UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas
Área de Toxicologia Experimental

Efeitos neurocomportamentais da exposição prolongada
de ratos ao fipronil

Andréa de Souza Silva

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Helenice de Souza Spinosa

São Paulo
2008

Andréa de Souza Silva

Efeitos neurocomportamentais da exposição prolongada
de ratos ao fipronil

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Este trabalho foi realizado com bolsa de mestrado concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 05/2007 a 05/2008.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus preciosos pais, Osmar e Maria das Graças, a minha irmã Alessandra, a minha sobrinha Débora e ao meu noivo Fernando. Muito obrigada por confiarem e acreditarem em mim.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus por permitir a minha existência, a construção e realização dos meus sonhos;

Aos meus pais Osmar e Maria das Graças e a minha irmã Alessandra pelo apoio incondicional, pelas palavras e manifestações de carinho por toda minha vida, pelo incentivo e por me fazer acreditar em mim mesma;

A minha sobrinha Débora por toda a alegria transmitida em momentos de tensão;

Ao meu noivo Fernando pela paciência, apoio e pelo amor tão essencial para a vida e para o meu fortalecimento nas horas de desânimo;

À Professora Dra. Helenice de Souza Spinosa, por ter acreditado na minha capacidade, pela sua disponibilidade sempre que eu a procurei, pelo seu interesse no andamento e discussão dos trabalhos, pela sua compreensão, ensinamentos e amizade;

Ao Professor Dr. Jorge Camilo Flório, por sua disponibilidade e ajuda em toda parte estatística e nos momentos em que o procurei;

À professora Dra. Lílian Sá do departamento de patologia da FMVZ USP pela força nos estudos histopatológicos;

À Veterinária do Biotério da FMVZ USP, Cláudia Mori, por sua solicitude sempre que precisei de algo e também pelos seus ensinamentos;

Aos funcionários do Biotério pelo apoio nos estudos e pelo cuidado com os animais de experimentação;

Aos funcionários Priscila, Ricardo e Magali, do Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo;

À Veterinária e amiga Ana Paula Martins, por sua ajuda em todos os experimentos e, além disso, por todas as horas e por todos os assuntos partilhados. Muito obrigada por tudo;

À Biomédica Mestre e amiga Camila Queiroz Moreira por todas as dicas relacionadas ao trabalho e pela sua ajuda em um dos momentos em que mais precisei. Muito obrigada;

Às alunas: Veterinária e doutoranda da FMVZ USP Glaucie Alves; à Farmacêutica e doutoranda da FCF/ USP Carolina Dizioli; à Biomédica e Mestranda Karim Kieling, sempre simpática, pela preciosa ajuda prestada em várias fases dos meus experimentos;

Resumo

SILVA, A.S. **Efeitos neurocomportamentais da exposição prolongada de ratos fipronil**. 2008. 108f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2008.

Fipronil é um inseticida fenilpirazol de amplo espectro, desenvolvido para inibir seletivamente receptores GABA associados a canais de cloreto de insetos; tanto em Medicina Veterinária, como em Agricultura tem sido utilizado para o controle de pragas. Embora vários estudos procurem compreender os mecanismos da toxicidade neuronal dos praguicidas em mamíferos, há poucos relacionados aos efeitos neurocomportamentais. Assim, o presente estudo investigou os efeitos da exposição prolongada de ratos ao fipronil, observando-se alguns comportamentos ligados ao sistema GABAérgico, como atividade no campo aberto, no labirinto em cruz elevado (LCE), bem como na convulsão induzida por picrotoxina e pentilenotetrazol; avaliou-se ainda os níveis cerebrais de alguns neurotransmissores, como GABA, dopamina, noradrenalina, serotonina e seus respectivos metabólitos. Além disso, foram realizadas análises anátomo-histopatológicas em fígado, cérebro e rins dos animais. Ratos Wistar receberam, por via intragástrica (*gavage*), durante 28 dias um dos seguintes tratamentos: fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg/dia) ou água destilada 1 mL/Kg/dia. Após uma hora da última administração do fipronil ou água destilada, os ratos tiveram seu comportamento avaliado no campo aberto e no LCE com auxílio do sistema computadorizado EthoVision[®]. Observou-se no campo aberto apenas redução significativa do n^o de levantamentos nos animais tratados com 10,0 mg/Kg de fipronil, quando comparados com os ratos do grupo controle. No LCE, a exposição prolongada de ratos ao fipronil nas doses de 1,0 e 10,0 mg/Kg provocou redução na distância percorrida pelos animais e o tempo de permanência dos animais nos braços abertos, além de aumentar o tempo de permanência nos braços fechados. Para o cálculo da dose convulsivante mínima, seguiu-se o mesmo protocolo de tratamento, sendo observada diminuição significativa na dose de picrotoxina e de pentilenotetrazol necessária para a indução da convulsão em animais tratados com 10,0 mg/Kg fipronil. A determinação dos níveis de neurotransmissores e seus respectivos metabólitos mostrou aumento dos níveis de dopamina no córtex frontal de ratos tratados com 10,0 mg/Kg de fipronil, redução nos níveis de GABA no *striatum* de ratos tratados com 1,0 mg/Kg de fipronil. Em

relação à serotonina houve aumento de seus níveis no córtex frontal de ratos tratados com 1,0 mg/Kg e seu metabólito, ácido 5 (5HIAA), foi observado redução de seus níveis no córtex frontal de ratos tratados com 0,1 e 1,0 mg/kg p.c. de fipronil. No *striatum* também houve redução de seus níveis em ratos tratados com 0,1 e 1,0 mg/Kg de fipronil. O estudo anátomo-histopatológico revelou que a exposição prolongada ao fipronil pode causar hepatotoxicidade, caracterizada por aumento dos pesos absoluto e relativo do fígado e tumefação celular de hepatócitos. Em conclusão, os resultados mostraram que a exposição de ratos por 28 dias, via *gavage*, ao fipronil pode causar efeitos comportamentais relacionados a alterações em sistemas centrais de neurotransmissão e também hepatotoxicidade.

Palavras Chave: Fipronil. GABA. Comportamento. Neurotransmissão.

Abstract

SILVA, A.S. **Neurobehavioral effects of fipronil long term exposure in rats.** 2008. 108f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2008.

Fipronil is a phenylpyrazole insecticide with broad spectrum, developed to selectively inhibit insect GABA-gated chloride channels; both in Veterinary Medicine, and in Agriculture it has been used for the control of nuisances. 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 long term exposure in rats, being observed some behaviors connected to GABAergic system, as activity in open field, in elevated plus maze (EPM), as well as in the seizures induced by picrotoxinin and pentylentetrazole. In addition, this study determined the brain levels of some neurotransmitter as GABA, dopamine, noradrenaline, serotonin and metabolic levels and investigated liver, brain and kidney damage. Wistar rats received by intragastric (*gavage*) way during 28 days one of this treatment: fipronil (0,1, 1,0 or 10,0 mg/Kg) or distilled water; the rats behavior were evaluated in open field and elevated plus maze apparatus with system computer EthoVision®. There was a significant reduction of rearing in open field in rats treated with 10,0 mg/Kg of fipronil when compared with control rats. In the EPM, there was a decrease of distance moved in open arms and increase of time spent in closed arms to rats treated with 1,0 and 10,0 mg/Kg of fipronil when compared to control. It was still noticed the reduction in the time spent in open arms EPM in rats treated with 1,0 and 10,0 mg/Kg of fipronil when compared to control group. To calculate the minimum convulsant dose, was used the same treatment protocol and it was observed a significant reduction in picrotoxinin and pentylentetrazole necessary dose to induction of seizure in animals treated with fipronil 10,0 mg/Kg. The level determination of neurotransmitters and their metabolites, it was observed the dopamine increasing in forebrain from fipronil treated rats by 10,0 mg/Kg. GABA levels decreased in fipronil treated rats *striatum* by 1,0 mg/Kg. Serotonin neurotransmitter was increased in fipronil treated rats forebrain by 1,0 mg/Kg to and its metabolite, 5HIAA, it was observed a levels decrease in fipronil forebrain treated rats by 0,1 e 1,0 mg/kg. There was decrease of 5HIAA levels

in fipronil treated rats *striatum* by 0,1 e 1,0 mg/Kg. According to organ analyses, it was observed dose-response liver damage such as swelling liver cells. In conclusion, the data showed that fipronil administered in rats by 28 days caused behavioral effects related to central neurotransmitter alterations and hepatotoxicity.

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

Sumário

1 Introdução	27
1.1 Estrutura Química	31
1.2 Produtos de degradação e biotransformação	32
1.3 Comportamento animal e avaliação da toxicidade	33
1.3.1 Campo Aberto	34
1.3.2 Labirinto em Cruz Elevado	34
1.3.3 Convulsões químicas	35
2 Objetivos	37
2.1 Objetivo geral	37
2.2 Objetivos específicos	37
3 Material e Métodos	38
3.1 Animais	38
3.2 Administração	38
3.3 Praguicida e fármacos a serem administrados	39
3.4 Procedimentos	39
3.4.1 Avaliação comportamental	39
3.4.1.1 Campo aberto	41
3.4.1.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	42
3.4.2 Convulsões químicas	45
3.4.3 Determinação dos níveis de neurotransmissores	46
3.4.4 Coleta de material para estudo anátomo-histopatológico	50
3.5 Delineamento Experimental	51
3.5.1 Experimento 1: Efeitos da administração prolongada de Fipronil sobre a atividade geral de ratos	51
3.5.2 Experimento 2: Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre o comportamento de ratos no Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	51
3.5.3 Experimento 3. Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre a dose convulsivante mínima (DCM) de picrotoxina em ratos	52
3.5.4 Experimento 4. Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre a dose convulsivante mínima (DCM) de pentilenotetrazol em ratos	52
3.5.5 Experimento 5: Determinação dos níveis dos neurotransmissores e seus metabólitos	53
3.5.6 Experimento 6: Estudo anátomo-histopatológico	53

3.6 Análise Estatística.....	53
4. Resultados	54
4.1 Experimento 1: Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre a atividade geral de ratos.....	54
4.2 Experimento 2: Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre o comportamento de ratos no labirinto em cruz elevado (LCE).....	68
4.3 Experimento 03: Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre a dose convulsivante mínima (DCM) de picrotoxina em ratos.....	74
4.4 Experimento 04: Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre a dose convulsivante mínima (DCM) de pentilenotetrazol em ratos.	75
4.5 Experimento 5: Determinação dos níveis dos neurotransmissores e seus metabólitos.	76
4.6 Experimento 6: Estudo anátomo e histopatológico.....	89
4.6.1 Peso absoluto dos órgãos.	89
4.6.2 Peso Relativo de Fígados.....	90
4.6.3 Estudo Histopatológico.	92
5 - Discussão	94
6 - Conclusões	102
7- Referências bibliográficas.....	103

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Escores para determinação de lesões histopatológicas de fígados de ratos tratados por 28 dias com fipronil.	50
Tabela 2 - Distância percorrida (em cm) em diferentes áreas do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> , durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas uma hora após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).	55
Tabela 3 - Distância percorrida (em cm) em diferentes áreas do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> , durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 24 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).	56
Tabela 4 - Distância percorrida (em cm) em diferentes áreas do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> , durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 48 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).	57
Tabela 5 - Distância percorrida (em cm) em diferentes áreas do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> , durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 7 dias após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).	58
Tabela 6 - Número de levantamentos na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de	

água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas uma hora após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer * $p < 0,05$, em relação aos controles).....59

Tabela 7 - Número de levantamentos na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 24 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p > 0,05$).....60

Tabela 8 - Número de levantamentos na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 48 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p > 0,05$).....61

Tabela 9 - Número de levantamentos na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 7 dias após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p > 0,05$).....62

Tabela 10 - Tempo de *grooming* (auto-limpeza) em segundos, na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados

referentes às observações feitas uma hora após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo.

(ANOVA, $p > 0,05$).64

Tabela 11 - Tempo de *grooming* (auto-limpeza) em segundos, na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 24 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo.

(ANOVA, $p > 0,05$).65

Tabela 12 - Tempo de *grooming* (auto-limpeza) em segundos, na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 48 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo.

(ANOVA, $p > 0,05$).66

Tabela 13 - Tempo de *grooming* (auto-limpeza) em segundos, na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 7 dias após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo.

