UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Avaliações toxicológicas das alterações genotóxicas e epigenéticas induzidas por Aroclor 1254 em testículo, espermatozóides, fígado e rim de camundongos

João Manuel Lopes Moreno

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Profª. Drª. Ana Paula de Melo Loureiro

São Paulo

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Avaliações toxicológicas das alterações genotóxicas e epigenéticas induzidas por Aroclor 1254 em testículo, espermatozóides, fígado e rim de camundongos

João Manuel Lopes Moreno

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Profª. Drª. Ana Paula de Melo Loureiro

São Paulo

2018

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

M843a

Moreno, João Manuel Lopes
Avaliações toxicológicas das alterações genotóxicas e epigenéticas induzidas por Aroclor 1254 em testículo, espermatozóides, fígado e rim de camundongos / João Manuel Lopes Moreno. - São Paulo, 2018.
139 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Loureiro, Ana Paula de Melo

1. Toxicologia ambiental. 2. Toxicologia reprodutiva . 3. Toxicologia experimental. I. T. II. Loureiro, Ana Paula de Melo , orientador.

João Manuel Lopes Moreno

Avaliações toxicológicas das alterações genotóxicas e epigenéticas induzidas por Aroclor 1254 em testículo, espermatozóides, fígado e rim de camundongos

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do Título de Mestre/DOUTOR

Profª. Drª. Ana Paula de Melo Loureiro

orientador/presidente

_____

1o. examinador

_____

2o. examinador

_____

3o. examinador

_____

4o. examinador

São Paulo, 08 de fevereiro de 2018.

Aos meus Pais Manuel e Herminia, pela confiança e motivação durante todo este percurso acadêmico.

APOIO FINANCEIRO

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

- Bolsa Doutorado
  - Edital **Nº** 042/2012.

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

UniCV – Universidade de Cabo Verde

AGRADECIMENTOS

Para que eu chegasse até aqui certas etapas tiveram que ser cumpridas antes e durante este trabalho; ensino e pesquisas anteriores, experiências com realidades e metodologias distintas e uma quantia de persistência, que me impulsionaram a seguir em frente. E nesse processo muitas pessoas, entre profissionais, amigos e parentes, tornou possível essa realização.

À Prof. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro, pela confiança, esforço e dedicação durante o processo desse trabalho, por me proporcionar o ambiente do seu laboratório para realização da minha pesquisa e por toda oportunidade de crescimento durante o processo de ensino e orientação.

Aos colegas do laboratório Mrtox, Everson, Matheus, Joseana, Geovana, Fabiane, com quem pude compartilhar dúvidas e achados, momentos de descontração e também de resolução de problemas no caminho dessa pesquisa, tornando-a mais prazerosa e menos sacrificantes em momentos difíceis. Aos antigos colegas do laboratório Mrtox, Anax, Tiago, Andre, Filipe e entre outros, com quem aprendi muito e desenvolvi novos conhecimentos e entendimentos de aspectos dessa pesquisa, sem o qual não seria possível maior aprofundamento.

Aos Professores de Pós-graduação em toxicologia e Análises Toxicológicas, Elizabeth, Ernani, Mauricio, Tania e sandra que me animaram bastante para que fosse corajoso nos desafios e investigações e não desanimasse em ser criativo mesmo que custasse um pouco mais de tempo, paciência e dedicação.

Aos Professores Paolo de Mascio e Marisa Medeiros do IQ USP, pela colaboração e disponibilidades de uso de equipamento LC-ESI-MS/MS. Aos professores e alunos do laboratório Silvya Stuck pela colaboração e uso de equipamentos. À Flávia Ong e Lìvia, do Biotério pelos ensinamentos de experimentação com animais.

Aos colegas dos laboratórios vizinhos Leonard, Saury, Gustavo e entre outros que souberam me auxiliar em situações cujo assunto tem maior dominância, sanando dúvidas e também oferecendo suportes técnicos.

Aos tantos amigos brasileiros, Mariana Zanetic, pessoal da pensão 1071, Tiago Eber, Tiago, Wesley, conterrâneos e de outros países que tive oportunidade de rever e conhecer, cuja amizade e conforto sempre proporcionaram força e estímulo para essa longa caminhada da pesquisa acadêmica.

Aos meus pais, irmãos e familiares em geral, pois sem eles nada disso seria possível, estes sempre me dão apoio, carinho e amparo mesmo à distância, pois reconhecem a importância dessa etapa de experiência profissional e crescimento pessoal.

À Ana e Guilherme pela motivação e confiança durante todo esse tempo de doutorado.

A todas essas pessoas, oportunidades, e tantas outras minhas sinceras gratidões!

"O conhecimento nos faz responsáveis".

(Che Guevara)

Resumo

Moreno, J. M. L. Avaliações toxicológicas das alterações genotóxicas e epigenéticas induzidas por Aroclor 1254 em testículo, espermatozóides, fígado e rim de camundongos. 2018. M843a. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

As bifenilas policloradas (PCBs) são um grupo de compostos hidrocarbonetos halogenados aromáticos, bioacumulativos em organismos vivos e persistente no ambiente. Além da atividade disruptora endócrina, os PCBs podem aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando ao estresse oxidativo e alteração da metilação de DNA que são fatores importantes nas etiologias da hepatotoxicidade, infertilidade masculina e doença renal. Estes agentes tóxicos podem causar disfunção mitocondrial e distúrbios que afetam a produção de ATP, ROS e morte celular, ocasionando danos à saúde humana. O presente trabalho tem como objetivo investigar possíveis alterações genotóxicas e epigenéticas causadas pelo aroclor 1254 em fígado, rim e testículo, além de verificar a indução de estresse oxidativo e disrupção dos metabólitos intermediários do ciclo de Krebs nos referidos tecidos. Camundongos machos C57/BL6 foram expostos ao Aroclor 1254 em diferentes doses (5, 50, 500 e 1000 ug/kg) por gavagem, uma vez a cada três dias, durante 50 dias. Após a exposição, os animais foram eutanasiados, os órgãos coletados e espermatozoides obtidos a partir dos epidídimos. A peroxidação lipídica em plasma e tecidos foi avaliada pela quantificação de malonaldeído (MDA) por HPLC/DAD. Os níveis de intermediários da via glicolítica, do ciclo de Krebs, de alguns nucleotídeos e aminoácidos, marcas epigenéticas (5-mC e 5-hmC) e adutos de DNA (8-oxodG e CEdG) foram quantificados por HPLC-ESI-MS/MS. A abordagem de *benchmark dose* (BMD) foi utilizada para a modelagem dose resposta. Após exposição, não foram observadas diferenças significativas da variação da massa corporal, e a razão do peso testicular, fígado e rim por massa corporal. No tecido hepático, foi observado aumento da peroxidação lipídica. Houve redução significativa dos níveis de ATP, ADP, razão $NADP^+$/NADPH, piruvato, malato, fumarato e glutamato. Observou-se redução significativa dos níveis de 5-mC e 5-hmC no DNA nuclear (nDNA), enquanto não foram observadas alterações dos níveis dos adutos. Em DNA mitocondrial (mtDNA) não foram observadas alterações nas marcas epigenéticas, no entanto foi obtido aumento significativo no aduto 8-oxodG após exposição ao Aroclor 1254. No tecido renal foi observado aumento significativo de MDA. Houve aumento significativo dos níveis de lactato e malato e reduções de ATP, ADP, glutamina, NAD^+. Foi observada a hipohidroximetilação do mtDNA. As marcas 5-mC de mtDNA, 5mC de nDNA e adutos de DNA nuclear e mitocondrial não apresentaram diferenças após exposição a PCBs. Nos testículos foi verificada redução significativa dos níveis de glutamato, malato, succinato, fumarato e razão NADH/NAD^+, hipohidroximetilção em mtDNA e hipermetilação em nDNA. Não foram observadas alterações de 5-mC em mtDNA e 5hmC em nDNA. Não foram verificadas alterações dos níveis de MDA e adutos em nDNA. Adicionando, foi observada redução dos níveis de 5-mC em DNA global de espermatozoide. Os limites inferiores do intervalo de confiança da BMD foram estimados para que estes marcadores possam ser usados na avaliação de riscos de PCBs. Os dados obtidos apontam o Aroclor 1254 como indutor de alterações do metabolismo intermediário, das marcas epigenéticas e estresse oxidativo. Essas alterações podem afetar vias celulares, levando à morte ou transformação, e aumentando o risco de doenças.

Palavras-chave: Aroclor 1254, epigenética, estresse oxidativo, metabolismo, câncer, *benchmark dose*.

ABSTRACT

Moreno, J. M. L. **Toxicological assessments of genotoxic and epigenetic changes induced by Aroclor 1254 in testis, sperm, liver and kidney of mice**. 2018. M843a. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are a group of aromatic halogenated hydrocarbon compounds, which bioaccumulate in living organisms and is persistent in the environment. Besides their endocrine disrupting activity, PCBs may increase the levels of reactive oxygen species (ROS), leading to oxidative stress and alter DNA methylation that are important factors in the etiology of liver toxicity, male infertility, and kidney disease. These toxic agents can cause mitochondrial dysfunction and disorders that affect the production of ATP, ROS and cell death, thereby leading to health-related problems. The present work aimed at investigating possible genotoxic and epigenetic changes caused by aroclor 1254 in the liver, kidney and testis, as well as determine the induction of oxidative stress and disruption of intermediate metabolites in these tissues. Male C57/BL6 mice were exposed to Aroclor 1254 at different doses (5, 50, 500 and 1000 µg/kg) by gavage, once every three days, for 50 days. After the exposure period, the animals were euthanized, organs collected, and sperms obtained from the epididymis. Lipid peroxidation in plasma and tissues was determined by quantification of malonaldehyde (MDA) using HPLC/DAD. The levels of intermediate metabolites, epigenetic marks (5-mC and 5-hmC) and DNA adducts (8-oxodG and CEdG) were quantified by HPLC-ESI-MS/MS. The Benchmark dose approach (BMD) was used for dose response modeling. No significant differences in body weight variation, testicular, liver and kidney weight to body weight ratio were observed after exposure. However, in hepatic tissues, an increase in lipid peroxidation was observed. There were significant decreases in the intermediate metabolites including the levels of ATP, ADP, pyruvate, $NADP^+$/NADPH ratio, malate and fumarate, as well as glutamate. Significant reduction of 5-mC and 5-hmC levels in nuclear DNA (nDNA) were observed, whereas no changes were observed in DNA adducts. The epigenetic marks in mitochondrial DNA (mtDNA) were not changed; however, a significant increase was observed in 8-oxodG adduct after exposure to Aroclor 1254. In renal tissues, data showed a significant increase in MDA, while for the intermediate metabolites, the levels of lactate and malate were significantly elevated, whereas significant reductions were recorded for ATP, ADP, glutamine, and NAD^+. Hypohydroxymethylation was observed in mtDNA. The 5-mC of mtDNA, 5mC of nDNA and nuclear and mtDNA adducts did not show differences after PCBs exposure. For the testicles, significant reductions in the levels of glutamate, malate, succinate, fumarate and NADH/NAD^+ ratio were observed. The PCBs also induced hypohydroxymethylation in mtDNA and hypermethylation in nDNA, but there were no changes of 5-mC in mtDNA and 5-hmC in nDNA. A reduction of nDNA adducts 8-oxodG was observed. No changes were observed in the level of MDA and DNA adducts of nDNA. However, after PCBs exposure there was a significant decrease of 5-mC in global DNA of spermatozoa. The lower bound confidence interval on BMD, which were estimated for these markers can be used in the risk assessment of PCBs. Collectively, the data obtained in this study indicate that Aroclor 1254 induces alteration of intermediate metabolites, epigenetic marks and oxidative stress. These changes can adversely affect cells and cellular pathways, therefore increase the risk of cell death or transformation.

