



## Avaliação neurocomportamental e níveis de acetilcolinesterase cerebral em ratos expostos subcronicamente ao fipronil

[*Neurobehavioral assessment and brain acetylcholinesterase levels in rats subchronically exposed to fipronil*]

M.L.M. Barretto<sup>1</sup>, D.F. Horta<sup>2</sup>, F. Anselmo<sup>2</sup>, A.F. Godinho<sup>3</sup>, A.A.F. Oliveira<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Aluna de pós-graduação - Universidade Federal Rural de Pernambuco - Recife, PE

<sup>2</sup>Aluno de pós-graduação - Instituto de Biociências de Botucatu - Universidade Estadual Paulista - Botucatu, SP

<sup>3</sup>Instituto de Biociências de Botucatu - Universidade Estadual Paulista - Botucatu, SP

<sup>4</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco - Recife, PE

### RESUMO

O fipronil é um inseticida de toxicidade seletiva amplamente empregado na agricultura e na medicina veterinária. Porém, há relatos de efeitos neurotóxicos dessa substância, que geram prejuízos para vertebrados. Avaliou-se a atividade locomotora, a coordenação motora e a atividade da enzima acetilcolinesterase cerebral em ratos expostos ao fipronil. Ratos Wistar machos adultos (n=15) receberam fipronil em dose de 30mg/kg, por via oral, durante 15 dias; o grupo controle (n=15) foi tratado com solução fisiológica, por via oral, no mesmo período. No 16º dia de experimentação, os animais foram submetidos aos testes de arena de campo aberto e *hole board*. No 17º dia, foram anestesiados e eutanasiados, procedendo-se à coleta de órgãos, e posteriormente foi feita a avaliação da AChE cerebral. A exposição ao fipronil não provocou alterações significativas sobre a coordenação motora e a atividade locomotora, porém gerou inibição significativa da atividade da acetilcolinesterase cerebral. Esses achados sugerem que o fipronil pode provocar efeitos neurotóxicos em curto prazo, os quais podem ser exacerbados caso a exposição seja prolongada.

Palavras-chave: pesticidas, fenilpirazóis, neurotoxicidade, arena de campo aberto, *hole board*

### ABSTRACT

*Fipronil is a selective-toxicity insecticide widely used in agriculture and veterinary medicine. However, there are reports of neurotoxic effects of this substance, causing damages to vertebrates. We evaluated the locomotor activity, motor coordination and the activity of brain acetylcholinesterase in rats exposed to fipronil. Adult male Wistar rats (n= 15) received fipronil at a dose of 30mg/kg orally for 15 days; the Control group (n= 15) was treated with oral solution in the same period. On the 16th day of experimentation, the animals were submitted to the open field arena test and hole-board test. On the 17th day, they were anesthetized and euthanized, and organs were collected, and subsequently brain AChE was evaluated. Exposure to fipronil yielded no significant changes on motor coordination and locomotor activity but caused significant inhibition of brain acetylcholinesterase activity. These findings suggest that fipronil may cause short-term neurotoxic effects, which may be exacerbated if exposure is prolonged.*

Keywords: pesticides, phenylpyralozes, neurotoxicity, open field test, hole-board test

### INTRODUÇÃO

O fipronil, ou 5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-4-(trifluorometilsulfinil)pirazol-3-carbonitrila, de fórmula molecular C<sub>12</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>6</sub>N<sub>4</sub>OS (NCBI, 2016), é uma

substância pertencente ao grupo dos fenilpirazóis, classificada como praguicida de classe II, de toxicidade moderada (The WHO, 2010). Em invertebrados, assim como outros fenilpirazóis, o fipronil atua como antagonista dos canais de cloreto controlados por GABA, e o bloqueio dos canais iônicos controlados por esse neurotransmissor gera hiperexcitação do sistema

Recebido em 16 de abril de 2018

Aceito em 4 de abril de 2019

Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: andreafo@hotmail.com

nervoso central, caracterizada por convulsões e até morte (Bloomquist, 1993). Além da seletividade demonstrada pelos canais iônicos de cloreto controlados por GABA de insetos, o fipronil ainda atua bloqueando os canais de cloreto ligados ao glutamato (GluCl), encontrados unicamente em invertebrados. Por tais motivos, o fipronil é amplamente citado como seguro para uso em vertebrados devido a essa toxicidade seletiva (Narahashi *et al.*, 2010).