(ANOVA, $p > 0,05$).67

Tabela 14. Distância percorrida (cm) no labirinto em cruz elevado de ratos tratados 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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. N = 10 por grupo. (*p<0,05, ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, em relação aos controles).	68
Tabela 15. Número de entradas em cada braço do labirinto em cruz elevado de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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 = 10 por grupo. (p>0,05, ANOVA).....	69
Tabela 16. Tempo de permanência (em segundos) nos braços abertos, fechados e área central do labirinto em cruz elevado de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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 = 10 por grupo. (*p<0,05, ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, em relação aos controles). ..	71
Tabela 17. Número de movimentos iniciados nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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 = 10 por grupo. (ANOVA, p>0,05).	72
Tabela 18. Tempo em movimento (em segundos) nos braços abertos e fechados no LCE de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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 = 10 por grupo. (*p<0,05, ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, em relação aos controles).	73
Tabela 19. Dose convulsivante mínima (DCM) de picrotoxina (mg/Kg) em ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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 = 8 por grupo. (*p<0,05, ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, em relação aos controles).	74
Tabela 20. Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre a dose convulsivante mínima (DCM) de pentilenotetrazol em ratos. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 6 por grupo. (*p<0,05, ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, em relação aos controles).	75
Tabela 21. Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre os níveis dos neurotransmissores e de seus metabólitos (em ng/g de tecido) e GABA (µg/g tecido) no córtex cerebral de ratos. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. (*p<0,05 e ***p<0,001, ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação aos animais do grupo controle).....	78
Tabela 22. Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre os níveis dos neurotransmissores e de seus metabólitos em ng/g de tecido e para o GABA (µg/g de tecido) no <i>striatum</i> de ratos. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (*p<0,05, ***p< 0,001, ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação aos controles).....	80
Tabela 23. Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre os níveis dos neurotransmissores e de seus metabólitos em ng/g de tecido e para o GABA (µg/g de tecido) no hipotálamo de ratos. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (p>0,05, ANOVA).....	82
Tabela 24. Relações DOPAC/DA, HVA/DA e 5HIAA/5-HT como indicadores da taxa de renovação (turnover) de DA e 5-HT, respectivamente em córtex cerebral, <i>striatum</i>	

e hipotálamo de ratos tratados por 28 dias com 0,1 mg/Kg p.c, 1,0 mg/Kg p.c., 10,0 mg/Kg p.c. de fipronil ou 1mL/Kg p.c. de água destilada. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. (**p<0,001, *p<0,01, *p<0,05ANOVA seguida do teste de Tukey).....	85
Tabela 25. Peso absoluto (em g) dos órgãos fígado, cérebro e rins de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1, 1,0 ou 10,0 mg/Kg p.c.) ou água destilada via <i>gavage</i> . (**p<0,001, ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação aos controles).	89
Tabela 26. Peso relativo (peso do órgão ÷ peso do animal) de fígados, cérebros e rins direito e esquerdo de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1, 1,0 ou 10,0 mg/Kg p.c.) ou água destilada via <i>gavage</i> . (**p<0,001, ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação aos controles).	91
Tabela 27. Escores atribuídos às lesões histopatológicas de fígados de ratos tratados com fipronil ou água destilada por 28 dias, via <i>gavage</i> . N indica o número de animais por grupo (**p<0,001, *p< 0,01, teste de Kruskal-Wallis seguido teste de comparações múltiplas de Dunn's, em relação aos controles).	92

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura química do fipronil e de seus metabólitos no solo (adaptado de MASUTTI; MERMUT, 2007).....	31
Figura 2 – EthoVision – Câmera de vídeo, Monitor e Computador com Software instalado.	44
Figura 3 – Campo aberto de ratos e ilustração esquemática da arena do campo aberto (vista de cima), subdividida em área interna, área média (centro); e área externa, área de tigmotaxia (periferia).....	44
Figura 4 – Labirinto em cruz elevado de ratos e ilustração esquemática do LCE (visto de cima), subdividido em zona (área) central, braços abertos e braços fechados.	44
Figura 5 – Gaiola com rato recebendo o fármaco convulsivante, por via subcutânea, por meio do aparelho de infusão contínua (Harward-Apparatus/Withdrawal Pumps H.94)	45
Figura 6. Distância percorrida (em cm) em diferentes áreas do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> , durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas uma hora após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p > 0,05$).....	55
Figura 7. Distância percorrida (em cm) em diferentes áreas do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> , durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 24 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p > 0,05$).....	56
Figura 8. Distância percorrida (em cm) em diferentes áreas do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada	

(controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 48 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).....57

Figura 9. Distância percorrida (em cm) em diferentes áreas do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 7 dias após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).....58

Figura 10. Número de levantamentos na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas uma hora após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer $*p<0,05$, em relação aos controles).....60

Figura11. Número de levantamentos na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 24 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).....61

Figura12. Número de levantamentos na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 48 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as

médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p > 0,05$).62

Figura13. Número de levantamentos na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 7 dias após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p > 0,05$).63

Figura 14. Tempo de *grooming* (auto-limpeza) em segundos, na arena e na zona de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas uma hora após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p > 0,05$).64

Figura 15. Tempo de *grooming* (auto-limpeza) em segundos, na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 24 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p > 0,05$).65

Figura 16. Tempo de *grooming* (auto-limpeza) em segundos, na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 48 horas após o último dia de tratamento. São

apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p > 0,05$).	66
Figura 17. Tempo de <i>grooming</i> (auto-limpeza) em segundos, na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por <i>gavage</i> , durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 7 dias após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p > 0,05$).	67
Figura 18. Distância percorrida (cm) no labirinto em cruz elevado de ratos tratados 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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 = 10 por grupo. (* $p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, em relação aos controles).	69
Figura 19. Número de entradas em cada braço do labirinto em cruz elevado de ratos tratados 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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 = 10 por grupo. ($p > 0,05$, ANOVA).	70
Figura 20. Tempo de permanência (em segundos) nos braços abertos, fechados e área central do labirinto em cruz elevado de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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 = 10 por grupo. (* $p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, em relação aos controles). ..	71
Figura 21. Número de movimentos iniciados nos braços abertos e fechados no LCE de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de	

água destilada (controle), por <i>gavage</i> . Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Número de animais por grupo = 10. (ANOVA, $p > 0,05$).	72
Figura 22. Tempo em movimento nos braços abertos e fechados (em segundos) no LCE de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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 = 10 por grupo. (* $p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, em relação aos controles).....	73
Figura 23. Dose convulsivante mínima (DCM) de picrotoxina (mg/Kg) em ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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 = 8 por grupo. (* $p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, em relação aos controles).	74
Figura 24. Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre a dose convulsivante mínima (DCM) de pentilenotetrazol em ratos. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Número de animais por grupo = 06. (* $p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, em relação aos controles). ..	75
Figura 25. Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre os níveis dos neurotransmissores e de seus metabólitos (em ng/g de tecido) e GABA (μ g/g tecido) no córtex cerebral de ratos. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$, ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação aos animais do grupo controle).....	79
Figura 26. Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre os níveis dos neurotransmissores e de seus metabólitos em ng/g de tecido e para o GABA (μ g/g de tecido) no <i>striatum</i> de ratos. Os números entre parênteses indicam o número de	

animais por grupo. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação aos controles).....	81
Figura 27. Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre os níveis dos neurotransmissores e de seus metabólitos em ng/g de tecido e para o GABA ($\mu\text{g/g}$ de tecido) no hipotálamo de ratos. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. ($p > 0,05$, ANOVA).....	83
Figura 28. Relações DOPAC/DA, HVA/DA e 5HIAA/5-HT como indicadores da taxa de renovação (turnover) de DA e 5-HT, respectivamente em córtex cerebral de ratos tratados por 28 dias com 0,1 mg/Kg p.c., 1,0 mg/Kg p.c., 10,0 mg/Kg p.c. de fipronil ou 1mL/Kg p.c. de água destilada. (*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação aos controles).....	86
Figura 29. Relações DOPAC/DA, HVA/DA e 5HIAA/5-HT como indicadores da taxa de renovação (turnover) de DA e 5-HT, respectivamente em <i>striatum</i> de ratos tratados com 0,1 mg/Kg p.c., 1,0 mg/Kg p.c., 10,0 mg/Kg p.c. de fipronil ou 1mL/Kg p.c. de água destilada. (*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação aos controles).	87
Figura 30. Relações DOPAC/DA, HVA/DA e 5HIAA/5-HT como indicadores da taxa de renovação (turnover) de DA e 5-HT, respectivamente em hipotálamo de ratos tratados com 0,1 mg/Kg p.c., 1,0 mg/Kg p.c., 10,0 mg/Kg p.c. de fipronil ou 1mL/Kg p.c. de água destilada. ($p > 0,05$, ANOVA)	88
Figura 31. Peso absoluto dos órgãos fígado, cérebro e rins de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1, 1,0 ou 10,0 mg/Kg p.c.) ou água destilada via <i>gavage</i> . (*** $p < 0,001$, ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação aos controles).	90

Figura 32. Peso relativo (peso do órgão ÷ peso do animal) de fígados, cérebros e rins direito e esquerdo de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1, 1,0 ou 10,0 mg/Kg p.c.) ou água destilada via *gavage*. (**p<0,01, ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação aos controles).91

Figura 33. Fotomicrografia de fígado. A – animal do grupo controle, no qual não se observam alterações histopatológicas dignas de nota; aumento de 10X, coloração hematoxilina-eosina (HE). B – animal do grupo tratado com 10,0 mg/Kg de fipronil, no qual se observa tumefação de hepatócitos com ou sem zoneamento; aumento de 10X, coloração HE.93

1 Introdução

O fipronil surgiu na década de 1990, como o primeiro praguicida fenilpirazol; foi obtido a partir de síntese laboratorial (Rhône Poulenc Agro), apresentando classificação toxicológica – classe II, e é tido como praguicida de segunda geração pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos – EPA – (CONNELY, 2001; IKEDA *et al*, 2004; SZEGEDI *et al*, 2005; KADAR; FAUCON, 2006; DAS *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; 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).

O GABA é um neurotransmissor inibitório que regula 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 para os receptores GABA de insetos, em relação àqueles de mamíferos, resulta em uma menor toxicidade para estes últimos, quando comparado a outros praguicidas que bloqueiam este mesmo canal (MOHAMED *et al*, 2006; ZHAO *et al*, 2004). Em insetos, o fipronil leva a morte por hiperexcitação e paralisia (ZHAO *et al*, 2004).

Em insetos, um possível mecanismo de toxicidade seletiva, poderia estar relacionado com o fato dos receptores GABA serem mais sensíveis ao fipronil do que os receptores GABA_A

dos mamíferos. Nesse sentido, NARAHASHI et al.(2007), estudaram a ação diferencial do fipronil sobre os receptores GABA associado a canais de cloreto de insetos comparando-os com os receptores GABA_A de mamíferos. Esses autores observaram que o fipronil inibiu os receptores GABA de baratas com uma potência de 59 vezes superior àquela efetuada em receptores GABA_A de ratos. Além disso, os insetos possuem o sistema de glutamato ativado por canais de cloreto, que, por sua vez, está presente apenas nos invetebrados, e este é também um alvo crítico para a ação do fipronil, aumentando a sensibilidade dos insetos frente ao praguicida.

Nos mamíferos, os receptores GABA_A 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*, 2006).

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), a qual se manifesta como uma diminuição na frequência de abertura do canal.

Ratra *et al* (2002) sugerem que o 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.

Em Medicina Veterinária o fipronil é um praguicida usado 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 e FAUCON, 2006; DAS *et al*, 2006). Além dessas aplicações, o fipronil é usado como isca granulada para jardinagem amadora na concentração de 0,01%, e também como pasta-isca e isca nas concentrações de 0,05% para uso profissional (ANVISA, 2008).

A ingestão diária aceitável (IDA) de fipronil é de 0,0002 mg/Kg de peso corporal, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008).

No Brasil pode ser encontrado comercialmente como Frontline[®] (cartela com pipeta de 0,5 – 4,02 mL de solução a 10%; spray a 0,25%), Fiprolex[®] (bisnaga de 0,5 – 4,02 mL de solução a 10%), TopLine[®] (embalagens de 1 e 5 L, a 1%; spray a 0,32%) de uso veterinário (Compêndio de Produtos Veterinários – SINDAN, 2008) e de uso agrícola como Blitz[®], Klap[®] e Regent[®] (ANDREI, 1999).