Keywords: Aroclor 1254, epigenetics, oxidative stress, metabolism, cancer, benchmark dose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química geral de PCBs. Os átomos de hidrogênio nas posições 2,2′,6,6′ (*orto*), 3,3′,5,5′ (*meta*) e 4,4′ (*para*) podem ser substituídom por átomos de cloro; (-x, x) representam os números de átomos de cloro nos dois anéis aromáticos. 20
Figura 2 - Ativação de AhR e apoptose induzidas por PCBs. 32
Figura 3 - Etapas da carcinogênese química e possível participação de PCBs nas diferentes etapas. 35
Figura 4 - Representação esquemática simplificada do processo da peroxidação lipídica. 39
Figura 5 - Alguns exemplos de bases oxidadas 41
Figura 6 - Metilação do DNA. Reação reversível envolvendo metilação e desmetilação. As etapas incluem: (1) A enzima de novo DNA metiltransferase (DNMT3) transfere o grupo metil para o carbono 5 da citosina (C) originando 5-mC. A metilase de manutenção (DNMT1) metila o DNA hemimetilado. (2) A enzima TET inicialmente converte 5-mC à 5-hidroximetilcitosina (5-hmC). (3) posteriormente, a enzima TET converte 5-hmC em 5-formil-citosina (5-fC). (4) A enzima TET converte ainda 5-fC em 5-carboxil-citosina (5-caC). Timina DNA glicosidase (TDG) quebra a ligação glicosídica de 5-fC (4b) ou 5-caC (5), gerando um sitio abásico. (6) A via de reparo por excisão de base (BER) inclui a remoção do sítio abásico e a substituição do nucleotídeo. 44
Figura 7. Principais Conceitos para a abordagem de BMD usando dados contínuos. 50
Figura 8 - Modelo de 50 dias de exposição ao Aroclor 1254 por gavagem. Protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo CEUA nº 434) no dia 11/10/2013. 57
Figura 9 - Relação dose-efeito da variação do peso corporal em animais expostos ao Aroclor 1254 após 50 dias de exposição. Camundongos C57 foram expostos por gavagem a uma dieta de 0 – 1000 µg/kg de Aroclor por kg de peso corporal de 3 em 3 dias alternados durante 17 administrações. A função das curvas é mostrada na linha superior no canto superior direito do gráfico, seguida de parâmetros de significância e forma da curva (loglik, var). CES, tamanho do efeito crítico. CED, efeito crítico da dose; CEDL, CEDU, limite inferior e superior do intervalo de confiança de 90% para o CED, calculado pelo método *bootstrap*; encontrado no texto como BMD, BMDL e BMDU. A análise foi feita com a versão PROAST 38.9. 74
Figura 10 - Níveis de MDA-DNPH em fígado e plasma de camundongos após 50 dias de exposição ao Aroclor 1254. A figura (A) representa níveis de MDA no fígado e (B) concentração em plasma. Os resultados são expressos como média±erro padrão. Asterisco indica diferença significativa entre o grupo exposto e controle (*P<0,05). Os resultados foram obtidos pelo método de derivatização com dinitrofenilhidrazina seguido da análise por HPLC-DAD (λ = 306 nm). 76
Figura 11 - Análise da relação dose-efeito para os níveis de MDA em fígado e plasma de camundongos C57 expostos a diferentes doses de Aroclor 1254. A figura (A) indica os níveis de MDA no fígado e (B) concentração em plasma. Os dados foram ajustados com o software Proast. O CES (tamanho do efeito crítico) foi definido em 5 % (linha tracejada horizontal). A dose de efeito crítico correspondente (CED) é representada pela linha pontilhada vertical. CEDL e CEDU representam o limite

inferior e superior do nível de confiança de 90%. As doses de PCBs são apresentadas como log10. 77
Figura 12 - Análise da relação dose-efeito para os níveis de intermediários do metabolismo celular em tecido hepático dos animais após exposição ao Aroclor 1254 em diferentes doses. A) ATP; B) ADP; C) razão $NADP^+$/NADPH. Os dados foram ajustados com o software Proast. O CES (tamanho do efeito critico) foi definido em 5 % (linha tracejada horizontal). A dose de efeito crítico correspondente (CED) é representada pela linha pontilhada vertical. CEDL e CEDU representam o limite inferior e superior do nível de confiança de 90%. As doses de PCBs são apresentadas como log10. 81
Figura 13 - Análise da relação dose-efeito para os níveis de intermediários do metabolismo celular em tecido hepático dos animais após exposição ao Aroclor 1254 em diferentes doses. A) glutamato; B) lactato; C) piruvato, D) malato, E) fumarato. Os dados foram ajustados com o software Proast. O CES (tamanho do efeito crítico) foi definido em 5 % (linha tracejada horizontal). A dose de efeito crítico correspondente (CED) é representada pela linha pontilhada vertical. CEDL e CEDU representam o limite inferior e superior do nível de confiança de 90%. As doses de PCBs são apresentadas como log10. 81
Figura 14 - Análise dos níveis de 5-mC e 5-hmC em DNA nuclear e mitocondrial extraído de fígado de camundongos expostos ao Aroclor 1254. Os dados foram obtidos como descrito no item 3.11 de Material e Métodos. A significância das diferenças entre os grupos foi verificada pelo teste ANOVA seguido de pós teste Tukey. Figura A e B (5-mC e 5-hmC em DNA nuclear). Figura C e D (5-mC e 5-hmC em mtDNA). N= 7 a 9 animais por grupo. *p<0,05 comparado com o grupo controle. 83
Figura 15 - Análise da relação dose-efeito para os níveis de 5-mC e 5-hmC em DNA nuclear de tecido hepático dos animais após exposição ao Aroclor 1254 em diferentes doses. O CES (tamanho do efeito critico) foi definido em 5%. A dose de efeito crítico (CED) corresponde à redução da incidência dos níveis de 5-mC (a) e diminuição da incidência dos níveis de 5-hmC (b) em resposta à exposição. CEDL e CEDU representam o limite inferior e superior do nível de confiança de 90%. As doses de PCBs são apresentadas como log10. 84
Figura 16 - Cromatogramas representativos das análises de 5-mC, 5-hmC, obtidos por HPLC-ESI-MS/MS a partir de homogenato de fígado de camundongo exposto ao Aroclor 1254, como descrito no item 3.7 de Material e Métodos. O padrão $[^{15}N_5]1,N^6$-εdA foi usado como padrão interno. 85
Figura 17 - Níveis de 8-oxodG e CEdG em DNA nuclear **(A e B)** e mitocondrial **(C)** de fígado de camundongos expostos ao Aroclor 1254 durante 50 dias. Os dados são apresentados como média± erro padrão da média. N= 8 a 10 animais por grupo. *P<0,05 comparando diferentes grupos com o grupo controle. Modelagem de benchmark **(D)** para determinar a relação dose efeito da exposição ao Aroclor 1254 nos níveis de 8-oxodG em DNA mitocondrial do tecido hepático. O CES (tamanho do efeito critico) foi definido em 5%. A dose de efeito crítico (CED) é representada pelo aumento da incidência dos níveis de 8-oxodG em DNA mitocondrial. CEDL e CEDU representam o limite inferior e superior do nível de confiança de 90%. As doses de Aroclor 1254 são apresentadas como log10. 87

Figura 18 - Cromatogramas representativos da análise de 8-oxodG, obtidos por HPLC-ESI-MS/MS a partir do homogenato de fígado de camundongo exposto ao Aroclor 1254, como descrito no item 3.7 de Material e Métodos. 88
Figura 19 - Cromatogramas representativos da análise de CEdG, obtidos por HPLC-ESI-MS/MS a partir do homogenato de fígado de camundongo exposto ao Aroclor 1254, como descrito no item 3.7 de Material e Métodos. 88
Figura 20 - (A) Níveis de MDA-DNPH nos rins de camundogos expostos ao Aroclor 1254 durante 50 dias. Resultados são expressos como média±erro padrão. Asterisco indica diferença significativa entre o grupos exposto e controle (*P<0,05). Os resultados foram obtidos pelo método de derivatização com dinitrofenilhidrazina seguido da análise por HPLC-DAD (λ = 306 nm). (B) Relação dose-efeito para níveis de MDA em rim de camundongos expostos a diferentes doses de Aroclor 1254 durante 50 dias. O tamanho do efeito crítico (CES) foi ajustado em 5%. A dose de efeito crítico correspondente e seu limite inferior e superior do intervalo de confiança de 90 % são marcados como CED, CEDL e CEDU. As doses de Aroclor 1254 são apresentadas como log10. 90
Figura 21 - Análise da relação dose-efeito para os níveis de intermediários do metabolismo celular em tecido renal dos animais após exposição ao Aroclor 1254 em diferentes doses. O tamanho do efeito (CES) crítico foi estabelecido em 5%. A dose de efeito crítico correspondente (CED) é representada por linha pontilhada vertical. Os limites inferior e superior do intervalo de confiança de 90% são marcados como CEDL e CEDU. As doses de AROCLOR 1254 são apresentadas como log10. 94
Figura 22. Níveis de 5-mC e 5-hmC em DNA nuclear (A e B) e mitocondrial (C e D) em rim de camundongos expostos ao Aroclor 1254. Os dados são apresentados como média± erro padrão da média. N= 8 a 10 animais por grupo. *P<0,05 comparando com o grupo controle. 96
Figura 23. Análise da relação dose-efeito para os níveis de 5-hmC em DNA mitocondrial do tecido renal dos animais após exposição ao Aroclor 1254 em diferentes doses. O CES foi de 5%. A dose de efeito crítico correspondente (CED) é representada por linha pontilhada vertical. O limite inferior e superior do intervalo de confiança de 90% são marcados como CEDL e CEDU. As doses de Aroclor 1254 são apresentadas como log10. 96
Figura 24 - Níveis de CEdG e 8-oxodG em DNA nuclear e mitocondrial do tecido renal de camundongos expostos ao Aroclor 1254 em diferentes doses. Análises estatísticas utilizando teste de ANOVA seguido de pós teste Bonferroni não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. 97
Figura 25 - Níveis de MDA-DNPH em testículo de camundogos expostos ao Aroclor 1254 durante 50 dias. (A) Resultados são expressos como média±erro padrão. Os dados não apresentaram diferença significativa entre o grupos expostos e controle. Os resultados foram obtidos pelo método de derivatização com dinitrofenilhidrazina seguido da análise por HPLC-DAD (λ = 306 nm). (B) Análise da relação dose-efeito para níveis de MDA em testículo de camundongos expostos a diferentes doses de Aroclor 1254 durante 50 dias. O tamanho do efeito crítico (CES) foi ajustado em 5%. A dose de efeito crítico correspondente e seu limite inferior e superior do intervalo de confiança de 90% são marcados como CED, CEDL e CEDU. As doses de Aroclor 1254 são apresentadas como log10. 98