Entretanto, em ratos expostos de maneira aguda ao fipronil por via tópica, relataram-se alterações emocionais e comportamento exploratório significativamente maior nesses animais quando comparados aos do grupo controle, sugerindo que o fipronil, embora relatado como um praguicida seletivo para invertebrados, é passível de gerar alterações no sistema nervoso central de vertebrados (Terçariol e Godinho, 2011). Em ratos subcronicamente expostos ao fipronil por via oral, foram observadas alterações pressóricas, justificadas pela diminuição do nível de óxido nítrico e pelo aumento de endotelina-1, além de redução da capacidade antioxidante e do nível de metaloproteínase da matriz 2 (Chaguri *et al.*, 2016).

Objetivou-se avaliar experimentalmente os efeitos da exposição ao fipronil por via oral sobre a atividade locomotora, a coordenação motora e a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) cerebral em ratos machos adultos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram autorizados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Ceua) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* de Botucatu (protocolo 620/2016). Foram utilizados 30 ratos Wistar machos, adultos, obtidos da colônia do Biotério Central da Unesp de Botucatu. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno, de dimensões 41x34x16cm, e transferidos para o Biotério do Ceatox de Botucatu previamente à fase experimental para aclimação, em temperatura de 22°C, ciclo claro/escuro a cada 12 horas, sob exaustão contínua. A higienização era realizada três vezes por semana, com fornecimento de água e ração peletizada (Purina Presence®) *ad libitum*. Os animais foram pesados a cada dois dias durante o período de exposição,

para efeito de cálculo do volume da droga a ser administrada.

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, tratados durante 15 dias: controle (n=15): administração de solução fisiológica (0,2mL/animal) via gavagem; fipronil (n=15): administração de fipronil em dose de 30mg/kg via gavagem, na apresentação em pó (Regent® 800WG, BASF, Brasil), em concentração de 80%, diluído em água destilada. A dose utilizada foi escolhida baseando-se em trabalho prévio desenvolvido pelo Laboratório de Pesquisas Neurocomportamentais – LAPEN (Chaguri *et al.*, 2016) e levando em consideração a DL<sub>50</sub> do fipronil para ratos, além dos valores de NOEL, LOEL, NOAEL e LOAEL (Dobozzy, 2000; Udo *et al.*, 2014; Silva e Koshlukova, 2015). A manipulação dos animais ocorreu sempre no mesmo horário do dia, para evitar alterações do ciclo circadiano.

No 16º dia de experimentação, os animais foram submetidos aos testes comportamentais da arena de campo aberto (ACA) e *hole board* (HB) para avaliação da atividade locomotora e da coordenação motora, respectivamente. O teste da ACA seguiu a metodologia previamente descrita por Trombini *et al.* (2001), a qual consiste em posicionar o animal no centro de um equipamento circular de madeira, de 97cm de diâmetro por 32,5cm de altura, dividido em 18 espaços, e avaliar seu comportamento durante três minutos. Foram avaliados os parâmetros de: tempo de latência para atravessar o centro, número de cruzamentos no centro, número de quadrados percorridos, número de levantamentos, tempos de limpeza total, rostral e corporal e tempo de congelamento.

O teste de HB seguiu metodologia previamente descrita, com adaptações (Meyer e Caston, 2005). A avaliação consiste em posicionar o animal no centro de uma caixa de madeira, de dimensões iguais a 30cm de altura, 54cm de largura e 57cm de comprimento, com 81 perfurações medindo 2cm de diâmetro e 1cm de profundidade cada, em uma disposição nove por nove, durante cinco minutos. Foram avaliados o número de inserções de cabeça e o número de inserções de pata. Após a passagem de cada animal, os equipamentos foram higienizados com álcool etílico 5% para eliminar traços do animal precedente antes da avaliação de um novo

animal. Os testes foram videomonitorados, e as gravações avaliadas posteriormente com auxílio de cronômetro digital.

No 17º dia de experimentação, os animais foram anestesiados utilizando-se uma solução 1:1 de cloridrato de quetamina 10% (Dopalen® Ceva, Brasil) e cloridrato de xilazina 2% (Anasedan® Ceva, Brasil). Após a perda dos reflexos pupilar e de nocicepção, a eutanásia foi realizada por meio de punção sanguínea intracardíaca. Foram coletados cérebro, coração, fígado, testículos, rins e baço para cálculo do peso do órgão em relação ao peso corporal. Os cérebros foram armazenados em solução de tampão fosfato salino e, em seguida, coletou-se um fragmento de 100 miligramas do córtex pré-frontal; estes fragmentos foram acondicionados em tubos de polipropileno devidamente identificados e mantidos em *freezer* a -80°C, até o momento da análise da AChE cerebral.