O uso de fipronil em pecuária e na agricultura faz com que haja uma preocupação com possíveis danos causados ao meio ambiente. Sabe-se, por exemplo, que fipronil pode causar dano ao meio ambiente aquático mesmo em baixas concentrações (KOWICK *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).

Para *Daphnias*, o fipronil apresentou toxicidade na dose 0,03mg/L, diminuindo a taxa de nascimento e aumentando a da mortalidade (STARK; VARGAS, 2005).

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) (MOHAMED *et al*, 2006). Em camundongos, a dose letal 50%

(DL50) do fipronil, por via ip, é de 41 mg/Kg de peso corporal (MOHAMED *et al*, 2006); por via oral, a DL 50 para ratos é de 97 mg/Kg e para camundongos, 95 mg/Kg; por via dérmica é superior a 2000 mg/Kg e por via inalatória a concentração letal 50% (CL50) é de 0,682 mg/L em ratos (GUPTA, 2007).

No Sri Lanka foram relatados 7 casos de intoxicação humana por fipronil e os sinais e sintomas observados foram suores, tremores, náusea, vômitos, agitação, convulsões tônico-clônicas (MOHAMED *et al*, 2006).

FUNG *et al* (2003), em estudos de neurotoxicidade aguda em ratos encontraram a NOEL de 0,5 mg/Kg e LOEL de 5 mg/Kg de fipronil, por via oral, baseado na observação da extensão dos membros pélvicos.

1.1 Estrutura Química

A Figura 1 ilustra a estrutura química do fipronil e de seus produtos de degradação no solo.

O grupamento CF_3 do fipronil na posição 4 (tri-fluor-metil-sulfinil-pirazol), confere a estrutura maior lipossolubilidade, alteração nas propriedades eletrônicas, no metabolismo, na efetividade e nos aspectos toxicológicos, quando comparado a praguicidas da mesma classe como por exemplo, ao etiprole (outro praguicida fenilpirazol), que tem um C_2H_5 na posição 4 (CABONI *et al*, 2003).

Figura 1 - Estrutura química do fipronil e de seus metabólitos no solo (adaptado de MASUTTI; MERMUT, 2007).

O fipronil é convertido a derivados fipronil sulfona, fipronil desulfenil, fipronil sulfeto e fipronil amida por hidrólise (CABONI *et al*, 2003).

1.2 Produtos de degradação e biotransformação

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, o fipronil sofre degradação através de hidrólise, fotólise, oxidação e redução (MASUTTI ;MERMUT, 2007), como pode ser observado na Figura1.

O composto derivado desulfenil é formado fotoquimicamente e seu surgimento é rápido. O derivado sulfeto é formado por redução ao passo que o metabólito sulfona é formado por oxidação do substituinte sulfenil. 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 propriedades 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 desulfenil, via fotólise (ZHAO *et al*, 2005).

Nos mamíferos, o fipronil pode ser detectado nos tecidos e na urina e é biotransformado a um composto fipronil sulfona. Em seres humanos, o fipronil sulfona é formado rapidamente no citocromo P450; estudos *in vitro* mostraram sua formação no sistema CYP3A4 recombinante (ZHAO *et al*, 2005).

A administração de 4 mg/Kg de fipronil em ratos, dose única e por via oral, mostrou meia-vida de eliminação do fipronil de 8,5 horas, enquanto a do fipronil sulfona foi de 208 horas (MOHAMED *et al*, 2006). Foi relatado que a eliminação lenta do fipronil e seus metabólitos pode ser atribuída a sua distribuição no tecido adiposo e pelo grau elevado de recirculação hepática (MOHAMED *et al*, 2006).

A DL 50 para camundongos do composto sulfona, por via intrapritoneal, foi de 50 mg/Kg (MOHAMED *et al*, 2006).

.Deve ser destacado que o composto sulfona também possui alta afinidade pelos receptores GABA, tanto de seres humanos, quanto de camundongos (MOHAMED *et al*, 2006; ZHAO *et al*, 2005).

1.3 Comportamento animal e avaliação da toxicidade

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 prolongada a baixas doses de substâncias químicas. A seguir, será comentado alguns modelos comportamentais envolvidos com o sistema GABAérgico.

1.3.1 Campo Aberto

O campo aberto (CA) 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 até a fuga, e, assim, refletir reatividade emocional (ARCHER, 1973).

Dependendo do nível de estimulação do ambiente, o campo aberto é um modelo exploratório em que podem ser verificadas: a emocionalidade, 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).

1.3.2 Labirinto em Cruz Elevado

GABA é o principal neurotransmissor inibitório e tem sido envolvido em um amplo espectro de funções fisiológicas e em estados de doenças incluindo ansiedade e depressão (ZHENG *et al*, 2008).

O comportamento no labirinto em cruz elevado (LCE) foi proposto como modelo para avaliação de fármacos ansiolíticos do grupo dos benzodiazepínicos em ratos (File; Hyde, 1979). Este modelo leva em conta o comportamento do rato que procura locomover-se em ambientes fechados (túneis) para evitar predadores. Assim, quando o rato pode escolher entre um ambiente aberto e um fechado, ele

prefere este último. O comportamento do animal neste aparelho é considerado um modelo experimental de ansiedade.

A exposição aos braços abertos do labirinto em cruz elevado produz significativamente mais ansiedade quando comparada à exposição aos braços fechados. Fármacos ansiolíticos elevam o tempo gasto pelos roedores nos braços abertos quando comparados com o tempo gasto nos braços fechados, e em contraste, fármacos ansiogênicos diminuem o tempo gasto nos braços abertos (PELLOW; FILE, 1985).

1.3.3 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.*, 2003).

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.

Atividade convulsivante do pentilenotetrazol em modelos animais tem se mostrado útil para avaliar fármacos com atividade antiepilética. O fato de fármacos antiepilépticos inibirem as convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol tem sido correlacionado com sua eficácia contra as crises de ausência (RANG et al., 2003).

Considerando que o fipronil inibe seletivamente receptores do GABA associado a canais de cloreto, neste trabalho pretende-se estudar os efeitos da exposição prolongada de ratos ao fipronil (28 dias), avaliando-se comportamentos envolvidos com a atividade geral e 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, uma vez que não foram encontrados dados na literatura sobre a toxicidade do fipronil nos modelos avaliados nesse estudo.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos da exposição prolongada de ratos, por 28 dias, ao fipronil em modelos comportamentais envolvidos com o sistema GABAérgico, os níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no sistema nervoso central e realizar um estudo anátomo-patológico das estruturas cérebro, fígado e rins.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliação comportamental dos ratos expostos ao fipronil por 28 dias nos seguintes modelos experimentais:

- campo aberto (CA);
- labirinto em cruz elevado (LCE).

2.2.2 Determinação da dose convulsivante mínima (DCM) de picrotoxina e pentilenotetrazol em ratos expostos ao fipronil por 28 dias.

2.2.3 Determinação dos níveis de neurotransmissores (dopamina, norepinefrina, serotonina e GABA) e seus metabólitos (DOPAC, HVA, VMA e 5HIAA) no sistema nervoso central (hipotálamo, córtex frontal e *striatum*) de ratos expostos ao fipronil por 28 dias.

2.2.4 Estudo anátomo-histopatológico dos tecidos (fígado, encéfalo e rim), através da análise dos pesos absoluto, relativo e análises histopatológicas.

3 Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar adultos, pesando entre 300 g – 380 g, de mesma linhagem, obtidos em nossos biotérios através de cruzamentos sucessivos. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas com tampas metálicas, medindo 40 x 50 x 20 cm. Todas as gaiolas foram mantidas 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.

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA – Faculdade de Ciências Farmacêuticas (protocolo nº 116) e também pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia protocolado sob o nº de 981/2006.

3.2 Administração

O fipronil, diluído em água destilada, foi administrado por via oral (*gavage*) aos ratos dos grupos tratados durante 28 dias, em diferentes doses (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg de peso corpóreo), seguindo recomendação do protocolo 424 da OECD (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1997). Os animais do grupo controle receberam apenas água destilada 1mL/Kg de peso corporal.

3.3 Praguicida e fármacos a serem administrados

- fipronil (Regent 800 WG[®] da empresa BASF), conservado ao abrigo da luz.
- picrotoxina (Sigma[®])
- pentilenotetrazol (Serva[®])

A picrotoxina e o pentilenotetrazol foram diluídos em água destilada a fim de se obter as concentrações de 7 mg/mL e 70 mg/mL, respectivamente.

3.4 Procedimentos

3.4.1 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).

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 área (*In Zone*) – Resultados quanto à duração (tempo passado na área em segundos) e à frequência (número de vezes que o animal entrou na área);
- 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 em segundos) 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 área. 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 registrados

quanto à duração e frequência foram a auto-limpeza (*grooming*) e o levantar (*rearing*).

3.4.1.1 Campo aberto

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

A arena desenhada no Ethovision continha quatro regiões principais: interna, média, externa e área 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 área próxima as paredes, por essa razão denominada área de tigmotaxia (TREIT; FUNDYTUS, 1988).

Uma, 24, 48 horas e 7 dias após o 28^o dia de tratamento, cada animal foi colocado individualmente no centro da arena e observado por 5 minutos entre as 8:00 e 12:00 h, avaliando-se 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 área de tigmotaxia.

- Duração 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 área de tigmotaxia.

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

3.4.1.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

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 (em cm);
- Número de movimentos iniciados;
- Tempo total em movimento (em segundos);
- Número de entradas em braços abertos e fechados;

- Tempo total de permanência nos braços abertos e fechados (em segundos).

Esse procedimento foi realizado imediatamente após a observação dos animais no campo aberto (neste caso a observação no LCE foi feita apenas uma vez no 28^o dia uma hora após o último tratamento e depois de terem passado pelo campo aberto) de forma que todas as observações foram feitas entre 8:00 e 12:00 h. Entre as observações de cada animal, a arena foi limpa com solução de álcool 5%.

Figura 2 – EthoVision – Câmera de vídeo, Monitor e Computador com Software instalado.

Figura 3 – Campo aberto de ratos e ilustração esquemática da arena do campo aberto (vista de cima), subdividida em área interna, área média (centro); e área externa, área de tigmotaxia (periferia).

Figura 4 – Labirinto em cruz elevado de ratos e ilustração esquemática do LCE (visto de cima), subdividido em zona (área) central, braços abertos e braços fechados.

3.4.2 Convulsões químicas

As convulsões foram induzidas pela administração de picroxina (7 mg/mL) e de pentilenotetrazol (70 mg/mL). Estes fármacos foram administrados, por via subcutânea, 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). Desta forma, foi possível calcular a dose convulsivante mínima (DCM) para cada fármaco.

Durante a administração do fármaco convulsivante, cada animal foi observado em gaiolas com paredes de vidro medindo 90 x 40 x 50 cm. A administração do fármaco 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 para cada animal.

Figura 5 – Gaiola com rato recebendo o fármaco convulsivante, por via subcutânea, por meio do aparelho de infusão contínua (Harward-Apparatus/Withdrawal Pumps H.94)

3.4.3 Determinação dos níveis de neurotransmissores

Para a realização das dosagens neuroquímicas os ratos foram submetidos à eutanásia por decapitação; o cérebro foi retirado do crânio e lavado 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 colocadas separadamente em tubos de polipropileno do tipo *ependorf* e estocados em nitrogênio líquido (-80°C); todo este procedimento foi realizado, no máximo, em 3 minutos.

No final dos sacrifícios os tecidos cerebrais foram pesados e diluídos em uma solução de ácido perclórico 0,1 M (8,68 mL de ácido perclórico, 200 mg de metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 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 que foram dosadas. Isto feito, o material foi homogeneizado por sonicação (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 por 20 minutos. Os sobrenadantes foram retirados, devidamente acondicionados em tubos tipo *ependorf* e mantidos em freezer (-80 °C) até o momento da análise das amins, que foram realizadas em uma semana.