Figura 26 - Cromatograma representativo da análise do produto MDA-DNPH em amostra de plasma, fígado, rim e testículo. 100
Figura 27 - Análise da relação dose-efeito para os níveis de intermediários do metabolismo celular em testículo dos animais após exposição ao Aroclor 1254 em diferentes doses. O tamanho do efeito (CES) crítico foi estabelecido em 5%. A dose de efeito crítico correspondente (CED) é representada por linha pontilhada vertical. O limite inferior e superior do intervalo de confiança de 90% são marcados como CEDL e CEDU. As doses de Aroclor 1254 são apresentadas como log10. 103
Figura 28 - Níveis de 5-mC e 5-hmC em DNA nuclear e mitocondrial de testículo e DNA global de espermatozoides de camundongos após 50 dias de exposição ao Aroclor 1254. Na figura encontram-se os níveis de 5-mC e 5-hmC em DNA nuclear (A e B) e mitocondrial (C e D). A figura (E) representa os níveis de 5-mC em DNA global de espermatozoides. Os dados são apresentados como média± erro padrão da média. N = 8 a 10 animais por grupo. *P<0,05 comparando diferentes grupos com o grupo controle. 105
Figura 29 - Análise da relação dose-efeito para as marcas epigenéticas no sistema reprodutor de camundongos após exposição a diferentes doses de Aroclor 1254 durante 50 dias. (A) 5-hmC em DNA mitocondrial de testículo e (B) 5-mC em DNA total de espermatozóides. O CES foi de 5 %. Dose de efeito crítico correspondente (CED) e o limite inferior e superior do intervalo de confiança de 90% são marcados como CEDL e CEDU. As doses de Aroclor 1254 são apresentadas como log10. 106
Figura 30 - Níveis de 8-oxodG e CEdG em DNA nuclear (A e B), e de 8-oxodG em DNA mitocondrial (C) de testículo de camundongos expostos a diferentes doses de Aroclor 1254. Análise estatística utilizando teste ANOVA seguido de pós teste Bonferroni. *p< 0,05 apresentam diferença significativa em relação ao controle. 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fatores de equivalência tóxica dos 12 PCBs semelhantes a dioxinas, com correspondente “CAS Number” e “IUPAC name”.....22
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas de PCBs de acordo com o grupo homólogo. Porcentagem de cloração para vários isômeros dos congêneres de PCBs.....23
Tabela 3 - Composições típicas de algumas misturas de PCBs 24
Tabela 4 - Divisão dos animais por grupo de exposição ao aroclor 1254 durante 50 dias (17 administrações) 57
Tabela 5 - Fragmentações e energias usadas para a quantificação de metabólitos intracelulares em tecidos dos camundongos expostos ao Aroclor 1254. 62
Tabela 6 - Fragmentações e energias utilizadas para a quantificação das lesões 8-oxodG e CEdG em amostras de DNA. 67
Tabela 7 - Fragmentações e energias utilizadas para a quantificação de 5-mC e 5-hmC em amostras de DNA nuclear de fígado. 68
Tabela 8. Fragmentações e energias utilizadas para análises dos níveis de metilação e hidroximetilação do DNA.....69
Tabela 9 - Biometria da massa corporal e dos órgãos dos camundongos na fase reprodutiva após exposição ao Aroclor 1254 72
Tabela 10. Níveis de metabólitos intermediários no fígado após exposição ao Aroclor 1254. (N=7 a 8; média ± desvio padrão; valores em pmol/µg de proteína; Anova e pós teste Tukey; *p<0,05 em relação ao respetivo grupo controle). 79
Tabela 11 – Efeito do Aroclor 1254 nos níveis de metabólitos intermediários no fígado dos animais. 80
Tabela 12 - Níveis de metabólitos intermediários no rim após exposição ao Aroclor 1254. (N=7 a 8; média ± desvio padrão; valores em pmol/µg de proteína; Anova e pós teste Tukey).....92
Tabela 13 - Efeito do Aroclor 1254 nos níveis de metabólitos intermediários no rim dos animais. 95
Tabela 14 - Níveis de MDA-DNPH em plama, fígado, rim e testículo dos animais expostos ao Aroclor 1254. 100
Tabela 15 - Níveis de metabólitos intermediários no testículo após exposição ao Aroclor 1254. (N=7 a 8; média ± desvio padrão; valores em pmol/µg de proteína; Anova e pós teste Bonferroni).....101
Tabela 16 - Efeito do Aroclor 1254 nos níveis de metabólitos intermediários em testículos dos animais. 102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5caC: *5-carboxicitosina*

5fC: *5-formilcitosina*

5-hmC: *5-hidroximetilcitosina*

5-mC: *5-metilcitosina*

8-oxodG: *8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina*

ADP: *Adenosina difosfato*

AhR: *Receptores de hidrocarbonetos aromáticos*

ARNT: *Translocador nuclear de AhR*

ATP: *Adenosina trifosfato*

ATSDR: Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças

BMD: *benchmark dose*

BMDL: *limite inferior do efeito crítico da BMD*

BMDU: *limite superior do efeito crítico da BMD*

BMR: *Resposta de benchmark*

CED: *concentração do efeito crítico da dose*

CEdG: *N^2-carboxietil-2'-desoxiguanosina*

CEDL: *limite inferior da CED*

CEDU: *limite superior da CED*

CES: *tamanho do efeito crítico*

CYP: *Citocromo P450*

DAD: *Detector de arranjos de fotodiodos*

DL-PCBs: *PCBs semelhantes a dioxinas*

DNMTs: *DNA metiltransferases*

EDCs: *disruptores endócrinos*

EPA: *Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos*

ER: *Receptor de estrógeno*

ERα: *Receptor de estrógeno alfa*

ESI- *Electrospray Ionization*

ESI-MS/MS: *Espectrometria de Massas em tandem com ionização por electrospray*

GST: *Glutationa-S-transferase*

HPLC: *Cromatografia líquida de alta eficiência*

IARC: *Agência Internacional de Pesquisa em Câncer*

IPCS: *Programa internacional de segurança química*

IUPAC: *União Internacional de Química Pura e Aplicada*

LOAEL: *Dose de menor efeito adverso observável*

MDA: *Malonaldeído*

MRM: *Monitoramento de reações múltiplas*

mtDNA: *DNA mitocondrial*

NADH: *Nicotinamida adenina dinucleotídeo*

NADPH: *Nicotinamide adenine dinucleotídeo fosfato*

NDL-PCBs: *PCBs não semelhantes a dioxinas*

nDNA: *DNA nuclear*

NOEL: *Dose de nenhum efeito observável*

OMS: *Organização mundial da saúde*

PCBs: *Bifenilas policloradas*

POD: *Ponto de partida*

POPs: *Poluentes orgânicos persistentes*

RfD: *Dose de referência*

ROS: *Espécies reativas de oxigênio*

SOD: *Superóxido dismutase*

TCDD: *2,3,7,8-tetraclorodibenzo-dioxina*

TEF: *Fator de equivalência tóxica*

TET: *Ten Eleven Translocation*

XRE: *Elementos responsivos a xenobióticos*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 20
1.1 Estrutura e Propriedades Físico-Químicas dos PCBs 20
1.2. Impacto dos PCBs no meio ambiente e saúde pública 25
1.3. Toxicocinética dos PCBs 27
1.3.1 Absorção 27
1.3.2 Biotransformação 28
1.3.3 Excreção 28
1.4. Toxicodinâmica dos PCBs 29
1.4.1. Interferência endócrina 29
1.4.2. Ligação ao receptor AhR 31
1.4.3. PCBs e seus Efeitos à Saúde 32
1.5. PCBs e Câncer 33
1.6. Estresse Oxidativo 35
1.6.1. Aspectos básicos de estresse oxidativo 37
1.6.2. Lesões induzidas por estresse oxidativo 38
1.6.2.1. Peroxidação lipídica 38
1.6.2.2. Oxidação do DNA 40
1.6.3. Adutos de DNA e PCBs 42
1.7. Alterações epigenéticas induzidas por PCBs 42
1.8. Disfunção mitocondrial induzida por PCBs 45
1.9. Avaliação do risco 47
1.9.1 Modelagem dose-resposta na caraterização do risco 47
1.9.1.1 A abordagem de NOAEL 48
1.9.1.2 A abordagem de BMD 48
1.10. Justificativa 50
2. OBJETIVOS 53
Objetivos específicos: 53
3. MATERIAL E MÉTODOS 54
3.1. Reagentes 54
3.2 Equipamentos 54
3.2.1 Equipamentos básicos 54
3.2.2 Espectrofotômetro 55
3.2.3 HPLC – DAD 55

3.2.4 Espectrometria de massas....55
3.3. Animais e Exposição ao Aroclor 1254....56
3.4. Eutanásia e coleta de amostras....58
3.4.1. Biometria do testículo, fígado, rim e massa corporal....58
3.4.2 Coleta de espermatozoides....58
3.4.3 Espermograma....59
3.5 Quantificação de proteínas....59
3.6 Quantificação de MDA por HPLC/DAD....59
3.6.1. Derivatização de MDA....60
3.6.2. Quantificação de MDA por HPLC-DAD....60
3.7. Quantificação de metabólitos intermediários....60
3.8 Extração de DNA nuclear e mitocondrial....63
3.8.1 Extração do DNA mitocondrial....63
3.8.2 Extração do DNA nuclear....64
3.8.3 Extração do DNA total de espermatozoides....65
3.9. Quantificação de 8-oxodG e CEdG em DNA nuclear e mitocondrial (fígado, rim, testículo)....65
3.9.1) Condição cromatográfica para quantificação de dG por HPLC-DAD....66
3.9.2. Condição cromatográfica para quantificação das lesões por HPLC-ESI-MS/MS..66
3.10. Quantificação de 5-metil-2'-desoxicitidina (5-mC) e 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina (5-hmC) em DNA nuclear e mitocondrial....67
3.10.1. Quantificação de 5-mC e 5-hmC em DNA nuclear de fígado....67
3.10.2. Quantificação de 5-mC e 5-hmC nas demais amostras de DNA....69
3.11. Análise Estatística....70
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO....72
4.1. Caracterização do modelo experimental....72
4.2 - Avaliações dos indicadores de estresse oxidativo, metilação de DNA e intermediários do metabolismo celular....75
4.2.1. Fígado e plasma....76
4.2.1.1. Quantificação de Malondialdeído....76
4.2.1.2. Quantificação de intermediários do metabolismo celular....78
4.2.1.3 - Quantificação das marcas epigenéticas 5-mC e 5-hmC no DNA nuclear e mitocondrial do fígado....82
4.2.1.4 - Quantificação das lesões 8-oxodG e CEdG em DNA nuclear e mitocondrial de fígado....86
4.2.2. Rim....90

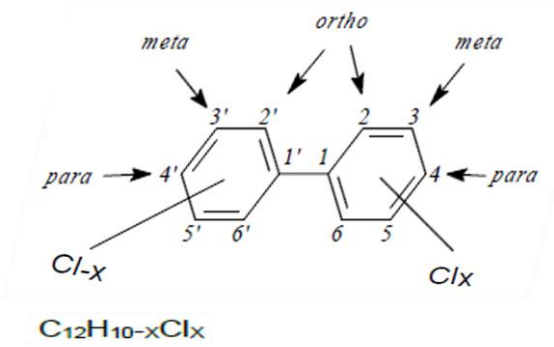
4.2.2.1. Quantificação de Malondialdeído 90
4.2.2.2. Quantificação de intermediários do metabolismo celular 92
4.2.2.3. Quantificação das marcas epigenéticas 5-mC e 5-hmC no DNA nuclear e mitocondrial do rim 95
4.2.2.4. Quantificação das lesões 8-oxodG e CEdG em DNA nuclear e mitocondrial de rim 97
4.2.3. Testículos e espermatozoides 98
4.2.3.1. Quantificação de malondialdeído em testículos 98
4.2.3.2. Quantificação de intermediários do metabolismo celular em testículos 101
4.2.3.3. Quantificação das marcas epigenéticas 5-mC e 5-hmC no DNA nuclear e mitocondrial de testículos e de 5-mC no DNA total de espermatozoides 104
4.2.3.4. Quantificação das lesões 8-oxodG e CEdG em DNA nuclear e mitocondrial de testículos 106
5. CONCLUSÃO 109
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 110
7 - Anexo 1: Resumo dos PARÂMETROS avaliados pela modelagem de BENCHMARK DOSE 128
8. ANEXOS: Certificado CEUA, CV lattes e ficha do Aluno 129

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estrutura e Propriedades Físico-Químicas dos PCBs

As bifenilas policloradas conhecidas como PCBs são compostos hidrocarbonetos aromáticos persistentes no ambiente. A sua fórmula química geral é representada por $\mathbf{C_{12}H_{10-x}Cl_x}$, onde "x" indica a quantidade de até 10 átomos de cloro que substituem os átomos de hidrogênio nos dois anéis aromáticos ligados entre si por uma ligação simples. A sua massa molecular (188 a 494 g mol^{-1}) varia de acordo com o número de átomos de cloro presentes. No total, existem 209 estruturas diferentes de PCBs, chamadas congêneres, diferenciadas pelo número e posicionamento de átomos de cloro na molécula. Na figura 1 é apresentada a estrutura química dos PCBs e o sistema de numeração nessas moléculas. Os nomes e numerações atribuídos a esses 209 congêneres são derivados de algumas fontes para a identificação de PCB, nomeadamente a nomenclatura de Ballschmiter-Zell (denominado números de BZ) e da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) (FAROON, O. M. et al., 2003; IARC, 2016; MILLS III; THAL; BARNEY, 2007; PARKINSON; SAFE, 1987; QIAN et al., 2015; SHAUGHNESSY et al., 2014; ZHU, Y., 2011; ZHU, Y. et al., 2009; ZIEGLER et al., 2014).