A dosagem da AChE cerebral foi realizada por meio da utilização de *kit* específico (Colinesterase ref.: K094, Bioclin®, Brasil), cuja reação baseia-se na descrição de Ellman *et al.* (1961). A atividade da enzima foi quantificada de acordo com o decréscimo da absorbância da coloração amarela produzida pela tiocolina: a butiriltiocolina foi catalisada pela acetilcolinesterase em tiocolina e butirato, de onde a tiocolina reduziu o hexacianoferrato III, de coloração amarela, em hexacianoferrato II, incolor. Quanto maior a atividade enzimática, mais rapidamente a solução tende a se tornar incolor. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 405nm, após um, dois e três minutos de reação. O decaimento da reação foi calculado por meio da diferença da absorbância final e inicial ( $\Delta A/\text{min}$ ) e posterior multiplicação por um fator de correção, resultando na atividade enzimática em U/L.

Todos os dados obtidos, exceto o tempo de congelamento, seguiram distribuição normal segundo o teste de normalidade de Kolmogorov-Sminorv. Dessa forma, os resultados foram comparados por meio do teste t não pareado bicaudal, considerando-se um intervalo de significância de 95% ( $P<0,05$ ); para o tempo de congelamento, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, considerando-se um intervalo de significância de 95% ( $P<0,05$ )

(Snedecor e Cochram, 1991). Ainda para esse parâmetro, foi calculado o valor *d* de Cohen para análise do tamanho do efeito do tratamento, e este foi comparado aos limites para interpretação de tamanho de efeito estabelecidos por Ellis (2009). Foram utilizados os programas Graph Pad® InStat Software e Microsoft® Excel 2007, para as análises estatísticas, e Graph Pad® Prism 5, para a construção dos gráficos.

## RESULTADOS

Durante o período de exposição, não ocorreu mortalidade dos animais pelo tratamento com o fipronil 30mg/kg, por via oral. Por meio da relação dos pesos dos órgãos e do peso corporal, observou-se uma redução significativa ( $P<0,05$ ) do peso do fígado dos animais do grupo fipronil em relação ao peso corporal. Os demais órgãos analisados não demonstraram alterações significativas quanto a esse parâmetro (Fig. 1).

Os animais do grupo fipronil não demonstraram alterações significativas ( $P<0,05$ ) dos parâmetros avaliados em relação aos do grupo controle no teste da arena de campo aberto. A atividade locomotora, avaliada por meio do número de quadrados percorridos, não demonstrou alteração significativa no grupo fipronil em relação ao grupo controle. Entretanto, o tempo de congelamento é quase duplicado no grupo fipronil, embora não seja estatisticamente significativo ( $P=0,23$ ) (Fig. 2). Observado isso, obteve-se um valor *d* de Cohen igual a 0,59, considerando-se, então, um tamanho de efeito médio do tratamento em relação ao grupo controle.

Os animais do grupo fipronil não demonstraram alterações significativas dos parâmetros avaliados em relação ao grupo controle ( $P<0,05$ ) no teste de *hole board*. A coordenação motora, avaliada por meio do número de inserções de pata, não demonstrou alteração significativa do grupo fipronil em relação ao grupo controle, assim como a atividade exploratória, avaliada por meio do número de inserções de cabeça, também não foi alterada pelo tratamento (Fig. 3). Na avaliação da atividade da enzima AChE cerebral (Fig. 4), observou-se redução significativa de aproximadamente 28,3% da atividade enzimática nos animais do grupo fipronil em relação ao grupo controle ( $P<0,05$ ).