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 norepinefrina (NOR) e seus metabólitos 3-metoxi-4-hidroxifeniletilenoglicol (MHPG) e ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (VMA) foram dosadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), com detector eletroquímico. Posteriormente, foram calculadas as relações DOPAC/DA, HVA/DA e 5HIAA/5-HT como indicadores da taxa de renovação (*turnover*) de DA e 5-HT, respectivamente.

O método de HPLC utilizado foi previamente descrito por Felício *et al.* (1996). Foi utilizado um cromatógrafo líquido acoplado a um detector eletroquímico (HPLC-ED; Shimadzu Modelo 6A). O HPLC-ED é 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. A princípio, as condições de trabalho empregadas foram: temperatura 50 °C; tempo de obtenção dos picos: até 24 minutos, sendo que cada amostra foi corrida por 28 min e o limite de detecção desejado foi de 2 pg para DA, DOPAC, 5-HT, e 5-HIAA, e 20 pg para HVA.

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 nM 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 minutos 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 se retêm menos na sílica da coluna, apresentando um tempo de retenção menor.

Os padrões das monoaminas em concentrações de 1 nM de dopamina e seus metabólitos DOPAC e HVA, serotonina e seu metabólito 5HIAA, e de norepinefrina 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, os padrões diluídos foram injetados intercaladamente, e também no final das dosagens dos homogenatos. A curva de calibração foi 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 nitrogênio líquido e levadas para o Instituto Butantan (Unidade de Bioquímica e Biofísica - Dr. Ivo Lebrun), onde foram liofilizadas e armazenadas. No momento das dosagens dos aminoácidos (GABA, glutamato, glicina e aspartato), as amostras foram novamente diluídas.

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

3.4.4 Coleta de material para estudo anátomo-histopatológico

Os animais foram decapitados, sendo realizada a necropsia, coleta e pesagem de fragmentos dos seguintes órgãos para o estudo anátomo-histopatológico: fígado, rins, e cérebro. Os pesos obtidos foram o absoluto e relativo (peso do órgão/peso do animal).

Os fragmentos de todos os órgãos coletados para exame anátomo-patológico (N = 07 por grupo) foram fixados em formol a 10% e processados no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

As análises anátomo-patológicas dos fígados foram avaliadas segundo a tabela 1.

Tabela 1 - Escores para determinação de lesões histopatológicas de fígados de ratos tratados por 28 dias com fipronil.

0	Normal, não apresenta alteração circulatória, degenerativa e necroinflamatória
1	Discreta tumefação celular de hepatócitos com ou sem zoneamento. Ausência de alteração circulatória, degenerativa e necroinflamatória importante.
2	Moderada tumefação celular de hepatócitos com ou sem zoneamento. Ausência de alteração circulatória, degenerativa e necroinflamatória importante.
3	Severa tumefação celular de hepatócitos com ou sem zoneamento. Ausência de alteração circulatória, degenerativa e necroinflamatória importante.

3.5 Delineamento Experimental

3.5.1 Experimento 1: Efeitos da administração prolongada de Fipronil

sobre a atividade geral de ratos.

Os ratos receberam fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água, por *gavage*, durante 28 dias (N = 10 animais por grupo). Uma, 24, 48 horas e 7 dias após a última administração os ratos foram colocados no campo aberto e observados por 5 minutos, conforme descrito no item 3.4.1.1, intercalando-se os animais dos diferentes grupos.

3.5.2 Experimento 2: Efeitos da administração prolongada de fipronil

sobre o comportamento de ratos no Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

Os mesmos animais provenientes do Experimento 1 foram aqui empregados. Assim, imediatamente após a observação no campo aberto, os ratos foram observados no labirinto em cruz elevado, conforme descrito no item 3.4.1.2.

3.5.3 Experimento 3. Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre a dose convulsivante mínima (DCM) de picrotoxina em ratos.

Os ratos receberam fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água, por *gavage*, durante 28 dias (N = 08 animais por grupo). Uma hora após a última administração, os ratos receberam, por via subcutânea, picrotoxina (7 mg/mL) , conforme descrito no item 3.4.2. Desta forma, foi possível calcular a dose convulsivante mínima (DCM) de picrotoxina para os animais controles e tratados com fipronil em diferentes doses.

3.5.4 Experimento 4. Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre a dose convulsivante mínima (DCM) de pentilenotetrazol em ratos.

Os ratos receberam fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água, por *gavage*, durante 28 dias (N = 06 animais por grupo). Uma hora após a última administração, os ratos receberam, por via subcutânea, pentilenotetrazol (70 mg/mL), conforme descrito no item 3.4.2. Desta forma, foi possível calcular a dose convulsivante mínima (DCM) de pentilenotetrazol para os animais controles e tratados com fipronil em diferentes doses.

3.5.5 Experimento 5: Determinação dos níveis dos neurotransmissores e seus metabólitos

Os ratos receberam fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg de peso corpóreo) ou 1 mL/Kg de água, por *gavage*, durante 28 dias (N = 10 animais por grupo). Uma hora após a última administração os ratos foram submetidos à eutanásia e a coleta dos tecidos e a dosagem foram realizadas, conforme descrito no item 3.4.3.

3.5.6 Experimento 6: Estudo anátomo-histopatológico

Os ratos receberam fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água, por *gavage*, durante 28 dias (N = 07 animais por grupo). Uma hora após a última administração os ratos foram submetidos à eutanásia para a coleta dos tecidos e posterior pesagem conforme descrito no item 3.4.4.

3.6 Análise Estatística

Foi utilizada a análise de variância ANOVA para dados paramétricos, seguido do teste de Tukey-Kramer para avaliar as possíveis diferenças entre os grupos. Para dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

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.

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

4. Resultados

4.1 Experimento 1: Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre a atividade geral de ratos

Os efeitos da administração prolongada de fipronil sobre a atividade geral de ratos observados no campo aberto são apresentados nas Tabelas 2-5 e ilustrados pelas Figuras 6-9.

Em relação à **distância percorrida** observada uma, 24, 48 horas e 7 dias após o último dia de tratamento, a análise de variância ANOVA mostrou que não houve diferenças significantes entre os animais dos grupos tratados com fipronil e aqueles do grupo controle em quaisquer que sejam as áreas do campo aberto: **uma hora**: [ARENA: $F(3,36) = 0,59$, $p > 0,05$; TIGMO: $F(3,36) = 1,15$, $p > 0,05$; EXTERNA: $F(3,36) = 0,93$, $p > 0,05$; MÉDIA: $F(3,36) = 0,31$, $p > 0,05$; INTERNA: $F(3,36) = 1,11$, $p > 0,05$] – Tabela 2 e Figura 6.

24 horas: [ARENA: $F(3,36) = 1,222$, $p > 0,05$; TIGMO: $F(3,36) = 0,5206$, $p > 0,05$; EXTERNA: $F(3,36) = 0,6800$, $p > 0,05$; MÉDIA: $F(3,36) = 0,8742$, $p > 0,05$; INTERNA: $F(3,36) = 0,3322$, $p > 0,05$] – Tabela 3 e figura 7.

48 horas: [ARENA: $F(3,36) = 1,638$, $p > 0,05$; TIGMO: $F(3,36) = 0,3589$, $p > 0,05$; EXTERNA: $F(3,36) = 0,5496$, $p > 0,05$; MÉDIA: $F(3,36) = 0,7167$, $p > 0,05$; INTERNA: $F(3,36) = 1,075$, $p > 0,05$] – Tabela 4 e figura 8.

7 dias: [ARENA: $F(3,36) = 0,3968$, $p > 0,05$; TIGMO: $F(3,36) = 0,1835$, $p > 0,05$; EXTERNA: $F(3,36) = 0,6797$, $p > 0,05$; MÉDIA: $F(3,36) = 1,535$, $p > 0,05$; INTERNA: $F(3,36) = 1,311$, $p > 0,05$] – Tabela 5 e figura 9.

Tabela 2 - Distância percorrida (em cm) em diferentes áreas do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas uma hora após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).

Áreas	Controle	Fipronil		
		0,1 mg/kg	1,0 mg/kg	10,0 mg/kg
Arena	2417,20 ± 223,66	2567,40 ± 218,28	2236,00 ± 170,05	2236,60 ± 215,45
Tigmo	1278,30 ± 122,07	1504,80 ± 116,98	1265,50 ± 140,25	1190,80 ± 124,34
Externa	276,18 ± 65,30	308,62 ± 55,678	191,30 ± 52,03	232,42 ± 34,79
Média	122,51 ± 22,04	109,38 ± 21,74	90,64 ± 21,66	110,21 ± 27,63
Interna	42,58 ± 14,58	71,25 ± 16,52	38,34 ± 9,17	57,94 ± 15,78

Distância Percorrida (cm - 1 h)

Figura 6. Distância percorrida (em cm) em diferentes áreas do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas uma hora após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).

Tabela 3 - Distância percorrida (em cm) em diferentes áreas do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 24 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).

Áreas	Controle	Fipronil		
		0,1 mg/kg	1,0 mg/kg	10,0 mg/kg
Arena	1508,8 ± 192,05	1960,0 ± 278,53	1956,8 ± 201,08	1585,2 ± 181,47
Tigmo	894,05 ± 164,01	1127,1 ± 167,66	934,78 ± 140,0	860,65 ± 185,97
Externa	23,335 ± 14,391	45,164 ± 15,631	31,639 ± 19,087	16,388 ± 9,214
Média	14,087 ± 7,753	6,071 ± 4,185	8,165 ± 4,646	2,614 ± 2,614
Interna	4,824 ± 4,824	1,131 ± 0,7673	3,178 ± 3,178	1,376 ± 1,376

Figura 7. Distância percorrida (em cm) em diferentes áreas do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 24 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).

Tabela 4 - Distância percorrida (em cm) em diferentes áreas do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 48 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).

Áreas	Controle	Fipronil		
		0,1 mg/kg	1,0 mg/kg	10,0 mg/kg
Arena	1180,7 ± 142,77	1272,7 ± 137,60	1123,3 ± 119,33	892,42 ± 102,78
Tigmo	835,87 ± 148,90	952,55 ± 152,33	908,16 ± 72,404	795,33 ± 70,841
Externa	34,742 ± 18,757	37,129 ± 26,019	9,738 ± 4,594	22,499 ± 10,363
Média	6,831 ± 6,831	6,546 ± 4,474	0,9920 ± 0,9920	14,593 ± 10,332
Interna	0,0 ± 0,0	3,684 ± 2,731	0,0 ± 0,0	2,124 ± 2,124

Distância Percorrida Campo aberto (cm- 48h)

Figura 8. Distância percorrida (em cm) em diferentes áreas do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 48 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).

Tabela 5 - Distância percorrida (em cm) em diferentes áreas do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 7 dias após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).

Áreas	Controle	Fipronil		
		0,1 mg/kg	1,0 mg/kg	10,0 mg/kg
Arena	1532,3±282,38	1526,9 ±383,25	1342,3 ±135,94	1168,0 ±164,92
Tigmo	900,55±202,19	1034,0 ±234,50	856,39 ±160,12	865,92 ±146,63
Externa	169,72 ±107,01	85,198 ±58,736	35,676 ±23,887	68,756 ±47,253
Média	65,309±36,691	20,823 ±16,774	4,456 ±3,480	11,660 ±11,660
Interna	24,448±15,010	7,611 ±7,611	3,296 ±3,296	1,874 ±1,874

Figura 9. Distância percorrida (em cm) em diferentes áreas do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 7 dias após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).

Considerando o **número de levantamentos**, observado uma hora após o último dia de tratamento, a análise de variância ANOVA, seguida do teste de Tukey-Kramer apontou as diferenças significantes entre os grupos controle e tratados apenas na ARENA ($F(3,36) = 3,41, p < 0,05$); na área TIGMO não houve diferenças significantes entre os grupos ($F(3,36) = 2,56, p > 0,05$) – Tabela 6 e Figura 10. Não houve diferenças significantes entre os grupos em relação a 24, 48 horas e 7 dias após o último dia de tratamento, em nenhuma das áreas do campo aberto.

24 horas: ARENA ($F(3,36) = 0,5009, p > 0,05$); TIGMO ($F(3,36) = 0,5878, p > 0,05$) – Tabela 6 e Figura 10.

48 horas: ARENA ($F(3,36) = 3,031, p > 0,05$); TIGMO ($F(3,36) = 0,9858, p > 0,05$) – Tabela 7 e Figura 11.