Figura 1 - Estrutura química geral de PCBs. Os átomos de hidrogênio nas posições 2,2′,6,6′ (*orto*), 3,3′,5,5′ (*meta*) e 4,4′ (*para*) podem ser substituídom por átomos de cloro; (-x, x) representam os números de átomos de cloro nos dois anéis aromáticos.



Adaptado de IARC (2016) e NCBI (2018)

A IUPAC determinou a nomenclatura para os 209 congêneres de PCBs, considerando a posição relativa dos átomos na estrutura bifenila. De acordo com a figura 1, a ligação entre os anéis ocorre na posição 1, no entanto, as posições no anel à esquerda são numeradas em ordem crescente no sentido anti-horário, enquanto as posições no anel à direita são numeradas em sentido horário (FAROON, O. M. et al., 2003; PENTEADO; VAZ, 2001).

A conformação de PCBs pode ser "planar" ou "coplanar", em que os dois anéis de benzeno estão no mesmo plano; e "não planar", quando os anéis de benzeno formam um ângulo de 90° entre si (IARC, 2016). O grau de planaridade é amplamente determinado pelo número de substituições de cloro nas posições orto. Os anéis aromáticos não-orto substituídos e mono-orto substituídos de PCBs podem assumir uma configuração planar, podendo ser referidos como congêneres planares ou coplanares (FAROON, O.; JONES; DE ROSA, 2000).

Segundo PATTERSON et al., 1994, bifenilas cloradas não-orto substituídas (PCBs coplanares) são os membros mais tóxicos dessas classes de compostos. A toxicidade de aroclor em animais tem sido associada com os PCBs coplanares presentes em pequenas quantidades nessas misturas. PCB-77, PCB-126, PCB-169 induzem efeitos tóxicos e alterações biológicas em animais (PATTERSON JR et al., 1994). Estudos anteriores demostraram que PCB153 é um dos principais componentes da mistura de Aroclor 1254 (6,2%) e Aroclor 1260 (10,6%), predominando na maioria das amostras ambientais. Adicionando, o PCB169 pertence a um pequeno grupo de congêneres não-orto e mono-orto substituídos (tabela 1) (SHAUGHNESSY et al., 2014). A mistura Aroclor 1254 contém cerca de 70 diferentes congêneres de PCB, com massas moleculares variando de 188 a 430 Da (PRAVETTONI et al., 2005).

Os PCBs têm sido categorizados como semelhantes a dioxinas (DL-) e PCBs não semelhantes a dioxinas (NDL-). Os DL-PCBs, designados como coplanares (tabela 1) ligam-se aos receptores de hidrocarbonetos aromáticos (AhR) presentes no citoplasma das células, causando efeitos bioquímicos e tóxicos semelhantes aos induzidos por 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (ABELLA et al., 2015; HENRY; DEVITO, 2003; NTP, 2016). Os congêneres não semelhantes a dioxinas são frequentemente referidos como os congêneres não coplanares ou orto-substituídos (HENRY; DEVITO, 2003). Os NDL-PCBs medeiam reações bioquímicas pela via de ativação dos receptores androstano e pregnano X (AL-ANATI et al., 2015).

Em junho de 2005 o Programa internacional de segurança química e a Organização mundial da saúde (OMS-IPCS) reavaliaram o fator de equivalência tóxica (TEF) para compostos semelhantes a dioxinas, incluindo alguns PCBs. Evidências experimentais demostraram que compostos não semelhantes a dioxinas com afinidade por AhR (agonistas e antagonistas) são capazes de afetar a potência tóxica da 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-dioxina (TCDD), o que precisa ser ainda melhor investigado e esclarecido (VAN DEN BERG et al., 2006).

O TEF é estabelecido com base na afinidade da molécula pelo receptor AhR, levando a um efeito tóxico proporcional a essa afinidade (SHAUGHNESSY et al., 2014). Os doze congêneres de PCBs semelhantes a dioxinas (tabela 2), tais como, tetra-, penta-, hexa- ou hepta-clorobifenilas satisfazem os critérios da OMS e possuem TEFs de 0,0001 a 0,1 com base na sua toxicidade relativa à TCDD, a qual apresenta a maior capacidade de ativar o receptor AhR (TEF = 1,0). O PCB 126 tem um TEF de 0,1, sendo o valor mais elevado para esta classe de moléculas (NTP, 2016).

Tabela 1 - Fatores de equivalência tóxica dos 12 PCBs semelhantes a dioxinas, com correspondente "CAS Number" e "IUPAC name"

Congêneres de PCBs	**Tipos**	**nome IUPAC**	**CAS No.**	**OMS - TEF**
PCB-77	Non-ortho	3,3′,4,4′-TetraCB	32598-13-3	0.0001
PCB-81	Non-ortho	3,4,4′,5-TetraCB	70362-50-4	0.0003
PCB-105	*Mono-ortho*	2,3,3′,4,4′-PentaCB	32598-14-4	0.00003
PCB-114	*Mono-ortho*	2,3,4,4′,5-PentaCB	74472-37-0	0.00003
PCB-118	*Mono-ortho*	2,3′,4,4′,5-PentaCB	31508-00-6	0.00003
PCB-123	*Mono-ortho*	2,3′,4,4′,5-PentaCB	65510-44-3	0.00003
PCB-126	Non-ortho	3,3′,4,4′,5-PentaCB	57465-28-8	0.1
PCB-156	*Mono-ortho*	2,3,3′,4,4′,5-HexaCB	38380-08-4	0.00003
PCB-157	*Mono-ortho*	2,3,3′,4,4′,5′-HexaCB	68782-90-7	0.00003
PCB-167	*Mono-ortho*	2,3′,4,4′,5,5′-HexaCB	52663-72-6	0.00003
PCB-169	Non-ortho	3,3′,4,4′,5,5′-HexaCB	32774-16-6	0.03
PCB-189	*Mono-ortho*	2,3,3′,4,4′,5,5′-HeptaCB	39635-31-9	0.00003

Na tabela TEFs foi atualizada por OMS. CAS, Chemical Abstracts Service
IUPAC, União Internacional de Química Pura e Aplicada
Fonte: AHLBORG et al. (1994) e IARC (2016).

Os PCBs são produtos sintéticos que foram comercializados a partir do ano 1900. Desde então, eles foram constantemente liberados no meio ambiente por meio da atividade industrial e do descarte incorreto pela sociedade (BARBALACE, 2003). A maior indústria produtora de PCBs nos Estados Unidos foi a empresa Monsanto Corporation entre 1930 e 1977. Estes compostos foram comercializados com o nome de Aroclor (ATSDR, 2000). Além disso, são denominados por ascarel (Brasil), Fenclor (França), Kanechlor (Japão) e Fenoclor (Itália). As preparações comerciais de Aroclor são especificadas com um código de quatro dígitos. Os primeiros dois dígitos no código referem-se à estrutura principal (12 indicando bifenila) e os dois últimos dígitos referem-se à porcentagem em massa de cloro. Por exemplo, Aroclor 1242, 1248, 1254 e 1260 referem-se a misturas de PCBs com uma porcentagem de massa média de cloro de 42, 48, 54 e 60%, respectivamente (tabela 2 e 3) (FIELD; SIERRA-ALVAREZ, 2008).

As propriedades químicas das misturas dos PCBs podem variar dependendo do grau de cloração. As misturas que apresentam baixos níveis de cloro são mais instáveis e incolores. Aquelas que apresentam altos níveis de cloração, como o aroclor 1254, 1260 e 1268 são líquidos viscosos ou sólidos amorfos (ZHU, Y., 2011). Também podem apresentar-se como fluidos ou resinas sem cor; não são inflamáveis, não sofrem oxidação ou redução e são inertes aos ácidos e bases. São compostos com baixa volatilidade, condutividade elétrica e alta condutividade térmica. Apresentam estabilidade térmica e química e são solúveis em compostos orgânicos (LANG, 1992). O grau de cloração determina, em grande parte, as suas utilizações industriais e comerciais (Tabela 2 e 3) (ZHU, Y., 2011).

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas de PCBs de acordo com o grupo homólogo. Porcentagem de cloração para vários isômeros dos congêneres de PCBs.

Bifenila	Formula	Nº de Isômeros	Ponto de fusão (°C)[b]	Ponto de Ebulição (°C)[c]	Massa Molecular	% Cloro
Monocloro	C12H9Cl	3	25–77.9	285	188.7	18.8
Dicloro	$C12H8Cl_2$	12	24.4–149	312	223.1	21.8
Tricloro	$C12H7Cl_3$	24	28–87	337	257.5	41.3
Tetracloro	$C12H6Cl_4$	42	47–180	360	292.0	48.6
Pentacloro	$C12H5Cl_5$	46	76.5–124	381	326.4	54.3
Hexacloro	$C12H4Cl_6$	42	77–200	400	360.9	58.9
Heptacloro	$C12H3Cl_7$	24	83–149	417	395.3	62.8
Octacloro	$C12H2Cl_8$	12	159–162	432	429.8	66.0
Nonacloro	$C12HCl_9$	3	182.8–	445	464.2	68.7

Decacloro	$C12Cl_{10}$	1	305.9	456	498.7	71.2
Total		209	25–77.9			

Fonte: IARC (2016).

São, portanto, moléculas estáveis, praticamente insolúveis em água, e a sua solubilidade reduz com o aumento do número de átomos de cloro. A hidrofobicidade ou lipofilicidade dessas moléculas torna os animais suscetíveis a sua bioacumulação, principalmente no tecido adiposo. São substâncias persistentes e podem ser detectadas em água, solo, sedimentos, tecidos dos animais e seres humanos (DA SILVA CRUVINEL et al., 2013; DE AZEVEDO; TORRES; MALM, 2007; KIMBROUGH et al., 2015). Dependendo do número e posição dos átomos de cloro, os congêneres de PCBs diferem em propriedades toxicológicas, físicas e químicas (PASSATORE et al., 2014). Para quantificação desses compostos em diferentes matrizes ambientais e biológicas, as técnicas de cromatografia gasosa e espectrometria de massas são comumente utilizadas (ZHANG, M.; HARRINGTON, 2015).

Tabela 3 - Composições típicas de algumas misturas de PCBs

Congêneres de PCBs	**Aroclor 1016**	**Aroclor 1242**	**Aroclor 1248**	**Aroclor 1254**	**Aroclor 1260**
Composiçao (%)					
Mono-CBs	1	1	_____	_____	_____
Di-CBs	20	17	1		
Tri-CBs	57	40	23		
Tetra-CBs	21	32	50	16	_____
Penta-CBs	1	10	20	60	12
Hexa-CBs	_____	0.5	1	23	46
Hepta-CBs	_____	_____	_____	1	36
Octa-CBs	_____	_____	_____	_____	6
Nona-CBs	_____	_____	_____	_____	
Deca-CB	_____	_____	_____	_____	_____
PCDFs (ppm)	ND	0.15-4.5	NR	0.8-5.6	0.8-5.6
Chlorine content	41	42	48	54	60
Production, 1957-1977	13	52	7	16	11

Abreviações: PCB, bifenila policlorada; CBs, bifenilas cloradas; PCDFs, dibenzofuranos policlorados; ND, não detetado; NR, não relatado.
Fonte: COGLIANO (1998); IARC (2016) e MAYES et al. (1998).

Esses compostos foram usados na produção de transformadores, capacitores elétricos, como trocadores de calor, em fluidos hidráulicos, na composição de tintas e lacas, em papéis de cópia sem carbono, como óleos lubrificantes, organoclorados, resinas plastificantes, tintas de impressão, bombas a vácuo e capeamento (NOGUEIRA et al., 1987; VALADARES; PFEILSTICKER, 2012). A sua produção foi banida na década de 1970 devido à persistência no ambiente e efeitos adversos à saúde humana e aos ecossistemas (ZHU, C. et al., 2015).