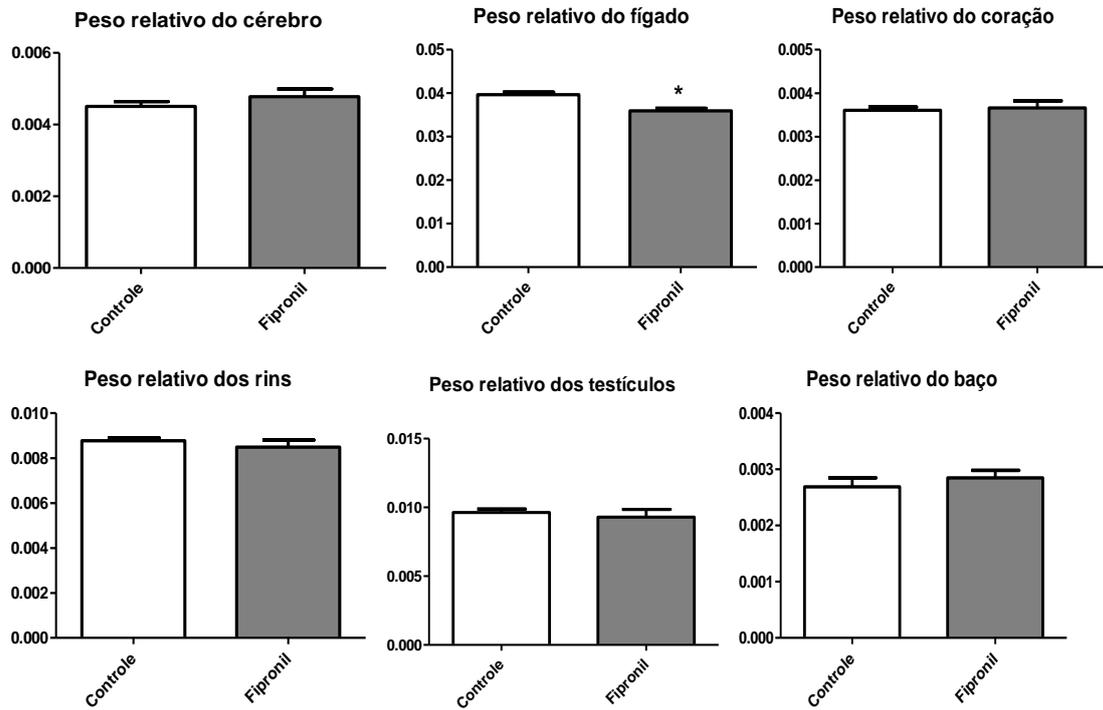
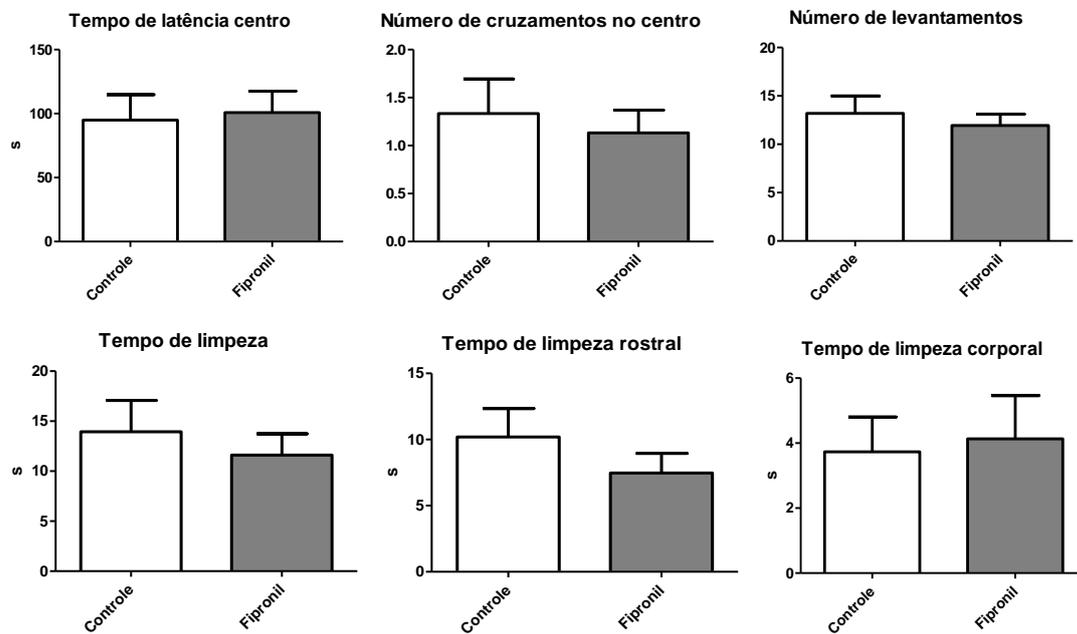


Figura 1. Peso médio do cérebro, do fígado, do coração, dos rins, dos testículos e do baço (g) em relação ao peso corporal médio (g) de ratos machos adultos expostos ao fipronil (30mg/kg, via oral) por 15 dias, segundo o teste t não pareado bicaudal, representado pela média  $\pm$  erro-padrão da média. (\* $P < 0,05$ )



