 101-112, 1994.

GRAEFF, F.G. **Drogas psicotrópicas e seu modo de ação**. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária, 1989. 135 p.

GROSMAN, D. M.; UPTON, W. W. Efficacy of systemic insecticides for protection of loblolly pine against southern pine engraver beetles (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) and wood borers (Coleoptera: Cerambycidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 99, n. 1, p. 94-101, 2006.

GUNNELL, D.; EDDLESTON, M. Suicide by intentional ingestion of pesticides: a continuing tragedy in developing countries. **International Journal of Epidemiology**, v. 32, p. 902–909, 2003.

HAGIMORI, I.; MACHIDA, H.; GOI, R.; MENCKE, N. Efficacy of imidacloprid/permethrin and fipronil/(S)-methoprene combinations against *Haemaphysalis longicornis* ticks evaluated under in vitro and in vivo conditions. **Parasitology Research**, v. 97, n. 1, p. 120-126, 2005.

HAINZL, D.; CASIDA, J. E. Fipronil insecticide: Novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Agricultural Sciences**, v. 93, p. 12764-12767, 1996.

HEINRIKSON, R. L.; MEREDITH, S. C. Amino acid analysis by reverse high performance liquid chromatography? Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. **Analytical Biochemistry**, v. 436, p. 54-74, 1984.

IKEDA, T.; NAGATA, K.; KONO, Y.; YEH, J.Z.; NARAHASHI, T. Fipronil modulation of GABA A receptor single-channel currents. **Pest Management Science**, v.60, n.5, p.487-492, 2004.

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

JANKOVIC, J. Os distúrbios extrapiramidais. In: BENNET, J.C; PLUM, F. **Cecil tratado de medicina interna**. 20 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p.2254-2263, 1997.

KANG, T.; KANG, J. H.; KIM, H. T.; LEE, S. J.; CHOI, U.; KIM, J.; KWAK, S.; KIM, D.; CHOI, S.; KWON, O. Anticonvulsant characteristics of pyridoxil-γ-aminobutyrate, PL-GABA. **Neuropharmacology**, v. 54, p. 954 – 964, 2008.

KELLEY, A. E. Locomotor activity and exploration. In: VAN HAAREN, F. **Methods in behavioral pharmacology**. Elsevier Science Publishers B.V., 1993. p. 499-518.

KOCKI, T.; SARAN, T.; BORBELY, S.; KUC, D. Effect of pesticides on kynurenic acid production in rat brain slices. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 12, n. 2, p. 177–179, 2005.

KONWICK, B. J.; GARRISON, A. W.; BLACK, M. C.; AVANTS, J. K.; FISK, A. T. Bioaccumulation, Biotransformation and Metabolite Formation of Fipronil and chiral legacy Pesticides in rainbow trout. **Environmental Science Technology**, v. 9, p. 2930 – 2936, 2006.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology and therapeutics**, v. 46, p. 321-340, 1990.

MASUTTI, C. S. M.; MERMUT, A. R. Degradation of Fipronil under laboratory conditions in a tropical soil from Sirinhaém Pernambuco, Brazil. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 42, p. 33-43, 2006.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, p. 254-260, 1955.

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

NARAHASHI, T.; ZHAO, X.; IKEDA, T.; NAGATA, K.; YEH, J. Z. Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. **Human and Experimental Toxicology**, v. 26, p. 361-366, 2007.

NOLDUS INFORMATION TECHNOLOGY. EthoVision: **Video Tracking, Motion Analysis & Behavior Recognition System**. Reference Manual. Wageningen, 1997.

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

OLSEN, R. W. Drug interactions at the GABA receptor ionophore complex. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 22, p. 245-277, 1982.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 24, p. 525-529, 1986.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 904 p.

RATRA, G. S.; ERKKILA, B. E.; WEISS, D. S.; CASIDA, J. E. Unique insecticide specificity of human homomeric $\rho 1$ GABA_c receptor. **Toxicology Letters**, v. 129, p. 47-53, 2002.

RAYMOND-DELPECH, V.; MATSUDA, K.; SATTELLE, B. M.; RAUH, J. J.; SATTELLE, D. B. Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. **Invertebrate Neuroscience**, v. 5, n. 3-4, p. 119-133, 2005.

SANDOVAL, M. R. L.; PALERMO-NETO, J. Do ácido gamaaminobutírico (GABA) e das convulsões. **Ciência e Cultura**, v. 37, p. 1142-1146, 1985.

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

SCARAMPELLA, F.; POLLMEIER, M.; VISSER, M.; BOECKH, A.; JEANNIN, P. Efficacy of fipronil in the treatment of feline cheyletiellosis. **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 333-339, 2005.

SOUZA, H.; PALERMO NETO, J. Do balanço entre os sistemas dopaminérgico e colinérgico centrais. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 3, n. 7, p. 128-132, 1981.

SOUZA, H.; PALERMO NETO, J. A quantitative study of cholinergic-dopaminergic interactions in the central nervous system. **Pharmacology**, v. 24, p. 222-229, 1982.

SPINOSA, H. S.; BERNARDI, M. M. Possible Anxyolitic Effects of Ivermectin in Rats. **Veterinary Research Communications**, São Paulo, v. 26, p. 309-321, 2002.

SPINOSA, H. S.; BERNARDI, M. M.; TEODOROV, E. Introdução ao sistema nervoso central. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 107-131, 2006.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 897 p.

STEHR, M. C.; LINBO, L. T.; INCARDONA, P. J.; SCHOLZ, L. N. The Developmental Neurotoxicity of Fipronil: Notochord Degeneration and Locomotor Defects in Zebrafish Embryos and Larvae. **Toxicological Sciences**, v. 92, n. 1, p. 270-278, 2006.

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

TREIT, D.; FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats.

Pharmacology Biochemistry and Behavior, v. 31, p. 959-962, 1988.

U.S.EPA. Environmental fate of fipronil. Washington: U.S.EPA Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, 2001. 17 p. Disponível em:

<<http://www.pw.ucr.edu/textfiles/fipronil.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2008

VAN GAALEN, M. M.; STECKLER, T. Behavioral analysis of four mouse strains in an anxiety test battery. **Behavioral Brain Research**, v. 115, p. 95-106, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Pesticides Residues in food – Toxicological and Environmental Evaluation, Lyon, 1997. Disponível em:

<<http://www.inchem.org/documents/impr/jmpr/jmpmono/vo97pr09.htm>>. Acesso em: 12 dez. 2008.

ZHAO, X.; YEH, J. Z.; SALGADO, V. L.; NARAHASHI, T. Fipronil Is a Potent Open Channel Blocker of Glutamate-Activated Chloride Channels in Cockroach Neurons. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 1, p. 192-201, 2004.

ZHAO, X.; YEH, J. Z.; SALGADO, V. L.; NARAHASHI, T. Sulfone Metabolite of Fipronil Blocks γ -Aminobutyric Acid- and Glutamate-Activated Chloride Channels in Mammalian and Insect Neurons. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, p. 363-373, 2005.

ZHENG, F.; ADELSBERG, H.; MÜLLER, M. R.; FRITSCHY, J. M.; WERNER, S.; ALZHEIMER, C. Activin tunes GABAergic neurotransmission and modulates anxiety-like behavior. **Molecular Psychiatry**, jan., p. 1-15, 2008.

ZIMMERMANN, A.; STAUFFACHER, M.; LANGHANS, W.; WURBEL, H.

Enrichment-dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. **Behavioural Brain Research**, v. 121, n. 1-2, p.11-20, 2001.