7 dias: ARENA ($F(3,36) = 1,448, p > 0,05$); TIGMO ($F(3,36) = 2,007, p > 0,05$) – Tabela 8 e Figura 12.

Tabela 6 - Número de levantamentos na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas uma hora após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer * $p < 0,05$, em relação aos controles).

Área	Controle	Fipronil		
		0,1 mg/kg	1,0 mg/kg	10,0 mg/kg
Arena	18,10 ± 4,14	11,3 ± 2,52	8,70 ± 2,35	6,10 ± 1,46*
Tigmo	8,20 ± 2,58	5,60 ± 1,47	3,30 ± 1,65	1,90 ± 0,57

Figura 10. Número de levantamentos na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas uma hora após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer * $p < 0,05$, em relação aos controles).

Tabela 7 - Número de levantamentos na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 24 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p > 0,05$).

Áreas	Controle	Fipronil		
		0,1 mg/kg	1,0 mg/kg	10,0 mg/kg
Arena	3,90 $\pm$ 0,674	4,70 $\pm$ 1,430	5,60 $\pm$ 2,276	3,20 $\pm$ 0,9286
Tigmo	1,50 $\pm$ 0,6191	1,70 $\pm$ 0,6506	1,00 $\pm$ 0,394	0,800 $\pm$ 0,4899

Figura11. Número de levantamentos na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 24 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).

Tabela 8 - Número de levantamentos na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 48 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).

Áreas	Controle	Fipronil		
		0,1 mg/kg	1,0 mg/kg	10,0 mg/kg
Arena	2,100 ±0,433	2,200±0,5538	1,100 ±0,2769	0,800±0,2906
Tigmo	1,400±0,4761	1,700 ±0,6155	1,00±0,2981	0,700 ±0,300

Número de Levantar campo aberto - 48h

Figura 12. Número de levantamentos na arena e na área de tigmotaxia (tímo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 48 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p > 0,05$).

Tabela 9 - Número de levantamentos na arena e na área de tigmotaxia (tímo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 7 dias após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p > 0,05$).

Áreas	Controle	Fipronil		
		0,1 mg/kg	1,0 mg/kg	10,0 mg/kg
Arena	4,875 ±2,030	3,500±2,044	1,143±0,4041	1,00±0,4364
Tímo	2,875±1,231	1,375 ±0,7055	0,7143±0,2857	0,4286 ±0,2020

Número de Levantar no Campo Aberto - 7dias

Figura13. Número de levantamentos na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 7 dias após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p > 0,05$).

A análise de variância ANOVA mostrou que não há diferenças entre o **tempo de *grooming*** (auto-limpeza) dos animais tratados com fipronil e aqueles dos animais do grupo controle, observados uma, 24, 48 horas e 7 dias após o último dia de tratamento. **Uma hora**: ARENA ($F(3,36) = 0,64$, $p > 0,05$) e área de TIGMOTAXIA ($F(3,36) = 0,59$, $p > 0,05$), como mostram a Tabela 10 e a Figura 14.

24 horas: ARENA ($F(3,36) = 1,487$, $p > 0,05$) e área de TIGMOTAXIA ($F(3,36) = 1,191$, $p > 0,05$). Tabela 11 e Figura 15.

48 horas: ARENA ($F(3,36) = 1,386$, $p > 0,05$) e área de TIGMOTAXIA ($F(3,36) = 1,635$, $p > 0,05$). Tabela 12 e Figura 16.

7 dias: ARENA ($F(3,36) = 0,3098$, $p>0,05$) e área de TIGMOTAXIA ($F(3,36) = 0,3046$, $p>0,05$). Tabela 13 e Figura 17.

Tabela 10 - Tempo de *grooming* (auto-limpeza) em segundos, na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas uma hora após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).

Áreas	Controle	Fipronil		
		0,1mg/kg	1,0mg/kg	10,0mg/kg
Arena	25,42 ± 6,33	18,78 ± 9,30	12,55 ± 3,52	18,42 ± 5,87
Tigmo	16,86 ± 5,94	14,28 ± 9,06	8,92 ± 2,86	7,54 ± 2,48

Figura 14. Tempo de *grooming* (auto-limpeza) em segundos, na arena e na zona de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas uma hora após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).

Tabela 11 - Tempo de *grooming* (auto-limpeza) em segundos, na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 24 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).

Áreas	Fipronil			
	Controle	0,1mg/kg	1,0mg/kg	10,0mg/kg
Arena	15,85 ± 5,076	16,545 ± 6,731	14,370 ± 3,743	28,860 ± 5,966
Tigmo	9,960 ± 4,846	2,550 ± 2,014	7,305 ± 2,848	10,440 ± 2,874

Figura 15. Tempo de *grooming* (auto-limpeza) em segundos, na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 24 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).

Tabela 12 - Tempo de *grooming* (auto-limpeza) em segundos, na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 48 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).

Áreas	Controle	Fipronil		
		0,1mg/kg	1,0mg/kg	10,0mg/kg
Arena	17,430 ± 6,063	10,020 ± 3,235	6,075 ± 2,426	16,875 ± 5,856
Tigmo	7,650 ± 3,909	7,080 ± 2,642	5,490 ± 2,502	16,545 ± 5,685

Figura 16. Tempo de *grooming* (auto-limpeza) em segundos, na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 48 horas após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p>0,05$).

Tabela 13 - Tempo de *grooming* (auto-limpeza) em segundos, na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 7 dias após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p > 0,05$).

Áreas	Controle	Fipronil		
		0,1mg/kg	1,0mg/kg	10,0mg/kg
Arena	9,825 ± 5,760	7,388 ± 3,087	9,793 ± 3,899	4,821 ± 3,114
Tigmo	3,094 ± 2,767	7,238 ± 3,101	5,721 ± 4,066	7,286 ± 4,671

Figura 17. Tempo de *grooming* (auto-limpeza) em segundos, na arena e na área de tigmotaxia (tigmo) do campo aberto de ratos tratados com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*, durante 28 dias. Dados referentes às observações feitas 7 dias após o último dia de tratamento. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p > 0,05$).

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

Os efeitos da administração prolongada de fipronil sobre o comportamento de ratos no LCE são apresentados nas Tabelas 14- 18 ilustrados pelas Figuras 18 - 22.

Análise de variância ANOVA não apontou diferenças significantes entre os grupos controle e tratados em relação à **distância percorrida** total e nos braços fechados (Total: $F(3,36) = 1,48$, $p > 0,05$); Braços fechados: $F(3,36) = 1,31$, $p > 0,05$). Por outro lado, em relação à distância percorrida nos braços abertos, a análise de variância ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer ($F(3,36) = 4,02$, $p < 0,05$) mostrou redução deste parâmetro em ratos tratados com 1,0 e 10,0 mg/Kg de fipronil em relação aos animais do grupo controle (Tabela 14 e a Figura 18).

Tabela 14. Distância percorrida (cm) no labirinto em cruz elevado de ratos tratados 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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. N = 10 por grupo. (* $p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, em relação aos controles).

Braços	Controle	Fipronil		
		0,1mg/kg	1,0mg/kg	10mg/kg
Braços abertos	366,75 ± 99,60	156,72 ± 64,67	115,26 ± 45,14*	67,65 ± 33,89*
Braços fechados	748,36 ± 150,70	885,41 ± 127,04	1033,60 ± 69,76	800,11 ± 60,67
Total	1431,8 ± 150,23	1343,60 ± 162,92	1400,00 ± 74,88	1102,40 ± 73,78

Figura 18. Distância percorrida (cm) no labirinto em cruz elevado de ratos tratados 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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. N = 10 por grupo. (* $p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, em relação aos controles).

Análise de variância ANOVA não apontou diferenças significantes entre os grupos controle e tratados em relação ao **número de entradas** nos braços fechados ($F(3,36) = 1,83$, $p > 0,05$) e abertos ($F(3,36) = 3,10$, $p > 0,05$) – Tabela 15 e Figura 19.

Tabela 15. Número de entradas em cada braço do labirinto em cruz elevado de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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. N = 10 por grupo. ($p > 0,05$, ANOVA).

Braços	Controle	Fipronil		
		0,1mg/kg	1,0mg/kg	10,0mg/kg
Braços abertos	9,30 ± 2,38	4,10 ± 0,75	4,60 ± 0,62	4,00 ± 1,32
Braços fechados	28,60 ± 5,91	40,40 ± 11,47	18,30 ± 2,43	24,10 ± 4,36

Figura 19. Número de entradas em cada braço do labirinto em cruz elevado de ratos tratados 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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. N = 10 por grupo. ($p > 0,05$, ANOVA).

Em relação ao **tempo de permanência nos braços abertos e fechados**, a análise de variância ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer mostrou redução do tempo nos braços abertos ($F(3,36) = 4,233$, $p < 0,05$) e aumento do tempo nos braços fechados ($F(3,36) = 5,087$, $p < 0,05$) dos animais tratados com 1,0 e 10,0 mg/Kg de fipronil, em relação aos animais do grupo controle – Tabela 16 e Figura 20.

Tabela 16. Tempo de permanência (em segundos) nos braços abertos, fechados e área central do labirinto em cruz elevado de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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. N = 10 por grupo. (*p<0,05, ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, em relação aos controles).

Áreas	Controle	Fipronil		
		0,1mg/kg	1,0mg/kg	10,0mg/kg
Braços abertos	71,74 ± 22,28	26,01 ± 8,63	20,53 ± 5,72*	14,50 ± 6,43*
Braços fechados	126,18 ± 23,49	189,83 ± 16,49	218,45 ± 16,98**	212,63 ± 17,05*
Central	20,07±3,31	12,25±5,34	15,91±3,41	10,83 ± 2,29

Figura 20. Tempo de permanência (em segundos) nos braços abertos, fechados e área central do labirinto em cruz elevado de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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. N = 10 por grupo. (*p<0,05, ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, em relação aos controles).

A análise de variância ANOVA não mostrou diferenças significante no **número de movimentos iniciados** total ($F(3,36) = 0,9675$, $p>0,05$); braços

abertos ($F(3,36) = 2,672$, $p > 0,05$); braços fechados ($F(3,36) = 0,2629$, $p > 0,05$) entre animais tratados com fipronil e aqueles do grupo controle.

Tabela 17. Número de movimentos iniciados nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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. N = 10 por grupo. (ANOVA, $p > 0,05$).

Zona	Controle	Fipronil		
		0,1mg/kg	1,0mg/kg	10,0mg/kg
Braços abertos	5,50 ± 1,63	2,30 ± 1,11	2,30 ± 1,05	1,10 ± 0,59
Braços fechados	12,90 ± 3,14	12,1 ± 2,76	13,50 ± 1,09	10,80 ± 1,45
Total	22,20 ± 4,02	18,30 ± 3,80	19,30 ± 1,50	14,90 ± 2,17

Figura 21. Número de movimentos iniciados nos braços abertos e fechados no LCE de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg) ou 1 mL/Kg de água destilada (controle), por *gavage*. Os resultados são expressos em média ± erro padrão da média. Número de animais por grupo = 10. (ANOVA, $p > 0,05$).

A análise de variância ANOVA não mostrou diferenças significante no parâmetro **tempo em movimento** total ($F(3,36) = 1,528$, $p > 0,05$); e nos braços

fechados ($F(3,36) = 0,4815$, $p > 0,05$). Por outro lado, a análise de variância ANOVA, seguida do teste de Tukey-Kramer mostrou que houve nos braços abertos uma diferença significativa entre os animais tratados com 10mg/Kg de fipronil e os controles ($F(3,36) = 3,453$, $p < 0,05$). –Tabela 18 e a figura 22.

Tabela 18. Tempo em movimento (em segundos) nos braços abertos e fechados no LCE de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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. N = 10 por grupo. (* $p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, em relação aos controles).

Zona	Fipronil			
	Controle	0,1mg/kg	1,0mg/kg	10,0mg/kg
Braços abertos	12,24 ± 2,96	5,64 ± 2,95	4,33 ± 2,21	1,63 ± 1,11*
Braços fechados	28,45 ± 7,15	25,62 ± 6,63	28,87 ± 3,26	20,86 ± 2,68
Total	45,61 ± 8,26	37,26 ± 8,41	37,38 ± 3,34	26,28 ± 3,84

Tempo em movimento - (s - 1h)

Figura 22. Tempo em movimento nos braços abertos e fechados (em segundos) no LCE de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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. N = 10 por grupo. (* $p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, em relação aos controles).