### Avaliação neurocomportamental...

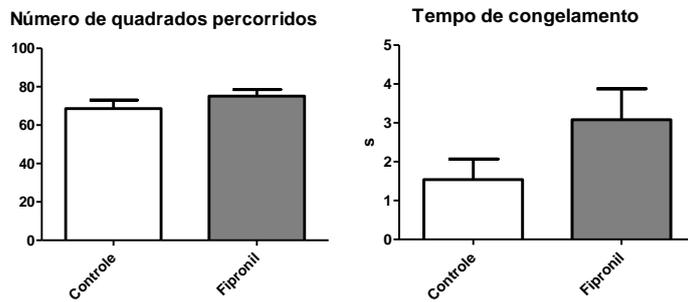


Figura 2. Avaliação comportamental pelo teste da ACA de ratos machos adultos expostos ao fipronil (30mg/kg, via oral) por 15 dias, segundo os testes t não pareado bicaudal e Mann-Whitney (apenas para o tempo de congelamento), representados pela média  $\pm$  erro-padrão da média.

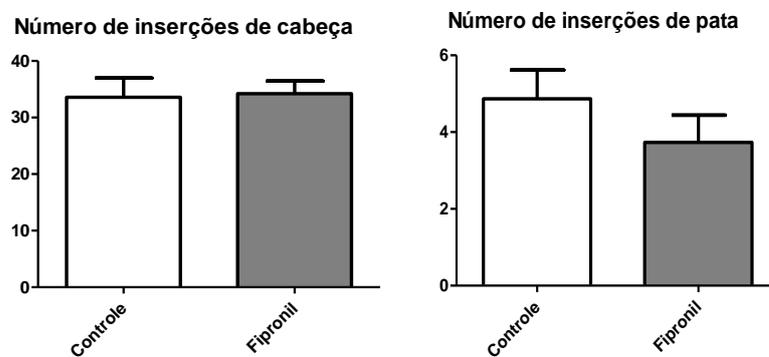


Figura 3. Avaliação comportamental pelo teste do HB de ratos machos adultos expostos ao fipronil (30mg/kg, via oral) por 15 dias, segundo o teste t não pareado bicaudal, representado pela média  $\pm$  erro-padrão da média.

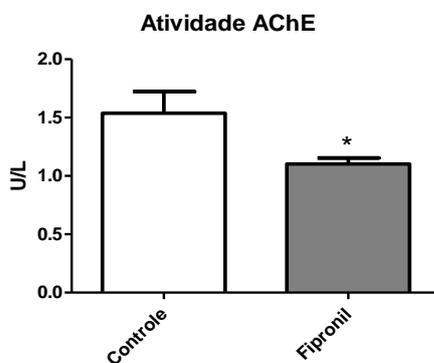


Figura 4. Atividade da enzima AChE cerebral em U/L de ratos machos adultos expostos ao fipronil (30mg/kg, via oral) por 15 dias, segundo o teste t não pareado bicaudal, representado pela média  $\pm$  erro-padrão da média. (\* $P < 0,05$ )

### DISCUSSÃO

Os resultados obtidos por meio deste estudo demonstram que a exposição ao fipronil na dose de 30mg/kg, por via oral, determina, em curto prazo, alterações bioquímicas em sistema nervoso central relativas à atividade da enzima acetilcolinesterase. Porém, não há interferência na atividade locomotora e na coordenação

motora de ratos machos adultos. A diminuição do peso do fígado em relação ao peso corpóreo observada no grupo fipronil pode estar relacionada a uma possível hepatotoxicidade desse praguicida em curto prazo. Relata-se que a exposição de mitocôndrias isoladas de fígado de rato ao fipronil inibe a síntese de ATP e gera efluxo de cálcio mitocondrial, sendo os metabólitos desulfinil e sulfona ainda mais

potentes que o próprio fipronil nesses aspectos (Tavares *et al.*, 2015).