1.2. Impacto dos PCBs no meio ambiente e saúde pública

As bifenilas policloradas foram amplamente utilizadas em várias aplicações industriais (DENG et al., 2014). Os resíduos produzidos foram introduzidos no ambiente por derrames, vazamentos acidentais, incêndios em transformadores, capacitores, ou produtos químicos contendo PCBs. Atualmente são liberados para o ambiente a partir de depósitos de resíduos perigosos mal conservados, tais como fluidos de transformadores elétricos, eliminação de produtos de consumo e pela queima de alguns resíduos em incineradores (SERVICES, 2001; WOLSKA et al., 2014). O solo é o maior reservatório dos PCBs e estima-se o acúmulo no ambiente de aproximadamente 21000 toneladas desses produtos (ALI et al., 2015).

A Convenção de Estocolmo sobre poluentes orgânicos persistentes (POPs) reconhece PCBs entre os 33 produtos químicos considerados perigosos (KRUMWIEDE; HUEBSCHMANN, 2008; UNEP, 2018).

Esses compostos ocorrem no ambiente como misturas cujas composições diferem dos PCBs comerciais. Após serem liberados para o ambiente ocorrem alterações dos seus componentes ao longo do tempo devido a transformações químicas. Os congêneres de PCBs com baixo teor de cloro tendem a ser mais voláteis e solúveis em água, podendo volatilizar ou dispersar em forma de aerossóis no ambiente (COGLIANO, V. J., 1998; WHO/IPCS, 1992).

Entretanto, os congêneres de PCBs altamente clorados apresentam baixa volatilidade e pouca solubilidade em água, ligam-se facilmente a partículas orgânicas e são suscetíveis aos processos de descloração anaeróbica (HENRY; DEVITO, 2003; WHO/IPCS, 1992). Atualmente, não são produzidos novos estoques de PCBs; porém, as quantidades existentes são continuamente redistribuídas no ambiente por meio da atividade humana e processos naturais.

Eles podem ser absorvidos pelos organismos e ser biomagnificados na cadeia alimentar. (NTP, 2016).

De acordo com WHO/IPCS, 1992, os PCBs foram encontrados no ar numa concentração de 0.002 até 15 ng/m^3 e nas áreas industriais foram detectados altos níveis acima de microgramas/m^3. Também foram encontrados em água de chuva e neve até a concentração de 250 ng/litro. Água potável de aréas não contaminadas contém menos de 1 ng de PCB/litro, podendo chegar a 5 ng/litro. No ambiente ocupacional, a concentração no ar pode ser bastante elevada. Na fabricação de transformadores ou capacitores as concentrações detectadas de PCBs foram de até 1000 pg/m^3. Em ferrugem de chaminé e em casos de incêndios ou explosões foram encontradas concentrações de 8000 mg PCB/kg de fuligem. Normalmente, solos e sedimentos contêm concentrações de PCBs na faixa de <0,01-2,0 mg/kg. Foram detectados em solos poluídos níveis de até 500 mg/kg (WHO/IPCS, 1992).

Os PCBs foram sintetizados na Alemanha no ano 1800, e a sua produção em escala industrial teve início um século mais tarde. Estima-se que aproximadamente 15% da produção mundial de PCBs encontram-se nos países em desenvolvimento. O seu uso é proibido em novos equipamentos por algumas legislações, sendo, no entanto, permitido o uso de equipamentos antigos contendo PCBs até o término da vida útil (BUHA et al., 2015; HOPF et al., 2014; PENTEADO; VAZ, 2001).

As propriedades físico-químicas dos PCBs facilitaram sua entrada na cadeia alimentar. O acúmulo de contaminantes nos tecidos dos organismos ocorre pela ingestão de água, alimentos e sedimentos contaminados, sendo a principal via de exposição humana a esses compostos (PENTEADO; VAZ, 2001). A exposição pode também ocorrer por inalação do ar contaminado. As principais fontes alimentares de PCBs são peixes, carnes e produtos lácteos (SERVICES, 2001). Presume-se que a dieta rica em peixe seja a maior fonte dos altos niveis de PCBs encontrados em amostras de tecidos humanos (LUDEWIG et al., 2008).

No século 20 foram registrados dois grandes casos de intoxicação por consumo de alimento contaminado com PCBs. Em 1968 nas ilhas Kyushu no Japão mais de 1600 pessoas foram intoxicadas após consumirem óleo de arroz contaminado com PCBs e dibenzofuranos policlorados (PCDF). Em Taiwan, onze anos depois, ocorreu um acidente semelhante também envolvendo óleo de arroz contaminado e mais de 2000 pessoas foram intoxicadas (DE AZEVEDO et al., 2007).

Os seres humanos interagem com os PCBs diariamente, o que tem sido uma preocupação mundial em virtude dos riscos para a saúde das populações (BUHA et al., 2015). Poucos estudos relatam os efeitos à saúde dos diferentes tipos de exposição. No entanto, há consistência e coerência nos estudos com animais, o que é sugestivo de prejuízo para a saúde humana a longo prazo (ROBERTSON; SULKOWSKI; HENNIG, 2008). Congêneres de PCBs são detectados em sangue e tecidos de humanos, mamíferos e peixes, com uma frequência muito elevada e em concentrações na ordem de 119.69 a 2156.95 ng g^{-1} (ABELLA et al., 2015; FERRANTE et al., 2010).

1.3. Toxicocinética dos PCBs

1.3.1 Absorção

Os seres humanos absorvem PCBs por ingestão, inalação e exposição cutânea. A taxa de absorção dos PCBs varia conforme o número de átomos de cloro distribuídos nos seus congêneres (ATSDR, 2000; PENTEADO; VAZ, 2001). Os PCBs são bem absorvidos pelo trato gastrointestinal dos seres humanos e animais. A inalação pode ser a principal via de exposição ocupacional aos PCBs. Estudos anteriores demostraram que a absorção ocorre de uma forma substancial em indivíduos expostos a altas concentrações desses compostos pela via inalatoria (COGLIANO, J., 1996; IARC, 2016).

Segundo COGLIANO, 1996, a absorção dérmica em macacos Rhesus expostos ao solo contendo 44 ppm de Aroclor 1242 ou 23 ppm de Aroclor 1254 durante 24 h foi de 14 %. Em testes *in vitro* com pele humana exposta ao Aroclor 1254 diluído em água, a absorção depois de meia hora foi de 12%, e após 24 horas foi de 44% (COGLIANO, J., 1996). Foram utilizados Aroclor 1242 e 1254 em óleo mineral, solo e água para estudar a absorção percutânea na pele de cadáver humano. Após um período de 24 horas, 2.6, 10 e 43% da dose foram retidas na pele humana. Estudos *in vitro* revelaram que PCBs penetram facilmente na pele humana e são absorvidos pela circulação sistêmica. Entretanto, o veículo tem um importante papel na regulação da retenção relativa dos PCBs na pele humana (ATSDR, 2000).

Após absorvidos, os PCBs entram na circulação, ligam-se às frações de lipoproteínas e são transportados. A distribuição inicial ocorre no fígado e músculos, que são altamente

perfundidos. Devido à sua natureza lipofílica, tendem a acumular-se em tecidos gordurosos, pele e leite materno (COGLIANO, J., 1996).

1.3.2 Biotransformação

A biotransformação de PCBs em animais experimentais tem sido extensivamente revisada. Estudos mostraram que o metabolismo de PCBs depende do número e posição dos átomos de cloro no anel bifenila, e a diminuição da taxa de excreção com o aumento de cloração está diretamente relacionada com a diminuição do metabolismo dos congêneres mais clorados (ATSDR, 2000).

No organismo esses xenobióticos são biotransformados por várias enzimas que estão localizadas principalmente no fígado, como por exemplo as monooxigenases do sistema citocromo P450 (CYP) e as enzimas das reações de conjugação. O processo de biotransformação ocorre em duas etapas. Na primeira fase os PCBs são transformados em fenóis, dihidrodióis, epóxidos e dióis. Na segunda fase podem ser conjugados com ácido glicurônico, sulfato e glutationa. A biotransformação dos PCBs depende dos níveis das isoenzimas do citocromo P450 no tecido e da quantidade e posições dos átomos de cloro (ATSDR, 2000).

A indução de diversas monooxigenases dependentes de CYP é um indicador sensível da exposição a PCBs, observado em várias espécies animais (SAFE, 1994).

1.3.3 Excreção

Os congêneres de PCBs com baixos níveis de cloro são excretados mais rapidamente, enquanto que congêneres com altos níveis de cloro na molécula são excretados mais lentamente. As principais vias de excreção de PCBs são a urinária e fecal (ATSDR, 2000; PENTEADO; VAZ, 2001). Após a administração parenteral, a excreção de PCBs e metabólitos segue a mesma sequência que depois de administrado pela via oral, isto é, maiores quantidades são excretadas nas fezes do que na urina. Além disso, os metabólitos polares são encontrados preferencialmente na urina e os derivados não-polares nas fezes (ATSDR, 2000).

1.4. Toxicodinâmica dos PCBs

Os mecanismos de toxicidade dos PCBs ainda não são claramente compreendidos. Porém, estudos indicam que os congêneres de PCBs diferem qualitativamente e quantitativamente nos efeitos biológicos. Pesquisas anteriores demostraram semelhanças entre PCBs e TCDD no que se refere aos efeitos mediados pelo receptor AhR. No entanto, trabalhos evidenciam mecanismos alternativos em vários efeitos induzidos por PCBs (ATSDR, 2000).

1.4.1. Interferência endócrina

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) e Organização Mundial da Saúde (OMS) definem disruptores endócrinos (desreguladores ou interferentes endócrinos) como substâncias que interferem na síntese, secreção, transporte, ligação, ou eliminação dos hormônios naturais do organismo, responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução e comportamento (DAMSTRA et al., 2002; KABIR; RAHMAN; RAHMAN, 2015). Os disruptores (interferentes) endócrinos incluem as bifenilas policloradas (PCBs), praguicidas organoclorados, herbicidas, metoxicloro, biocidas, estabilizadores de calor, catalisadores químicos, plásticos, produtos farmacêuticos ou componentes da dieta (JENG, 2014; VALADARES; PFEILSTICKER, 2012).

Os PCBs são capazes de alterar a atividade estrogênica, interferindo nas funções de vários órgãos. Alguns dos congêneres de PCBs, tais como PCB77 e PCB126, apresentaram atividade biológica significativa, interferindo na sinalização do receptor de estrógeno (ER). PCB126 pode induzir a transcrição do receptor de estrógeno α (ERα) e PCB153 pode ativar a sinalização do ER (QIAN et al., 2015). Esses xenobióticos podem afetar níveis de hormônios estrogênicos, androgênicos, de tireóide, pituitária, corticosteróides, entre outros. Os análogos ou metabólitos de PCBs atuam como desreguladores endócrinos e ambos os efeitos estrogênicos e anti-estrogênicos podem ser induzidos por essas substâncias (QUEIROZ; WAISSMANN, 2006).

Atualmente, os efeitos dos disruptores endócrinos (EDCs) no sistema reprodutor masculino têm recebido bastante atenção (ENDO et al., 2003). Diversos estudos mostraram a

indução de malformação fetal, diminuição da capacidade reprodutiva e anormalidades testiculares por PCBs. Os efeitos de PCBs foram estudados *in vivo* e *in vitro* na esteroidogênese gonadal e adrenal, mas os mecanismos pelos quais esses compostos induzem anomalias nos tecidos reprodutivos e esteroidogênese ainda não estão bem definidos. Alguns PCBs exibem ações estrogênicas e antiestrogênicas, causando alteração no sistema reprodutivo (ANDRIC et al., 2000).

Os EDCs são parcialmente responsáveis pela redução de número de espermatozoides (ENDO et al., 2003). Estudos sobre a disfunção reprodutiva masculina demostraram um aumento significativo de homens que sofrem de criptorquidia, hipospadia e tumores testiculares (PFLIEGER-BRUSS; SCHUPPE; SCHILL, 2004). Os efeitos dos PCBs nos sistemas reprodutivos foram observados em uma variedade de espécies animais, incluindo macacos Rhesus, ratos, camundongos e martas (EPA, 2013). Crianças nascidas de mulheres expostas aos PCBs em fábricas apresentaram diminuição de peso corporal e uma redução significativa na idade gestacional. Também populações expostas de pescadores a altos níveis desses toxicantes apresentaram reduções semelhantes. Esses mesmos efeitos foram observados em várias espécies de animais, e foi sugerido que os efeitos reprodutivos podem ser importantes em seres humanos após exposição aos PCBs (EPA, 2013).