4.3 Experimento 03: Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre a dose convulsivante mínima (DCM) de picrotoxina em ratos.

A análise de variância ANOVA, seguida do teste de Tukey-Kramer, apontou redução da DCM de picrotoxina em animais tratados com 10,0 mg/Kg de fipronil em relação aos animais do grupo controle ($F(3,28) = 5,799$, $p < 0,05$).

– Tabela 19 e Figura 23.

Tabela 19. Dose convulsivante mínima (DCM) de picrotoxina (mg/Kg) em ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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. N = 8 por grupo. (* $p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, em relação aos controles).

Fármaco	Controle	Fipronil		
		0,1mg/kg	1,0mg/kg	10,0mg/kg
Picrotoxina	8,58 ± 0,71	9,35 ± 1,22	9,90 ± 1,05	5,08 ± 0,37*

Figura 23. Dose convulsivante mínima (DCM) de picrotoxina (mg/Kg) em ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1; 1,0 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. N = 8 por grupo. (* $p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, em relação aos controles).

4.4 Experimento 04: Efeitos da administração prolongada 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 10,0 mg/Kg de fipronil em relação aos animais do grupo controle ($F(3,20) = 4,537$, $p < 0,05$). –Tabela 20 e Figura 24.

Tabela 20. Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre a dose convulsivante mínima (DCM) de pentilenotetrazol em ratos. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. N = 6 por grupo. (* $p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, em relação aos controles).

Fármaco	Controle	Fipronil		
		0,1mg/kg	1,0mg/kg	10mg/kg
Pentilenotetrazol	91,15 ± 8,54	86,03 ± 6,2	95,14 ± 4,28	62,49 ± 7,67*

Figura 24. Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre a dose convulsivante mínima (DCM) de pentilenotetrazol em ratos. Os resultados são expressos em média ± erro padrão da média. Número de animais por grupo = 06. (* $p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, em relação aos controles).

4.5 Experimento 5: Determinação dos níveis dos neurotransmissores e seus metabólitos.

A análise de variância ANOVA não mostrou diferenças significantes nas determinações dos níveis do neurotransmissor norepinefrina no córtex cerebral ($F(3,35) = 2,877$, $p \geq 0,05$ - Tabela 21), no *striatum* ($F(3,29) = 0,8978$, $\geq 0,05$ – Tabela 22) e nem no hipotálamo ($F(3,30) = 0,4230$, $\geq 0,05$ – Tabela 23). Não foi possível a determinação do metabólito da norepinefrina, VMA, em nenhuma das estruturas cerebrais estudadas.

Para as determinações dos níveis de dopamina no córtex cerebral, a análise de variância ANOVA mostrou diferenças estatisticamente significante entre os grupos ($F(3,35) = 3,677$, $p < 0,05$) e o teste de Tukey-Kramer mostrou aumento dos níveis desse neurotransmissor nos animais tratados com a maior dose, em relação àqueles do grupo controle(Tabela 21). Em relação às determinações dos níveis de dopamina no *striatum* ($F(3,29) = 1,805$, $p > 0,05$ - Tabela 22) e no hipotálamo ($F(3,30) = 1,778$, $p > 0,05$ – Tabela 23), a análise de variância ANOVA não apresentou alterações estatisticamente significantes entre os grupos.

Em relação às determinações dos níveis dos metabólitos da dopamina, DOPAC e HVA, as análises de variância ANOVA não revelaram diferenças estatisticamente significante entre os grupos, tanto no córtex cerebral (Tabela 21), como no *striatum* (Tabela 22) e hipotálamo (Tabela 23).

Considerando as determinações dos níveis de serotonina no córtex cerebral, a análise de variância ANOVA revelou alterações estatisticamente significantes entre os grupos ($F(3,35) = 7,497$, $p < 0,05$) e o teste de Tukey-Kramer mostrou aumento dos níveis desse neurotransmissor nos animais

tratados com 1,0 mg/Kg de fipronil, em relação àqueles do grupo controles. No *striatum* a análise de variância ANOVA revelou alterações estatisticamente significantes entre os grupos e o teste de Tukey-Kramer revelou redução dos níveis do neurotransmissor serotonina entre os animais tratados com 0,1 e 1,0 mg/Kg p.c. de fipronil e àqueles controles ($F(3,29) = 12,332$, $p < 0,0001$); e no hipotálamo ($F(3,30) = 0,2807$, $p > 0,05$) não foram encontradas alterações estatisticamente significantes.

Em relação aos níveis do metabólito de serotonina no córtex cerebral, ou seja, o 5 HIAA, a análise de variância ANOVA revelou diferenças significantes entre os grupos ($F(3,35) = 20,018$, $p < 0,0001$) e o teste de Tukey-kramer mostrou redução desse metabólito nos ratos do grupo tratado com 0,1 e 1,0 mg/kg de fipronil, em relação àqueles do grupo controle.

No *striatum*, considerando os níveis de 5 HIAA, a análise de variância ANOVA não mostrou alterações estatisticamente significantes entre os grupos ($F(3,29) = 0,1082$, $p > 0,05$). Tabela 21 e Figura 25.

Considerando o neurotransmissor GABA, a análise de variância ANOVA, não revelou alterações estatisticamente significantes entre os grupo no córtex cerebral ($F(3,34) = 1,610$, $p > 0,05$) e nem no hipotálamo ($F(3,24) = 0,1836$, $p > 0,05$). Por outro lado, no *striatum*, a análise de variância ANOVA, revelou alterações estatisticamente significantes entre os grupos ($F(3,32) = 3,945$, $p < 0,05$) e o teste de Tukey-Kramer mostrou uma redução nos níveis de GABA dos animais tratados com 1,0 mg/Kg p.c. de fipronil em relação àqueles controles.

Tabela 21. Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre os níveis dos neurotransmissores e de seus metabólitos (em ng/g de tecido) e GABA ($\mu\text{g/g}$ tecido) no córtex cerebral de ratos. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$, ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação aos animais do grupo controle).

Fipronil				
Neurotransmissor	Controle	0,1 mg/Kg	1,0 mg/Kg	10,0 mg/Kg
	(N=10)	(N=10)	(N=9)	(N=10)
Norepinefrina	524,05 $\pm$ 36,92	526,29 $\pm$ 18,43	375,58 $\pm$ 27,16	547,21 $\pm$ 74,40
Dopamina	478,67 $\pm$ 119,03	662,28 $\pm$ 103,12	678,40 $\pm$ 118,96	1114,00 $\pm$ 201,40*
Serotonina	1766,8 $\pm$ 76,10	1405,3 $\pm$ 158,33	2405,7 $\pm$ 233,84*	1684,4 $\pm$ 109,24
GABA	798,11 $\pm$ 87,579	755,20 $\pm$ 104,13	625,02 $\pm$ 102,76	524,80 $\pm$ 96,579
Metabólito	Controle	0,1 mg/Kg p.c.	1,0 mg/Kg p.c.	10,0 mg/Kg p.c.
	(N=10)	(N=10)	(N=9)	(N=10)
DOPAC	223,98 $\pm$ 46,54	164,81 $\pm$ 28,23	259,35 $\pm$ 44,87	282,04 $\pm$ 54,49
HVA	181,63 $\pm$ 39,93	79,74 $\pm$ 19,79	210,25 $\pm$ 26,53	251,78 $\pm$ 48,13
5HIAA	3349,5 $\pm$ 176,70	1747,3 $\pm$ 218,81***	1615,7 $\pm$ 307,60***	3423,4 $\pm$ 169,05

Figura 25. Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre os níveis dos neurotransmissores e de seus metabólitos (em ng/g de tecido) e GABA ($\mu\text{g/g}$ tecido) no córtex cerebral de ratos. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. (* $p<0,05$ e *** $p<0,001$, ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação aos animais do grupo controle).

Tabela 22. Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre os níveis dos neurotransmissores e de seus metabólitos em ng/g de tecido e para o GABA ($\mu\text{g/g}$ de tecido) no *striatum* de ratos. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação aos controles).

Fipronil				
Neurotransmissor	Controle	0,1 mg/Kg p.c.	1,0 mg/Kg p.c.	10,0 mg/Kg p.c.
	(N=08)	(N=08)	(N=08)	(N=09)
Norepinefrina	333,29 $\pm$ 31,45	330,26 $\pm$ 22,96	314,15 $\pm$ 50,51	263,58 $\pm$ 29,84
Dopamina	2929,9 $\pm$ 432,96	3889,1 $\pm$ 636,64	4517,9 $\pm$ 1283,1	2052,2 $\pm$ 686,39
Serotonina	2898,5 $\pm$ 261,36	1052,0 $\pm$ 216,17***	952,20 $\pm$ 134,55***	2488,6 $\pm$ 397,13
GABA	1046,9 $\pm$ 225,43	972,16 $\pm$ 205,39	422,88 $\pm$ 55,048*	505,93 $\pm$ 80,694
Metabólito	Controle	0,1 mg/Kg p.c.	1,0 mg/Kg p.c.	10,0 mg/Kg p.c.
	(N=08)	(N=08)	(N=08)	(N=09)
DOPAC	626,27 $\pm$ 82,97	589,00 $\pm$ 119,37	589,62 $\pm$ 129,82	418,01 $\pm$ 93,84
HVA	437,67 $\pm$ 52,78	312,99 $\pm$ 85,97	307,18 $\pm$ 78,03	302,97 $\pm$ 89,36
5HIAA	2001,0 $\pm$ 182,77	2317,0 $\pm$ 543,13	2129,1 $\pm$ 295,42	2075,2 $\pm$ 471,60

Figura 26. Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre os níveis dos neurotransmissores e de seus metabólitos em ng/g de tecido e para o GABA ($\mu\text{g/g}$ de tecido) no *striatum* de ratos. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. (* $p<0,05$, *** $p<0,001$, ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação aos controles).

Tabela 23. Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre os níveis dos neurotransmissores e de seus metabólitos em ng/g de tecido e para o GABA ($\mu\text{g/g}$ de tecido) no hipotálamo de ratos. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. ($p>0,05$, ANOVA).

		Fipronil		
Neurotransmissor	Controle	0,1 mg/Kg p.c.	1,0 mg/Kg p.c.	10,0 mg/Kg p.c.
	(N=09)	(N=07)	(N=08)	(N=10)
Norepinefrina	1886,3 $\pm$ 226,41	1655,0 $\pm$ 378,47	1996,8 $\pm$ 140,52	1689,2 $\pm$ 222,18
Dopamina	366,71 $\pm$ 71,36	305,18 $\pm$ 51,47	350,20 $\pm$ 28,62	553,32 $\pm$ 120,90
Serotonina	2415,7 $\pm$ 257,23	2304,0 $\pm$ 209,24	2340,7 $\pm$ 329,30	2621,3 $\pm$ 271,18
GABA	783,26 $\pm$ 72,064	846,57 $\pm$ 115,76	769,09 $\pm$ 73,632	783,08 $\pm$ 53,057
Metabólito	Controle	0,1 mg/Kg p.c.	1,0 mg/Kg p.c.	10,0 mg/Kg p.c.
	(N=09)	(N=07)	(N=08)	(N=10)
DOPAC	98,617 $\pm$ 30,35	76,322 $\pm$ 13,28	84,362 $\pm$ 11,01	143,78 $\pm$ 24,58
HVA	25,959 $\pm$ 5,96	50,966 $\pm$ 12,87	51,244 $\pm$ 24,22	94,085 $\pm$ 23,70
5HIAA	1797,7 $\pm$ 126,18	1721,5 $\pm$ 180,68	1618,9 $\pm$ 153,17	1608,1 $\pm$ 91,50

Figura 27. Efeitos da administração prolongada de fipronil sobre os níveis dos neurotransmissores e de seus metabólitos em ng/g de tecido e para o GABA ($\mu\text{g/g}$ de tecido) no hipotálamo de ratos. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões da média. ($p > 0,05$, ANOVA).