Os níveis de diversos biomarcadores foram avaliados após a administração única de altas doses (25 e 50mg/kg) e baixas doses (5 e 10mg/kg) de fipronil em ratos; esses biomarcadores também foram avaliados após exposição repetida a baixas doses (5 e 10mg/kg) de fipronil, durante 14 dias. Não foram observadas alterações significativas em relação às enzimas hepáticas, tais como aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), sorbitol desidrogenase (SDH) e lactato desidrogenase (LDH) em todos os tratamentos. Porém, todos os tipos de tratamento instaurados geraram alterações significativas sobre os níveis de biomarcadores celulares, entre citocinas, interleucinas, fatores de crescimento e hormônios (Moser *et al.*, 2015). Também não foram detectadas alterações significativas nos níveis de ALT, AST, fosfatase alcalina (FA) e gama glutamiltransferase (GGT) em ratos expostos repetidamente ao fipronil, em dose de 30mg/kg, por 15 dias (Chaguri *et al.*, 2016).

Porém, em exposições prolongadas ao fipronil, a hepatotoxicidade desse composto é exacerbada. Kartheek e David (2018) avaliaram as alterações hepáticas em ratos, decorrentes da administração do fipronil, por 90 dias, em doses baixas (6,46mg/kg), médias (12,12mg/kg) e altas (32,33mg/kg). Esses autores observaram alterações significativas nos níveis de catalase e glutatona S-transferase e elevação do malondialdeído hepático nos animais expostos às doses médias e altas, além de alterações na atividade da superóxido dismutase e glutatona peroxidase, elevação dos níveis de AST, ALT e FA e alterações histológicas marcantes nos animais expostos às três doses.

No teste da ACA, não foram observadas mudanças significativas nos parâmetros avaliados. É possível que a dose utilizada no estudo não seja alta o suficiente para gerar redução ou aumento da atividade locomotora. Embora não exista significância estatística, é possível observar uma tendência biológica de aumento do tempo de congelamento do grupo fipronil em relação ao grupo controle, visto que existe cerca de 50% de diferença entre a média do grupo fipronil em relação ao controle e um

tamanho de efeito médio. Esse efeito pode estar relacionado à emocionalidade e ao medo (Archer, 1973; Cruz e Landeira-Fernandez, 2012). Em ratos expostos a uma dose única de fipronil, por via tópica, nas doses de 70, 140 e 280mg/kg, observou-se que animais expostos à dose de 140mg/kg apresentaram maior número de levantamentos em relação ao grupo controle, e a dose de 280mg/kg aumentou significativamente o número de levantamentos, o tempo de congelamento e o tempo de limpeza, parâmetros ligados aos prováveis efeitos ansiogênicos do fipronil. Entretanto, não foram detectadas diferenças significativas quanto à atividade locomotora em todas as doses trabalhadas (Terçariol e Godinho, 2011).

Em um estudo prévio, foi calculada uma relação entre os tempos de locomoção e de congelamento de ratos expostos a uma dose única de 100mg/kg de fipronil, por via oral, um dia antes da exposição e no primeiro, segundo e sétimo dias após a exposição. O grupo controle apresentou uma alta relação no início do experimento, e essa foi decrescendo com o passar do tempo, pelo reconhecimento da ACA; entretanto, no último dia, a relação locomoção:congelamento do grupo controle apresentou valores similares aos iniciais, enquanto o grupo exposto ao fipronil manteve a relação quase constante durante todo o tempo de experimento, demonstrando que é possível que a droga não interfira nos mecanismos de atividade locomotora, porém gera efeitos sobre a memória (Szegedi *et al.*, 2005).

No teste do HB, não foram detectadas alterações significativas nos valores de inserção de cabeça e de pata no grupo fipronil em relação ao controle. A coordenação motora é avaliada por meio do número de inserções de pata nas perfurações do equipamento; se esse valor é aumentado, percebe-se que o tratamento é passível de gerar perturbações centrais de equilíbrio e periféricas de estimulação muscular, visto que o animal seria menos capaz de se desviar das perfurações enquanto explora o equipamento. O comportamento exploratório dos animais expostos também não foi comprometido pelo tratamento, uma vez que tanto o número de inserções de cabeça no HB quanto o número de quadrados percorridos na ACA não apresentaram alterações significativas. Esses parâmetros se complementam, mas são independentes, pois, se

o número de quadrados percorridos pelos animais expostos foi reduzido, seria de se esperar que o número de inserções de cabeça também se reduza devido à redução da atividade locomotora do animal. É proposto que a deambulação e o número de inserções de cabeça podem ser separados em dois parâmetros comportamentais distintos, sendo influenciados por diferentes regiões cerebrais (Abel, 1995).

Montanha *et al.* (2018) observaram um aumento significativo do número de inserções de pata na prole jovem de ratas expostas continuamente ao fipronil durante o período lactacional; porém, na fase adulta, esses animais não apresentaram alterações significativas desse parâmetro. Esse achado foi concomitante à presença do metabólito sulfona apenas na prole jovem, demonstrando a influência dos metabólitos ativos do fipronil sobre a coordenação motora.