O testículo é um órgão alvo importante para PCBs, sendo que este toxicante desregula a produção de esperma e o desenvolvimento testicular. Existe uma associação inversa significativa entre exposição a PCBs e motilidade espermática, podendo afetar também a concentração de esperma quando em doses elevadas. Homens com níveis séricos de PCBs em torno de 240 ng/g de lipídios, parceiros de mulheres com dificuldade de engravidar, foram diagnosticados com baixa concentração de esperma (JENG, 2014). Os níveis de alguns análogos de PCBs foram inversamente correlacionados com motilidade espermática nas amostras de sêmen em que a concentração de esperma foi inferior a 20 milhões/mL. Rapazes nascidos de mulheres expostas aos PCBs apresentaram subdesenvolvimento peniano. Outros estudos têm descrito uma forte ação gonadotóxica dos PCBs, e o efeito desses agentes na indução de alterações testiculares (QUEIROZ; WAISSMANN, 2006). Os efeitos na qualidade do sêmen podem ser mediados pela interferência com hormônios reprodutivos (PETERSEN et al., 2015).

Segundo CAI et. al (2015), os parâmetros de sêmen são os biomarcadores mais utilizados para investigar os efeitos dos xenobióticos na fertilidade masculina, mas a avaliação da qualidade do sêmen fornece poucas informações sobre o mecanismo de ação nos órgãos alvos. Os toxicantes podem afetar o sistema reprodutor masculino em vários locais alterando as

suas funções fisiológicas. Foi observado em estudo anterior que a dose de 500 μg/kg de Aroclor 1254 (administração a cada 3 dias por gavagem) levou a uma redução da quantidade de espermatozoides e alteração da motilidade e morfologia espermática, sem afetar significativamente o peso ou a morfologia dos órgãos (CAI, J.-L. et al., 2015).

1.4.2. Ligação ao receptor AhR

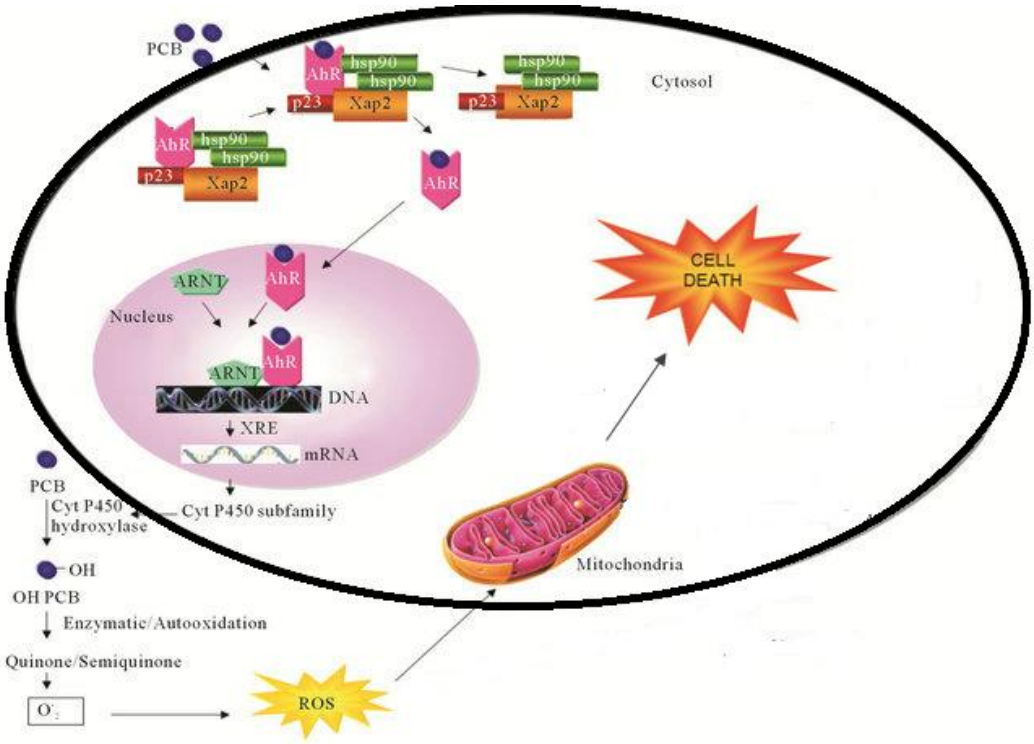
Os mecanismos de toxicidade de PCBs são multifatoriais, envolvendo tanto o receptor AhR quanto mecanismos independentes de AhR (ANDRIC et al., 2000; FULL SEMESTRE, 2003). Os PCBs semelhantes a dioxinas ativam o receptor AhR, causando distúrbios, tais como, perda de peso severa, atrofia tímica, hepatotoxicidade, imunotoxicidade e indução enzimática em roedores (AITKEN, ROBERT J; CURRY, 2011).

Na figura 2 é apresentada a via de ativação do AhR, a qual é iniciada pela ligação de PCBs ao complexo proteico AhR citosólico. O complexo AhR é constituído pelas proteínas AhR, HSP90 (proteínas de choque térmico), XAP2 (Proteína X associada 2) e uma proteína de 23 kDa (p23). No citosol AhR se mantém inativo devido à sua ligação com as proteínas chaperonas HSP90, p23 e XAP2.

PCBs ativam o AhR estimulando a dissociação das proteínas associadas ao AhR. O complexo PCB-AhR é subsequentemente translocado para o núcleo, onde dimeriza com o translocador nuclear de AhR (ARNT). O heterodímero ARNT-AhR liga-se a regiões “GCGTG” de DNA conhecidas como Elementos de Resposta a Xenobioticos (XRE). Quando os PCBs se ligam ao AhR, eles modulam a expressão de diferentes genes. Esta ação aumenta ou diminui a transcrição de genes alvos, como isoformas de CYP450, NAD(P)H:quinona redutase, aldeído desidrogenase classe 3 e glutationa S-transferase (DAMSTRA et al., 2002; XIAO et al., 2015).

Citocromo P450 catalisa a oxidação de bifenilas policloradas com baixos níveis de cloro, formando metabólitos de PCBs hidroxilados (HO-PCB) que posteriormente podem ser oxidados enzimaticamente para semi-quinonas ou quinonas. As quinonas de PCBs podem entrar em ciclos redox, levando à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SELVAKUMAR et al., 2013).

Figura 2 - Ativação de AhR e apoptose induzidas por PCBs.



Retirado de SELVAKUMAR et al. (2013).

Segundo AL-ANATI (2015), altos níveis de HO-PCB foram detectados em seres humanos e animais, e aproximadamente 40 diferentes tipos de HO-PCBs foram identificados em sangue humano. Ainda é pouco compreendida a toxicidade dos metabólitos hidroxilados de PCBs, mas vários estudos indicam que podem causar efeitos adversos em seres humanos, tais como distúrbios do hormônio da tireóide e do desenvolvimento neurológico (AL-ANATI et al., 2015).

1.4.3. PCBs e seus Efeitos à Saúde

A IARC recentemente classificou os PCBs como carcinógenos humanos (Grupo 1) devido aos seus efeitos carcinogênicos em seres humanos e animais (IARC, 2016). A relação entre a exposição a PCBs e efeitos à saúde humana reflete uma ampla variação da exposição a diferentes congêneres e contaminantes presentes em formulações de PCBs e produtos de combustão. Evidências sugerem que a exposição aos PCBs está relacionada ao aumento do

risco de câncer, principalmente hepático e melanoma. A exposição a PCBs também está associada a problemas na reprodução, tais como redução de crescimento, desenvolvimento retardado e efeitos neurológicos na progênie; alterações imunológicas; e alterações dermatológicas (IPCS, 2003).

Estudos epidemiológicos mostram associações entre a exposição ocupacional a PCBs e a ocorrência de câncer em vários tecidos. A intoxicação pela mistura de PCB/PCDF em óleo de arroz no Japão levou ao aumento da mortalidade por doenças de fígado (YU et al., 1997). A partir de estudos em fígado de mamíferos, sabe-se que os PCBs podem causar indução marcante de enzimas do sistema oxidativo microssomal de função mista. Estudos morfológicos em tecidos hepáticos revelaram hepatocitomegalia, proliferação de retículo endoplasmático liso e acúmulo de lipídios (HINTON; KLAUNIG; LIPSKY, 1978).

De acordo com ATDRS (2000), não existe uma indicação clara de que a exposição ambiental a PCBs tem causado efeitos adversos no fígado dos seres humanos. Entretanto, efeitos adversos hepáticos estão essencialmente limitados aos indicadores bioquímicos séricos como AST, ALT, GGT, bilirrubina, lipídios e colesterol, que são rotineiramente examinados em ensaios clínicos. Estudos indicaram alterações histopatológicas no fígado de ratos expostos à dieta de Aroclor 1254 na concentração de 1,25 - 5 mg/kg/dia por 2 anos, Aroclor 1260 a 5 mg/kg/dia por 16 meses e 2,5 mg/kg/dia por 8 meses, e Aroclor 1260 a 5 mg/kg/dia durante 21 meses (ATSDR, 2000).

Segundo Lees, 1990, os únicos produtos químicos singularmente identificados em exposições ocupacionais associadas a alguns casos de câncer de rim foram PCBs. Câncer renal é relativamente raro em homens jovens. Existem dados toxicológicos significativos em animais que indicam os PCBs como promotores de câncer (LEES, 1990). Foi observado aumento do peso renal e alterações bioquímicas sugestivas de dano da função renal em ratos expostos por gavagem a 10 mg/kg/dia de Aroclor 1254 durante 5 a 15 semanas. Também foram verificadas alterações histopatológicas renais sem nenhum aumento do peso renal quando expostos a 100 mg/kg/dia de Aroclor 1242, 3 dias/semana por 3 semanas (ATSDR, 2000).

1.5. PCBs e Câncer

O câncer é um processo de estágios múltiplos e complexos caracterizados por alterações moleculares que estão envolvidas em três grandes etapas: a iniciação, promoção e

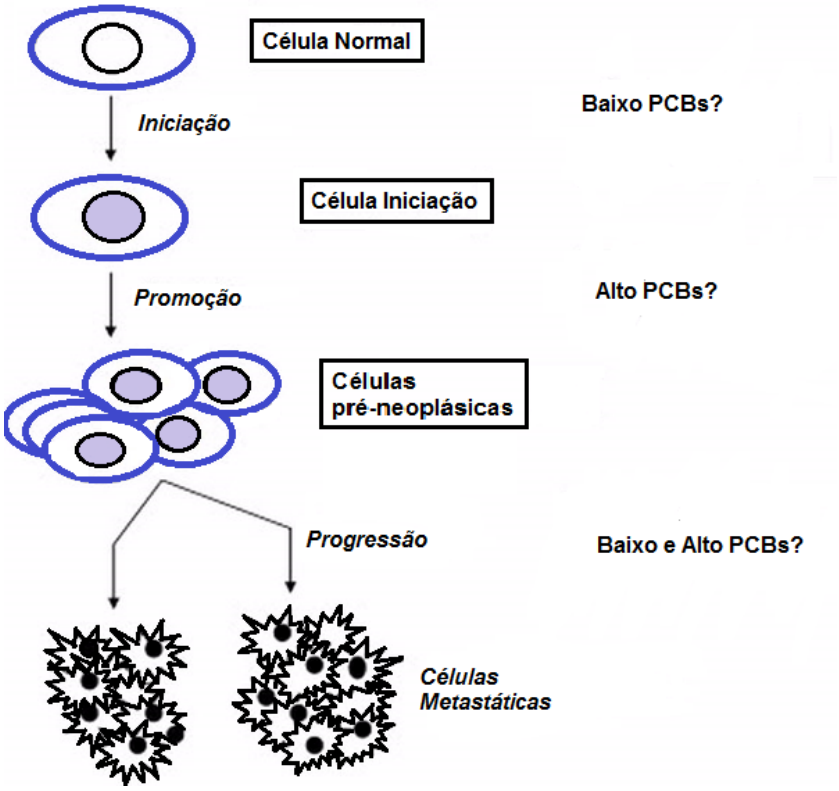
progressão (Figura 3). A iniciação é causada por um evento genotóxico, ao passo que a promoção é caracterizada pelo aumento da quantidade de células iniciadas, havendo a participação de mecanismos epigenéticos a longo prazo. A progressão é o estágio da carcinogênese que está associado com alterações cromossômicas ou cariotípicas (LUDEWIG et al., 2008).