Considerando as relações DOPAC/DA, HVA/DA e 5HIAA/5-HT como indicadores da taxa de renovação (*turnover*) de dopamina e serotonina, no córtex a análise de variância ANOVA mostrou diferenças entre os grupos ($F(3,35) = 9,516$, $p < 0,01$), sendo observado redução no *turnover* de serotonina dos animais tratados com 1,0 mg/kg em relação aos animais do grupo controle. Não foram observadas diferenças entre os grupos quando se analisou as relações DOPAC/DA e HVA/DA ($F(3,35) = 1,325$, $p > 0,05$) e ($F(3,35) = 2,798$, $p > 0,05$, respectivamente) – Tabela 24 e Figura 28.

Em relação ao *turnover* de serotonina e dopamina no *striatum* a análise de variância ANOVA, mostrou diferença estatisticamente significativa no *turnover* da serotonina ($F(3,29) = 41,280$, $p < 0,001$) e o teste de Tukey-Kramer revelou um

aumento nos níveis do *turnover* da serotonina nos animais tratados com 0,1 e 1,0 mg/Kg p.c. de fipronil em relação àqueles controles.

Considerando as relações DOPAC/DA no *striatum*, a análise de variância ANOVA, não mostrou alterações estatisticamente significantes ($F(3,29) = 1,166$, $p > 0,05$). Por outro lado, para as relações HVA/DA, a análise de variância ANOVA revelou alterações estatisticamente entre os grupos ($F(3,29) = 6,407$, $p < 0,05$) e o teste de Tukey-Kramer mostrou redução estatisticamente significativa para os animais tratados com 1,0 mg/Kg p.c. de fipronil em relação àqueles controles.

Em relação ao hipotálamo, a análise de variância ANOVA, não revelou alterações estatisticamente significantes para as relações 5HIAA/5HT ($F(3,29) = 1,153$), DOPAC/DA ($F(3,29) = 0,6049$) e HVA/DA ($F(3,29) = 1,089$, $p > 0,05$).

Tabela 24. Relações DOPAC/DA, HVA/DA e 5HIAA/5-HT como indicadores da taxa de renovação (turnover) de DA e 5-HT, respectivamente em córtex cerebral, *striatum* e hipotálamo de ratos tratados por 28 dias com 0,1 mg/Kg p.c., 1,0 mg/Kg p.c., 10,0 mg/Kg p.c. de fipronil ou 1mL/Kg p.c. de água destilada. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. (**p<0,001, *p<0,01, *p< 0,05ANOVA seguida do teste de Tukey).

Relação neurotransmissor metabólito		Fipronil			
		Controle	0,1 mg/Kg	1,0 mg/Kg	10,0 mg/Kg
		(N=10)	(N=10)	(N=09)	(N=10)
córtex cerebral					
DOPAC/DA	0,7069 ± 0,263	0,2778 ± 0,045	0,5313 ± 0,199	0,3281 ± 0,105	
HVA/DA	0,5221 ± 0,144	0,1392 ± 0,032	0,4564 ± 0,134	0,2931 ± 0,066	
5HIAA/5HT	1,953 ± 0,180	1,314 ± 0,130	0,8544 ± 0,274**	2,085 ± 1,929	
<i>striatum</i>	(N=08)	(N=08)	(N=08)	(N=09)	
DOPAC/DA	0,2304 ± 0,028	0,1482 ± 0,017	0,1528 ± 0,019	0,5072 ± 0,292	
HVA/DA	0,1604 ± 0,017	0,07921 ± 0,019	0,07323 ± 0,010*	0,1795 ± 0,031	
5HIAA/5HT	0,7468 ± 0,113	2,161 ± 0,0971***	2,337 ± 0,211***	0,8257 ± 0,074	
Hipotálamo	(N=08)	(N=07)	(N=08)	(N=10)	
DOPAC/DA	0,2799 ± 0,041	0,2652 ± 0,036	0,2512 ± 0,035	0,3447 ± 0,077	
HVA/DA	0,1039 ± 0,074	0,1960 ± 0,051	0,1560 ± 0,072	0,3508 ± 0,152	
5HIAA/5HT	1,372 ± 0,065	1,384 ± 0,136	1,427 ± 0,099	1,666 ± 0,178

Figura 28. Relações DOPAC/DA, HVA/DA e 5HIAA/5-HT como indicadores da taxa de renovação (turnover) de DA e 5-HT, respectivamente em córtex cerebral de ratos tratados por 28 dias com 0,1 mg/Kg p.c., 1,0 mg/Kg p.c., 10,0 mg/Kg p.c. de fipronil ou 1mL/Kg p.c. de água destilada. (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação aos controles).

Turnover de DA e 5HT em estriatum

Figura 29. Relações DOPAC/DA, HVA/DA e 5HIAA/5-HT como indicadores da taxa de renovação (turnover) de DA e 5-HT, respectivamente em *striatum* de ratos tratados com 0,1 mg/Kg p.c., 1,0 mg/Kg p.c., 10,0 mg/Kg p.c. de fipronil ou 1mL/Kg p.c. de água destilada. (***) $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$, (*) $p < 0,05$ ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação aos controles).

Figura 30. Relações DOPAC/DA, HVA/DA e 5HIAA/5-HT como indicadores da taxa de renovação (turnover) de DA e 5-HT, respectivamente em hipotálamo de ratos tratados com 0,1 mg/Kg p.c., 1,0 mg/Kg p.c., 10,0 mg/Kg p.c. de fipronil ou 1mL/Kg p.c. de água destilada. ($p > 0,05$, ANOVA)

4.6 Experimento 6: Estudo anátomo e histopatológico.

4.6.1 Peso absoluto dos órgãos.

Em relação ao peso absoluto do fígado, a análise de variância ANOVA mostrou diferenças significantes entre os grupos ($F(3,28) = 9,387$, $p < 0,001$) e o teste de Tukey-Kramer revelou aumento do peso do fígado dos animais tratados com a maior dose, quando comparado com àqueles do grupo controle. Quanto ao cérebro, rins direito e esquerdo, a ANOVA não mostrou diferenças entre os grupos ($F(3,23) = 0,5083$; $F(3,24) = 0,6708$ e $F(3,24) = 0,8322$, $p > 0,05$, respectivamente) - Tabela 25 e Figura 31.

Tabela 25. Peso absoluto (em g) dos órgãos fígado, cérebro e rins de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1, 1,0 ou 10,0 mg/Kg p.c.) ou água destilada via *gavage*. (***) $p < 0,001$, ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação aos controles).

Órgãos	Controle	0,1 mg/Kg	1,0 mg/Kg	10,0 mg/Kg
Fígado	13,317 ± 0,905	13,187 ± 0,331	14,475 ± 0,597	17,409 ± 0,596***
Cérebro	1,795 ± 0,066	1,834 ± 0,027	1,877 ± 0,061	1,882 ± 0,068
Rim direito	1,226 ± 0,046	1,198 ± 0,040	1,268 ± 0,057	1,273 ± 0,023
Rim esquerdo	1,180 ± 0,033	1,160 ± 0,053	1,241 ± 0,057	1,238 ± 0,031

Figura 31. Peso absoluto dos órgãos fígado, cérebro e rins de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1, 1,0 ou 10,0 mg/Kg p.c.) ou água destilada via *gavage*. (***) $p < 0,001$, ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação aos controles).

4.6.2 Peso Relativo de Fígados

Considerando o peso relativo dos órgãos a análise de variância ANOVA revelou alterações estatisticamente significantes entre os grupos ($F(3,24) = 10,697$, $p < 0,0001$) e o teste de Tukey-Kramer mostrou um aumento do peso relativo dos fígados dos animais tratados com 10,0 mg/Kg p.c. de fipronil em relação àqueles controles. Em relação ao peso relativo de cérebro e rins direito e esquerdo, a análise de variância ANOVA não revelou alterações estatisticamente significantes ($F(3,23) = 0,9606$), ($F(3,24) = 0,4338$), ($F(3,24) = 0,8322$), $p > 0,05$, respectivamente. Tabela 26 – Figura 32.

Tabela 26. Peso relativo (peso do órgão ÷ peso do animal) de fígados, cérebros e rins direito e esquerdo de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1, 1,0 ou 10,0 mg/Kg p.c.) ou água destilada via *gavage*. (**p<0,001, ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação aos controles).

Órgão	Fipronil			
	Controle	0,1 mg/Kg p.c.	1,0 mg/Kg p.c.	10,0 mg/Kg p.c.
Fígado	0,03189 ± 0,0015	0,03475 ± 0,0011	0,03664 ± 0,0010	0,04312 ± 0,002***
Cérebro	0,004498 ± 0,0002	0,004872 ± 0,0001	0,004757 ± 0,0001	0,004607 ± 0,0002
Rim direito	0,003066 ± 0,00005	0,003172 ± 0,00007	0,003215 ± 0,0001	0,003150 ± 0,00008
Rim esquerdo	0,002947 ± 0,00008	0,003066 ± 0,0001	0,003143 ± 0,0001	0,003064 ± 0,0001

Figura 32. Peso relativo (peso do órgão ÷ peso do animal) de fígados, cérebros e rins direito e esquerdo de ratos tratados por 28 dias com fipronil (0,1, 1,0 ou 10,0 mg/Kg p.c.) ou água destilada via *gavage*. (**p<0,001, ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação aos controles).

4.6.3 Estudo Histopatológico.

No fígado não foram observadas alterações circulatória, degenerativa e necroinflamatória importante; contudo, foi observada tumefação celular de hepatócitos com ou sem zoneamento, variando de discreta a severa (Figura 33 A e 33 B).

A Tabela 27 mostra os escores das lesões histopatológicas de fígados de ratos tratados ou não com fipronil, por 28 dias. O teste de Kruskal-Wallis revelou diferenças significantes entre os grupos (KW = 21,726, $p < 0.0001$) e o teste de comparações múltiplas de Dunn's mostrou aumento significativo dos escores indicativos de lesão hepática nos animais tratados com as duas maiores doses de fipronil, em relação aos animais do grupo controle (Tabela 27).

Tabela 27. Escores atribuídos às lesões histopatológicas de fígados de ratos tratados com fipronil ou água destilada por 28 dias, via *gavage*. N indica o número de animais por grupo (*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, teste de Kruskal-Wallis seguido teste de comparações múltiplas de Dunn's, em relação aos controles).

Grupos (N=7/grupo)		Escore	
Controle	Mediana	Limite inferior	Limite superior
	0,000	0,000	0,000
0,1 mg/Kg p.c.	1,000	1,000	2,000
1,0 mg/Kg p.c.	2,000	2,000	2,000**
10,0mg/Kg p.c.	2,000	2,000	3,000***

O estudo histopatológico do cérebro foi prejudicado, sendo analisados os tecidos de apenas 3 ou 4 animais de cada grupo. Os achados consistiram em foco de micro-hemorragia, hemorragia e congestão próximo ao cerebelo, às

meninges, ao hipocampo e outras áreas (múltiplas áreas). Nas duas doses maiores esse quadro foi moderado, enquanto que nos animais dos grupos controle e da menor dose, os achados foram discretos.

Nos rins não foram observadas alterações histopatológicas dignas de nota.

A)

B)

Figura 33. Fotomicrografia de fígado. A – animal do grupo controle, no qual não se observam alterações histopatológicas dignas de nota; aumento de 10X, coloração hematoxilina-eosina (HE). B – animal do grupo tratado com 10,0 mg/Kg de fipronil, no qual se observa tumefação de hepatócitos com ou sem zoneamento; aumento de 10X, coloração HE.

5 - Discussão

Os resultados do presente estudo mostram que ratos expostos prolongadamente ao fipronil apresentam algumas alterações comportamentais e que estas alterações podem ser mediadas por sistemas de neurotransmissão central, incluindo o sistema GABAérgico.

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, como já bem discutido por BERNARDI e PALERMO-NETO, em 1980.

O campo aberto é bastante utilizado já há muito tempo para avaliar a atividade locomotora, exploração e emocionalidade de roedores (BROADHURST, 1960). O teste de campo aberto é considerado como um indicador do estado emocional do animal (ARCHER, 1973; BERNARDI e PALERMO-NETO, 1980) e é comumente utilizado para triagem farmacológica de drogas que atuam sobre o sistema nervoso central (EIDMAN *et al.*, 1990).