Mais uma vez, é possível que tanto a dose quanto a via de administração do fipronil neste estudo não tenham sido suficientes para gerar esses tipos de alterações, embora tenham sido reportados outros tipos de alterações bioquímicas e comportamentais em animais expostos a doses iguais ou até menores que a adotada (Chaguri *et al.*, 2016; Moser *et al.*, 2015; Godinho *et al.*, 2016).

A atividade da enzima AChE cerebral foi inibida significativamente pela exposição ao fipronil em relação ao grupo controle. Relatos anteriores demonstram que o fipronil interfere diretamente na regulação dessa enzima: em peixes da espécie *Cyprinus carpio* expostos subcronicamente ao fipronil, foi detectada uma redução de 47% da atividade da AChE cerebral (Gupta *et al.*, 2014). Em trabalhadores rurais expostos a diversos praguicidas, incluindo o fipronil, verificou-se uma inibição significativa da atividade da AChE plasmática (Murussi *et al.*, 2014). Na prole de ratas expostas ao fipronil durante o período lactacional, detectou-se um aumento exacerbado da atividade da AChE plasmática, associada a alterações de memória e a alterações histopatológicas no cérebro da prole (Montanha *et al.*, 2016). Detectou-se também que ocorre alteração de memória pela exposição ao fipronil e que essa ação neurotóxica parece se dar pela ação desse praguicida sobre os receptores GABA<sub>A</sub>, já que a picrotoxina, um antagonista desses receptores, intensifica esse efeito do

fipronil (Godinho *et al.*, 2016). Porém, em búfalos expostos subcronicamente ao fipronil, na dose de 0,5mg/kg/dia, por 98 dias, não foram observadas alterações no nível de atividade da AChE plasmática (Gill e Dumka, 2013).

Esse achado pode indicar que a exposição repetida ao fipronil poderia gerar uma hiperestimulação colinérgica no sistema nervoso central. Entre os sinais clínicos que podem advir de uma inibição da AChE em sistema nervoso central e conseqüente bloqueio da função gabaérgica, relatam-se efeitos excitatórios, como vertigens, ansiedade, inquietação, dores de cabeça, tremores, confusão mental, insônia, irritabilidade, redução da concentração, depressão respiratória e convulsões em humanos (Sidell, 1994). Além disso, torna-se necessário investigar se o tipo de inibição enzimática pela exposição ao fipronil ocorre de maneira reversível ou irreversível.

## CONCLUSÃO

A exposição ao fipronil na dose de 30mg/kg, por 15 dias, não gerou alterações significativas sobre a atividade locomotora e a coordenação motora de ratos machos adultos em curto prazo. Porém, nessa dose e período de exposição, o praguicida é capaz de inibir a atividade da enzima AChE cerebral.

## REFERÊNCIAS

- ABEL, E.L. Further evidence for the dissociation of locomotor activity and head dipping in rats. *Physiol. Behav.*, v.57, p.529-532, 1995.
- ARCHER, J., Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim. Behav.*, v.21, p.205-235, 1973.
- BLOOMQUIST, J.R. Toxicology, mode of action and target site-mediated resistance to insecticides acting on chloride channels. *Comp. Biochem. Physiol. C*, v.106C, p.301-314, 1993.
- CHAGURI, J.L.; GODINHO, A.F.; HORTA, D.F. *et al.* Exposure to fipronil elevates systolic blood pressure and disturbs related biomarkers in plasma of rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v.42, p.63-68, 2016.
- CRUZ, A.P.M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. In: LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; FUKUSHIMA, S. (Orgs.). *Métodos em neurociência*. São Paulo: Manole, p.192-217, 2012.