As substâncias químicas indutoras de câncer têm sido classificadas em carcinógenos reativos com DNA (genotóxicos) e carcinógenos não genotóxicos ou epigenéticos (KLAASSEN; WATKINS III, 2009). Os agentes cancerígenos são definidos como produtos químicos que podem causar, direta ou indiretamente alterações genéticas nas células alvo. O termo "carcinógeno genotóxico" indica um produto químico capaz de gerar câncer alterando diretamente o material genético das células alvo, enquanto o "carcinógeno não genotóxico" representa um produto químico capaz de gerar câncer por algum mecanismo secundário não relacionado ao dano direto do gene. Estes conceitos podem contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos carcinogênicos e do estabelecimento de estratégias para avaliação do risco de câncer por exposição a xenobioticos (HAYASHI, 1992).

Células do câncer apresentam caraterísticas que incluem autossuficiência em sinais de proliferação, insensibilidade para sinais inibidores de crescimento, evasão da morte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, e capacidade de invasão tecidual. Subjacente a estas características está a instabilidade do genoma, que gera a diversidade genética (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Eventos moleculares genéticos e epigenéticos estão envolvidos nas alterações da expressão gênica ao longo do processo (LOCHHEAD et al., 2015; LOUREIRO, A. P. M.; DI MASCIO; MEDEIROS, 2002; ZIECH et al., 2011). O câncer agrega um conjunto de doenças resultantes de uma série de alterações no DNA das células, levando à perda da função normal, crescimento aberrante e metástases. Frequentemente tem sido identificada mutações de vários genes, dentre eles os proto-oncogenes e genes supressores de tumores. As funções desses genes incluem a indução e interrupção da proliferação celular, respectivamente (KOIFMAN et al., 2003).

Figura 3 - Etapas da carcinogênese química e possível participação de PCBs nas diferentes etapas.



Adaptado de LUDEWIG et al. (2008).

Estudos indicam que as misturas de PCBs com níveis elevados de átomos de cloro são mais propensas a induzir hiperplasia nodular e hepatocarcinoma do que PCBs com baixos níveis de cloro (LUDEWIG et al., 2008). Evidência sugestiva para a carcinogenicidade de PCBs em humanos é suportada pela extensa pesquisa conclusiva em animais. Os PCBs foram classificados como carcinógenos humanos pela IARC (Agência Internacional de Pesquisa em Câncer) (Grupo 1) e EPA, baseando-se principalmente nos estudos de carcinogenicidade em animais. Também, o Programa Nacional de Toxicologia dos EUA concluiu que os PCBs são cancerígenos para humanos baseando-se em testes aceitáveis de carcinogenicidade nos animais (BUHA et al., 2015; SERVICES, 2001; ZIEGLER et al., 2014).

1.6. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio celular em que prooxidantes predominam sobre antioxidantes, levando a possíveis danos oxidativos. É resultado de três

fatores, tais como aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), deficiência do sistema de defesa antioxidante e capacidade insuficiente de reparar o dano oxidativo. Os danos induzidos por ROS incluem alterações de macromoléculas celulares, como os lipídios de membranas, DNA, RNA e proteínas. Os danos podem alterar a função das células ou levar à morte celular (ALY, N. et al., 2010; HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M., 2015).

Estudos recentes demonstraram que PCBs induzem aumento dos níveis de ROS, e esse aumento pode levar ao estresse oxidativo, causando lesão celular, mutagênese, carcinogênese, e morte celular. Sendo assim, estresse oxidativo causado por PCBs e os seus metabólitos tem um papel importante na citotoxicidade em células de mamífero. Apesar das evidências de que os PCBs provocam estresse oxidativo, a identificação de ROS responsáveis pela toxicidade continua totalmente desconhecida. As informações sobre as espécies reativas e organela responsável pela sua produção podem ser importantes para redução dos efeitos de PCBs em populações humanas (ZHU, Y. et al., 2009).

Segundo Xu et al. (2015), PCB-quinonas induziram oxidação de biomoléculas, citotoxicidade, genotoxicidade e apoptose em células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) (XU, D. et al., 2015). Além disso, Aroclor 1242 inibiu a atividade total de ATPase no fígado, rim e cérebro e a fase 3 da respiração, desacoplando a fosforilação oxidativa e interferindo com a homeostase de cálcio em mitocôndrias hepáticas de ratos (BANUDEVI et al., 2006). Apesar do baixo fluxo de oxigênio que caracteriza o microambiente testicular, esse tecido continua a ser vulnerável ao estresse oxidativo devido à abundância de ácidos graxos insaturados e presença de possíveis sistemas geradores de ROS (AITKEN, R JOHN; ROMAN, 2008). O Aroclor 1254 inibiu a espermatogênese e induziu estresse oxidativo em mitocôndrias testiculares de rato, além de reduzir a atividade da enzima esteroidogênica em células de Leydig. Estresse oxidativo tem sido associado com a apoptose em diversos tipos celulares, incluindo as células espermatogênicas (ALY, H. A., 2013).

As células germinativas são diferenciadas nos testículos, e são suportadas e protegidas de estresse oxidativo pelas células de Sertoli. Durante o processo de espermiogênese essas células são extremamente sensíveis ao estresse oxidativo. As espermátides quando se tornam células isoladas têm uma capacidade limitada para o reparo do DNA e restabelecimento da glutationa. Durante a maturação espermática as células são altamente dependentes da proteção oferecida pelas células de Sertoli, que contêm altos níveis de atividade antioxidante, como a superóxido dismutase (SOD), glutationa redutase, transferase e peroxidase (AITKEN, ROBERT J; CURRY, 2011).

1.6.1. Aspectos básicos de estresse oxidativo

Espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser classificadas em radicalares, como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), radical peroxila ($^{\bullet}OOH$), e não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), oxigênio singlete e peróxidos orgânicos (AUGUSTO, 2006; HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C., 2015; SILVA; GONÇALVES, 2010).

Elevadas concentrações de várias espécies reativas prejudicam a fisiologia, lesando biomoléculas. Se as lesões não forem reparadas, podem causar danos celular e tecidual. Porém, concentrações muito baixas das espécies reativas são prejudiciais, uma vez que comprometem o sistema de defesa contra microrganismos invasores e alguns processos proliferativos importantes. Em contrapartida, pequenos aumentos transitórios das concentrações dessas espécies acionam mecanismos de sinalização redox. As defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas modulam as concentrações de ROS (AUGUSTO, 2006).

A indução da toxicidade pelos PCBs é mediada pelo aumento de ROS e tem se verificado que a ativação de enzimas microssomais catalisa a conversão de PCBs a metabólitos ativos. PCBs induzem seletivamente enzimas CYP450 1A1 e 1A2, que são potenciais fontes de ROS (DOGAN; ERISIR, 2012). A exposição a Aroclor 1254 aumentou os níveis de ROS e diminuiu a atividade do sistema antioxidante de esperma no epidídimo de ratos adultos (MURUGESAN et al., 2005). Os testículos contêm uma variedade de sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Em relação aos componentes enzimáticos do sistema de defesa no testículo, a indução do estresse oxidativo precipita uma resposta caracterizada pela indução mediada por NFkB (factor nuclear kappa B) da expressão de mRNA de superóxido dismutase (SOD), glutationa-peroxidase (GPx) e glutationa-S-transferase (GST) (AITKEN, R JOHN; ROMAN, 2008; MURUGESAN et al., 2005).

A primeira etapa na geração de ROS é a redução monoeletrônica do oxigênio molecular, levando à produção do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). A enzima antioxidante SOD catalisa a dismutação de $O_2^{\bullet-}$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 formado é um oxidante que permeia facilmente as membranas celulares e sua concentração intracelular é estritamente regulada a fim de evitar o dano oxidativo a lipídios, proteínas e DNA via geração de radical $^{\bullet}OH$ (AITKEN, R JOHN; ROMAN, 2008; MURUGESAN et al., 2005; TKACZYK;

VIZEK, 2007). Esse papel é desempenhado pelas enzimas catalase e glutationa peroxidase. Por outro lado, glutationa-S-transferases (GSTs) englobam uma ampla família de proteínas que catalisam a conjugação do grupo sulfidrila de glutationa reduzida com centros eletrofílicos de uma extensa variedade de substratos que são, por fim, excretados das células. Esta atividade é crítica na detoxificação de lipídios oxidados, assim como para o metabolismo de xenobióticos (AITKEN, R JOHN; ROMAN, 2008; MURUGESAN et al., 2005).

1.6.2. Lesões induzidas por estresse oxidativo

A indução de estresse oxidativo é um mecanismo pelo qual os PCBs podem exercer a sua toxicidade. Possíveis alvos celulares de ROS incluem os ácidos graxos poli-insaturados das membranas, o DNA, proteínas de vias de sinalização e fatores de transcrição (ROBERTSON et al., 2008).

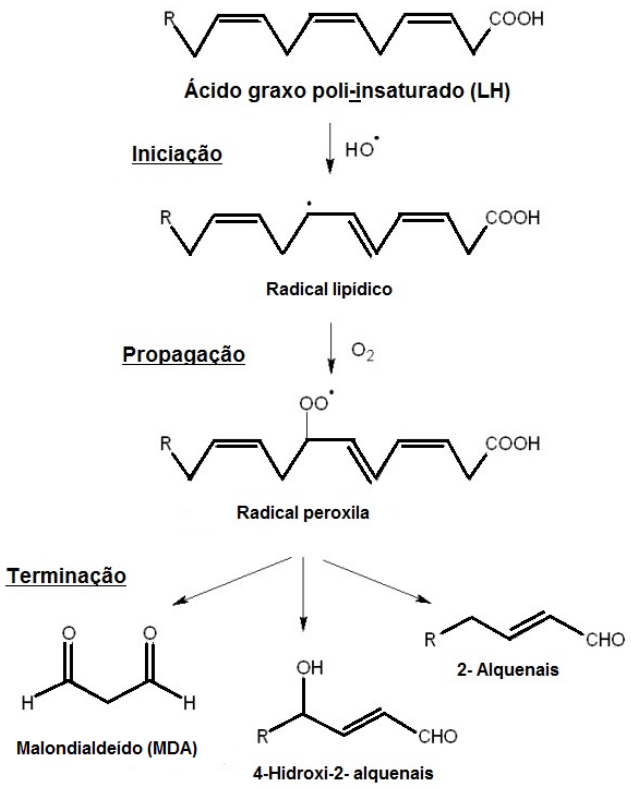
1.6.2.1. Peroxidação lipídica

ROS podem causar danos em ácidos graxos poli-insaturados que levam a alterações funcionais das membranas. Esse fenômeno é denominado peroxidação lipídica (MURUGESAN et al., 2005). A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia iniciada pela abstração de hidrogênio ou adição de um radical de oxigênio, resultando em oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (REPETTO; BOVERIS; SEMPRINE, 2012).

O processo de peroxidação lipídica é constituído pelas fases de iniciação, propagação e terminação (figura 4) (LOUREIRO, A. P. D. M., 2000; MATEOS et al., 2005). A primeira etapa consiste na abstração de hidrogênio pelo $^{\bullet}OH$ ou $LO^{\bullet}$ do ácido graxo poli-insaturado (LH) da membrana celular com consequente formação do radical lipídico ($L^{\bullet}$) que é estabilizado por ressonância para o dieno conjugado apresentado na figura 4. Na fase de propagação ocorre a reação entre $L^{\bullet}$ e O_2, resultando no radical peroxila ($LOO^{\bullet}$), que abstrai hidrogênio do ácido graxo poli-insaturado, formando novamente $L^{\bullet}$ e hidroperóxido lipídico (LOOH). A terminação ocorre quando os radicais ($L^{\bullet}$, $LOO^{\bullet}$, $LO^{\bullet}$) produzidos formam produtos não radicalares (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Os hidroperóxidos lipídicos são decompostos originando

radicais que propagam a peroxidação lipídica e produtos não radicalares. Os produtos secundários gerados tais como aldeídos, cetonas, epóxidos, são mais estáveis do que os radicais livres iniciais e radicais formados durante a fase de propagação da peroxidação lipídica, podendo atingir locais distantes da sua formação (LOUREIRO, A. P. D. M., 2000).