Assim, no experimento 1, estudou-se a atividade geral dos ratos tratados com 0,1; 1,0 mg/Kg e 10,0 mg/Kg de fipronil ou 1 mL/kg de água destilada observados em um campo aberto. Dentre os parâmetros avaliados, verificou-se apenas redução significativa do número de levantamentos nos animais tratados com 10,0 mg/Kg de fipronil, quando comparados com os ratos do grupo controle, um hora após a última administração. Este achado sugere uma redução da atividade exploratória vertical em ratos tratados com fipronil.

BERNARDI e PALERMO-NETO (1980) já haviam relatado que 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. Contudo, no presente trabalho, deve ser salientado que não foram observadas diferenças significantes entre os grupos quando os animais foram observados 24 e 48 horas e, também, 7 dias após a última administração de fipronil, indicando que o fipronil nas doses aqui testadas não produz alterações relevante no comportamento de ratos observados no campo aberto e nem interfere no processo de habituação ao campo aberto quando expostos repetitivamente a esse aparelho.

O LCE, proposto inicialmente como modelo para avaliar a ação de drogas ansiolíticas em ratos (FILE; HYDE, 1979), foi baseado na aversão natural de roedores a espaços abertos e altos (GAALLEN e STECKLER, 2000). 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).

No LCE, observou-se diminuição da distância percorrida nos braços abertos e aumento do tempo de permanência nos braços fechados em animais tratados com 1,0 e 10,0 mg/Kg de fipronil em relação aos animais do grupo controle; ainda verificou-se a redução no tempo de permanência nos braços abertos em ratos tratados com 1,0 e 10,0 mg/Kg de fipronil em relação aos animais do grupo controle. Estes dados sugerem um efeito ansiogênico do

fipronil, fato esse corroborado pela ausência de efeitos relevantes no campo aberto que indicasse comprometimento motor.

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 e 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. Este fármaco parece interferir nos mecanismos GABAérgicos reduzindo seus efeitos inibitórios, além de possuir ação excitatória direta sobre os neurônios (OLSEN, 1982; FRANZ, 1985).

Na avaliação da dose convulsivante mínima, houve uma diminuição significativa na dose de picrotoxina e de pentilenotetrazol necessária para a indução da convulsão em animais tratados com 10,0 mg/Kg de fipronil, quando comparado com os animais dos grupos controles. Esses achados mostram que o fipronil reduziu o limiar de convulsão induzido tanto pela picrotoxina, como pelo pentilenotetrazol, reforçando a ação do fipronil no sistema nervoso central e o envolvimento de diferentes sistemas de neurotransmissão.

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, 2006).

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

Entre os neurotransmissores presentes no SNC, a norepinefrina 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 (BLOOM, 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.

Considerando a dopamina, esta foi inicialmente tida apenas como um precursor da norepinefrina. No entanto, ensaios feitos em diferentes estruturas do SNC demonstraram que a distribuição da dopamina e da norepinefrina é significativamente diferente. Na realidade, mais da metade da quantidade de catecolaminas presentes no cérebro corresponde a dopamina, sendo que níveis extremamente altos são encontrados nos núcleos da base (especialmente no núcleo caudado), núcleo acumbente, tubérculo olfatório, núcleo central da amígdala, eminência mediana, áreas bem delimitadas do

córtex frontal e encontrada em quantidades mais abundantes no *striatum*. (BLOOM, 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, o derivado metóxi do DOPAC) (RANG et al., 2003).

No presente experimento, considerando os níveis de dopamina em córtex frontal cerebral observou-se aumento significativo em animais tratados com 10,0 mg/Kg de fipronil, em relação aos controles; não foram encontradas alterações estatisticamente significantes desse neurotransmissor no *striatum* nem no hipotálamo dos animais. Quanto aos seus metabólitos (DOPAC e HVA) e também o *turnover* de dopamina, não foram observadas alterações estatisticamente significantes em nenhuma das áreas do cérebro avaliadas.

A serotonina 5HT 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, 2003).

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 frequentemente 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 (RANG et al., 2003).

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

A administração prolongada do fipronil em ratos provocou um aumento estatisticamente significativo nos níveis de 5HT no córtex frontal cerebral em animais tratados na dose de 1,0 mg/Kg p.c. quando comparados com os controles. Para o metabólito 5HIAA, observou-se redução de seus níveis no córtex frontal cerebral de ratos tratados com 0,1 e 1,0 mg/Kg quando comparado com os controles. No *striatum* houve diminuição estatisticamente significativa dos seus níveis em animais tratados com 0,1 e 1,0 mg/Kg. em relação aos controles.

Considerando a taxa de renovação da 5HT (*turnover*) no córtex frontal, houve uma diminuição nos animais tratados com 1,0 mg/Kg p.c. quando comparados com os controles. Em relação ao *striatum*, houve aumento estatisticamente significativo da taxa de renovação de serotonina para os animais tratados com 0,1 e 1,0 mg/Kg p.c. de fipronil. No hipotálamo não foram observadas alterações estatisticamente significantes para esse metabólito.

Em relação aos níveis do neurotransmissor GABA, observou-se redução apenas no *striatum* em animais tratados com 1,0 mg/Kg p.c. de fipronil quando

comparado com àqueles do grupo controle, sugerindo a participação do sistema GABAérgico nos efeitos centrais do fipronil.

Considerando a avaliação dos níveis dos diferentes neurotransmissores e respectivos metabólitos no SNC de ratos, pode-se sugerir que os efeitos comportamentais do fipronil encontrados no presente trabalho, isto é, no LCE e nas DCM de picrotoxina e pentilenotetrazol, podem ser atribuídos, ao menos em parte, a sua atuação principalmente nos sistemas de neurotransmissão que envolvem a dopamina, a serotonina e o GABA do córtex e *striatum*.

Sabe-se que o fipronil em mamíferos é exaustivamente biotransformado no fígado, via citocromo CYP3A4, em um composto fipronil sulfona que apresenta elevada toxicidade e o mesmo ainda sofre intensa re-circulação êntero-hepática, possui elevado tempo de meia-vida, tornando-se assim, um fator de acréscimo de sua toxicidade (DAS et al., 2006; MOHAMED et al., 2006). De fato, estudos realizados nos laboratórios de DAS et al. (2006) mostraram que o fipronil e seu produto de biotransformação, o fipronil sulfona, são significativamente mais tóxicos aos hepatócitos entre várias classes de praguicidas examinados.

No presente trabalho, o fipronil provocou aumento nos pesos absoluto e relativo de fígados de ratos tratados com 10,0 mg/Kg, quando comparados com controles. Os achados histológicos mostraram tumefação celular dos hepatócitos com ou sem zoneamento seguindo um padrão de dose-resposta, no qual a menor dose (0,1 mg/Kg p.c.) apresentou essa alteração de forma discreta, na dose intermediária (1,0 mg/Kg p.c.), de forma moderada e severa na maior dose (10,0 mg/Kg p.c.). A tumefação celular observada em

hepatócitos pode ser resultante de edema celular, ou seja, de acúmulo de água no citoplasma (MYERS; MCGAVIN, 2007).

A tumefação é um achado comum em doenças hepáticas como a hepatite (SAMINATHAN *et al.*, 2006), principalmente as virais agudas, podendo acompanhar-se de destrabeculação e necrose dos hepatócitos. As células tumefatas, normalmente, apresentam uma descoloração do citoplasma, sendo que a perda da afinidade tintorial é devida provavelmente a alterações na conformação das proteínas que compõem as citoceratinas (FILHO, 2006).

Portanto, os achados anatomopatológicos aqui observados no fígado de ratos expostos prolongadamente ao fipronil podem indicar a hepatotoxicidade causada não só do próprio fipronil, como também de seu metabólito.

6 - Conclusões

- ✓ O fipronil não alterou a atividade geral de ratos tratados por 28 dias com 0,1; 1,0 e 10,0 mg/Kg, nem o perfil de habituação a esse aparelho;
- ✓ No LCE, a exposição prolongada de ratos ao fipronil nas doses de 1,0 e 10,0 mg/Kg provocou redução tanto da distância percorrida como o tempo de permanência dos animais nos braços abertos, além de aumentar o tempo de permanência nos braços fechados, indicando um perfil de droga ansiogênica;
- ✓ O limiar das convulsões induzidas quimicamente pela picrotoxina e pelo pentilenotetrazol foi reduzido em animais tratados com 10,0 mg/Kg de fipronil;

Os efeitos comportamentais da exposição prolongada ao fipronil podem ser atribuídos, ao menos em parte, a sua atuação em sistemas centrais de neurotransmissão dopaminérgica, serotoninérgica e GABAérgica do córtex e do *striatum*;
- ✓ A exposição prolongada ao fipronil pode causar hepatotoxicidade, caracterizada por aumento dos pesos absoluto e relativo do fígado e tumefação celular de hepatócitos.

7- Referências bibliográficas

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

ANDREI, E. **Compêndio de Defensivos Agrícolas. Guia Prático de Produtos Fitossanitários para Uso Agrícola**, 6ª ed. SP, 1999.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografia F 43 [S.l.], 2006. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/f43_fipronil.pdf>.
Acesso em 03/ago/2006.

BALDESSARINI, R.J. Drugs and the treatment of psychiatric disorders: psychosis and anxiety. In: J.G. Hardman, L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon and A.G. Gilman (eds), **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 6 ed. McGraw-Hill, New York, 1996. cap 17, p. 399-430.

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

BLOOM, F.E. Neurotransmissão e sistema nervoso central. In: **Goodman e Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**, 11 ed. McGraw-Hill, New York, 2006. cap 12, p. 283-303.

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.

CONNELLY, P. **Environmental fate of Fipronil**. Sacramento: California Environmental Protection Agency, Department of Pesticide Regulation, Environmental Monitoring Branch, 2001. 17p. Disponível em: <http://www.pw.ucr.edu/textfiles/fipronil.pdf>. Acesso em: 23 ago 2008.

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. 228-36, 2005.

EIDMAN, D.S.; BENEDITO, M.A.C.; LEITE, J.R. Daily cRANGes 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, p. 422-430. 2002.

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.

FILHO, G.B. **Bogliolo Patologia**, 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1488p.

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. 135p.

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.902–9, 2003.

GUPTA, R.C. Veterinary toxicology. Hopkinsville, USA: Elsevier, 2007. 1159p. Disponível em http://www.amazon.com/gp/reader/0123704677/ref=sib_dp_ptu#. Acesso em 15 jul 2008.

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.120-6, 2005.

HAINZL, D.; CASIDA, J.E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.93, n.23, 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, 54-74, 1984.

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.

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.

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, 2007.

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, 2006.

MYERS, R. K.; MCGAVIN, M. D. Cellular and tissue responses to injury. In: ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. **Pathologic basis of veterinary disease**. 4. ed. StLouis: Mosby Elsevier, 2007. 3-62 p.

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

OECD. ORGANISATION ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline 424**. Disponível em: <http://browse.oecdbookshop.org/oecd/pdfs/browseit/9742401e.pdf>. Acesso em 16 out 2007.

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.245-77, 1982.

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, 2003. 904p.

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.119-33, 2005.

SANDERS-BUSH, E. MAYER, S.E. Agonistas e antagonistas dos receptores de 5-hidroxitriptamina (serotonina) In: **Goodman e Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**, 11 ed. McGraw-Hill, New York, 2006. cap 11, p. 265-282.

SANDOVAL, M.R.L.; PALERMO-NETO, J. Do ácido gamaaminobutírico (GABA) e das convulsões. **Ciência e Cultura**, v.37, p.1142-6, 1985.

SAMINATHAN, R.; BABUJI, S.; SETHUPATHY, S.; VISWANATHAN, P.; BALASUBRAMANIAN, T.; GOPALAKRISHNANAKONE, P. Clinic-toxinological characterization of the acute effects of the venom of the marine snail, *Conus lorioisii*. **Acta Tropica**, v. 97, p. 75-87, 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.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA A SAÚDE ANIMAL. **Compêndio de produtos veterinários - SINDAN**. Disponível em: <<http://www.cpvvs.com.br/cpvvs/pesquisa.aspx>> Acesso em 20 ago 2008.

STARK, D.J.; VARGAS, I.R. Toxicity and hazard assessment of fipronil to *Daphnia pulex*. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 62, n.1, p. 11-16, 2005.

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.

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.

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**, p. 1-15, jan. 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.