- DOBOZY, V.A. Pesticide residues in food: Fipronil (Addendum). Washington: Environmental Protection Agency, 2000. Available in: <<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v00pr07.htm>> Accessed in: 24 Oct. 2016.
- ELLIS, P.D. Thresholds for interpreting effect sizes. 2009. Available in: <[http://www.polyu.edu.hk/mm/sizeeffectsizefaq/thresholds\\_for\\_interpreting\\_effect\\_sizes2.html](http://www.polyu.edu.hk/mm/sizeeffectsizefaq/thresholds_for_interpreting_effect_sizes2.html)> Accessed in: 27 Nov. 2018.
- ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, v.7, p.88-95, 1961.
- NCBI – National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Fipronil – CID=3352. 2016. Available in: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3352#section=Top>> Accessed in: 25 Aug. 2016.
- GILL, K.K.; DUMKA, V.K. Biochemical alterations induced by oral subchronic exposure to fipronil, fluoride and their combination in buffalo calves. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v.36, p.1113-1119, 2013.
- GODINHO, A.F.; CHAGAS, A.C.S.; CARVALHO, C.C. et al. Memory impairment due to fipronil pesticide exposure occurs at the GABAA receptor level, in rats. *Physiol. Behav.* v.165, p.28-34, 2016.
- GUPTA, S.K.; PAL, A.K.; SAHU, N.P. et al. Haemato-biochemical responses in *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) fry exposed to sub-lethal concentration of a phenylpyrazole insecticide, fipronil. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B - Biol. Sci.*, v.84, p.113-122, 2014.
- KARTHEEK, R.M.; DAVID, M. Assessment of fipronil toxicity on wistar rats: a hepatotoxic perspective. *Toxicol. Rep.*, v.5, p.448-456, 2018.
- MEYER, L.; CASTON, J. Repeated stress alters caffeine action on motor coordination in C57Bl6/J male mice. *Brain Res.*, v.1039, p.171-176, 2005.
- MONTANHA, F.P.; FARIA, C.A.; MACHADO, F.D. et al. Behavioral and laboratory abnormalities in rat offspring exposed to fipronil during the perinatal period. *Int. J. Adv. Vet. Sci. Tech.*, v.7, p.356-373, 2018.
- MONTANHA, F.P.; MACHADO, F.D.; FARIA, C.A. et al. Lactational exposure to fipronil pesticide in low dose impairs memory in rat offspring. *J. Neurol. Disord.*, v.4, p.1-7, 2016.
- MOSER, V.C.; STEWART, N.; FREEBORN, D.L. et al. Assessment of serum biomarkers in rats after exposure to pesticides of different chemical classes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.282, p.161-174, 2015.
- MURUSSI, C.; HORN, R.C.; SANTI, A. et al. Changes in oxidative markers, endogenous antioxidants and activity of the enzyme acetylcholinesterase in farmers exposed to agricultural pesticides - a pilot study. *Cienc. Rural*, v.44, p.1186-1193, 2014.
- NARAHASHI, T.; ZHAO, X.; IKEDA, T. et al. Glutamate-activated chloride channels: Unique fipronil targets present in insects but not in mammals. *Pestic. Biochem. Physiol.*, v.97, p.149-152, 2010.
- SIDELL, F.R. Clinical effects of organophosphorus cholinesterase inhibitors. *J. Appl. Toxicol.*, v.14, p.111-113, 1994.
- SILVA, M.H.; KOSHLUKOVA, S. comparative toxicity of endosulfan and fipronil insecticides: utilizing in vivo and in vitro data. *J. Med. Toxicol. Clin. Forensic Med.*, v.1, p.1-5, 2015.
- SNEDECOR, W.; COCHRAN, W.G. *Statistical methods*. 8.ed. Iowa: Wiley, 1991.
- SZEGEDI, V.; BÁRDOS, G.; DÉTÁRI, L., et al. Transient alterations in neuronal and behavioral activity following bensultap and fipronil treatment in rats. *Toxicology*, v.214, p.67-76, 2005.
- TAVARES, M.A.; PALMA, I.D.F.; MEDEIROS, H.C.D. et al. Comparative effects of fipronil and its metabolites sulfone and desulfinyl on the isolated rat liver mitochondria. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v.40, p.206-214, 2015.
- TERÇARIOL, P.R.G.; GODINHO, A.F. Behavioral effects of acute exposure to the insecticide fipronil. *Pestic. Biochem. Physiol.*, v.99, p.221-225, 2011.
- THE WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification: 2009, 2010. Geneva: WHO, 2010. Available in: <[http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides\\_hazard\\_2009.pdf](http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf)> Accessed in: 30 Mar. 2018.
- TROMBINI, T.V.; PEDROSO, C.G.; PONCE, D. et al. Developmental lead exposure in rats: Is a behavioral sequel extended at F2 generation? *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.68, p.743-751, 2001.
- UDO, M.S.B.; SANDINI, T.M.; REIS, T.M. et al. Prenatal exposure to a low fipronil dose disturbs maternal behavior and reflex development in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, v.45, p.27-33, 2014.