Figura 4 - Representação esquemática simplificada do processo da peroxidação lipídica.



Adaptado de MIMICA-DUKIĆ et al. (2012); NORDBERG e ARNER (2001).

A peroxidação lipídica é mediada por radicais livres. Está associada ao envelhecimento e doenças crônicas como câncer, aterosclerose, inflamação. O malondialdeído (MDA) é um dos principais produtos de oxidação secundários de ácidos graxos poli-insaturados que pode ter efeitos mutagênicos, citotóxicos, e, possivelmente, participar do processo da aterosclerose. Em várias doenças, os níveis de MDA foram encontrados elevados em decorrência de danos provocados pelos radicais livres. Sendo assim, a determinação deste biomarcador tem sido amplamente aplicada para a avaliação da lipoperoxidação em ciências biológicas e médicas (ALDINI et al., 2011; MATEOS et al., 2005).

De acordo com MURUGESAN (2005), as membranas testiculares são altamente ricas em ácidos graxos poli-insaturados, e muito suscetíveis ao estresse oxidativo. Aroclor 1254 aumentou os níveis de ROS e diminuiu a atividade do sistema antioxidante encontrados em esperma dos epidídimos de ratos adultos (MURUGESAN et al., 2005). Uma das consequências dos altos níveis de ROS produzidos em espermatozoides é a indução de cascatas de peroxidação lipídica que culminam na formação de aldeídos eletrofílicos, tais como o 4-hidroxinonenal, o malonaldeído (MDA) e acroleína (MOAZAMIAN et al., 2015).

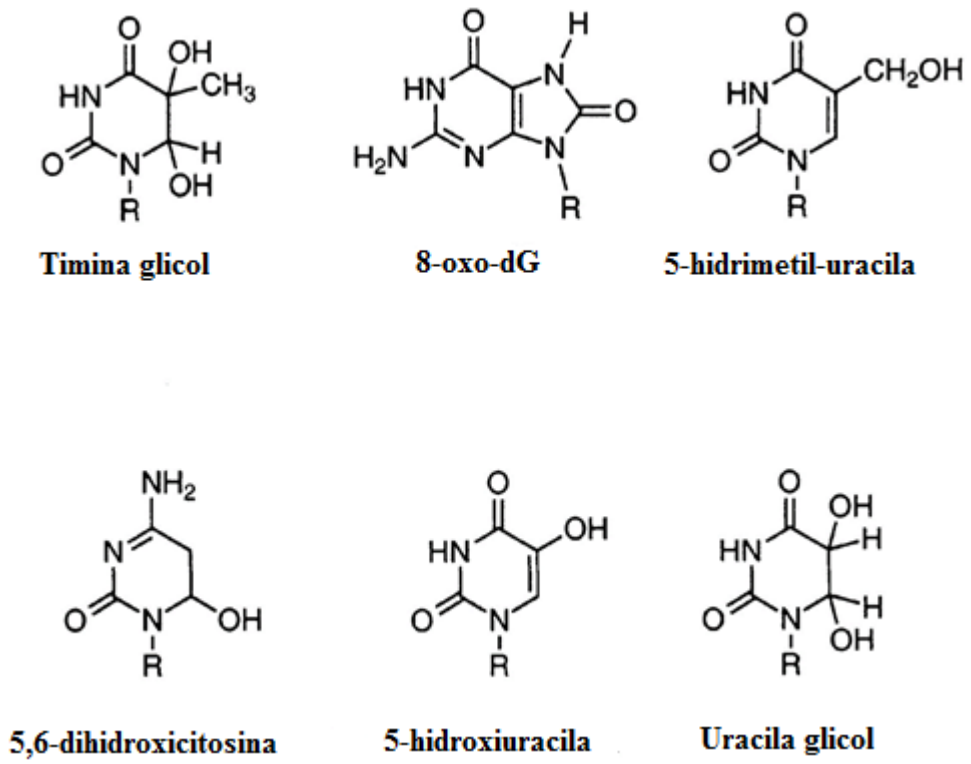
1.6.2.2. Oxidação do DNA

A modificação da estrutura química do ácido desoxirribonucleico (DNA) é bastante preocupante para a toxicologia e avaliação do risco da saúde humana.

As lesões oxidativas ao DNA são as principais fontes de mutações nos organismos vivos, com centenas delas identificadas nas bases purina, pirimidina, e estrutura da desoxirribose. A estimativa do dano oxidativo ao DNA em células humanas é de 10^4 lesões em cada célula por dia. Os danos causados pelos radicais livres incluem quebras das fitas simples ou duplas de DNA e as modificações das bases. Se esses danos ao DNA não forem reparados antes da replicação, pode ocorrer morte celular, mutação do DNA, erros de replicação, e instabilidade cromossômica (DIZDAROGLU, 2015; KLAUNIG; KAMENDULIS; HOCEVAR, 2010).

Estudos *in vitro* demostraram que PCBs podem gerar ROS e levar à formação de adutos de DNA. Ao serem biotransformados por enzimas microssomais, originam mono e di-hidroxi-metabólitos, sendo posteriormente metabolizados a quinonas. Os metabólitos de PCBs causam quebras na cadeia de DNA e outras lesões oxidativas ao DNA, como a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) (figura 5) (ROBERTSON et al., 2008). A lesão oxidativa de DNA mais estudada é a 8-oxodG, que é mutagênica em células bacterianas e de mamíferos. Os seus níveis são elevados em vários tipos de tumores em humanos e modelos animais (KLAUNIG et al., 2010). Os congêneres de PCBs são mutagênicos, isto é, induzem mutações gênicas, quebras, perda cromossômica, e poliploidização em cultura de células (ROBERTSON; LUDEWIG, 2011).

Figura 5 - Alguns exemplos de bases oxidadas



Fonte: MARNETT (2000).

Há evidências de que PCBs com baixos níveis de cloro produzem ROS e causam estresse oxidativo intracelular. Em fígado de ratos, os congêneres de PCBs menos clorados ligaram-se covalentemente a proteínas e DNA. Entretanto, estudos in vitro demostraram que PCBs não causam efeitos genotóxicos em *Salmonella typhimurium* ou células V79 de hamster chinês (ROBERTSON; LUDEWIG, 2011).

Vários efeitos genotóxicos, como adutos de DNA, quebras de DNA, aberrações cromossômicas e trocas entre cromátides irmãs podem ser observados em organismos expostos a diversos poluentes. Diversos ensaios têm sido utilizados com sucesso na deteção dos efeitos genotóxicos em organismos vivos (MOHANTY et al., 2011). De acordo com a Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR), vários estudos investigaram efeitos genotóxicos de PCBs em ratos após uma exposição aguda. Doses únicas de 5,0 mg/kg de Aroclor 1242 administrado por gavagem não induziram alterações cromossômicas em células espermatogonia ou da medula de ratos (ATSDR, 2000).

Há poucos dados sobre danos ao DNA nuclear de espermatozoides humanos, mas a principal lesão detectada em espermatozóides humanos é a 8-oxodG (AITKEN, ROBERT J; CURRY, 2011).

1.6.3. Adutos de DNA e PCBs

Os PCBs podem ligar-se covalentemente às macromoléculas celulares como DNA, RNA e proteínas. A etapa inicial da biotransformação de PCBs envolve o citocromo P450 que pode mediar a oxidação para os intermediários óxido de areno, dihidrodióis, catecois e hidroquinonas. Semiquinonas e quinonas oriundas da biotransformação de hidroquinonas e catecois podem se ligar covalentemente ao DNA. Além disso, subsequentes ciclos redox entre semiquinonas e quinonas podem ser acompanhados pela formação de espécies reativas de oxigênio causando danos oxidativos ao DNA (SCHILDERMAN et al., 2000).

Estudos anteriores indicaram que o óxido de areno e os metabólitos de PCBs tem sido responsáveis pela formação de adutos de DNA (PEREG; ROBERTSON; GUPTA, 2002). Em outro estudo foi verificado que a exposição à quinona de PCB induz danos ao DNA, tendo como resultados elevados níveis de 8-oxodG e histona H2AX fosforilada (γ-H2AX) (DONG et al., 2015).

1.7. Alterações epigenéticas induzidas por PCBs

Compostos ambientais não genotóxicos de natureza física, química ou social podem atuar em mecanismos epigenéticos (STEFANSKA; VINKEN; SZYF, 2012). A epigenética refere-se ao aparato molecular em torno do genoma capaz de modificar a expressão dos genes sem alterar a sequência das bases de DNA. Fazem parte do epigenoma, as modificações pós-traducionais de histonas, a metilação do DNA e os microRNAs(JENG, 2014; VEGA et al., 2012).

Em histonas, os resíduos de aminoácidos específicos localizados na região N-terminal podem ser modificados por acetilação ou metilação. As modificações de histonas melhor estudadas incluem acetilação de lisinas; mono, di ou trimetilação de lisinas; e mono ou dimetilação de argininas. A acetilação específica do resíduo de lisina é realizada por histonas acetil transferases, que pode resultar na expansão da cromatina e transcrição gênica. Por outro

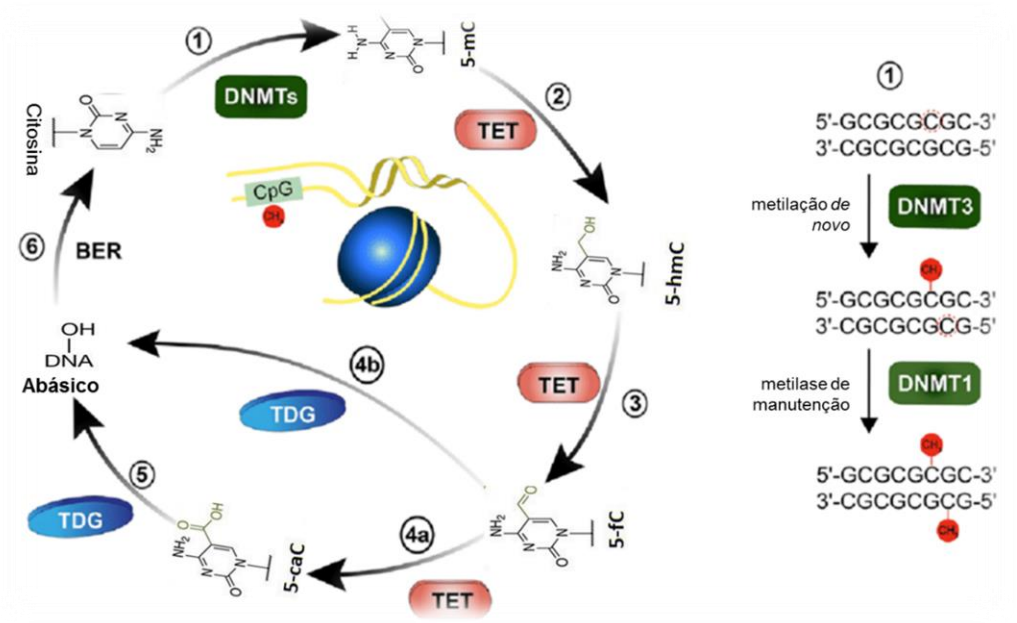
lado, histonas desacetilases removem os grupos acetil levando à condensação da cromatina e a regiões transcricionalmente inativas (SCHAGDARSURENGIN; PARADOWSKA; STEGER, 2012).

A metilação do DNA é a modificação epigenética melhor caracterizada. O mecanismo de metilação consiste na adição do grupo metil (CH_3) ao carbono 5 da citosina que precede uma guanina (dinucleotídeo CpG), catalisada pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), que utilizam S-adenosil-metionina como o doador do grupo metil (figura 6) (ALURU; KARCHNER; HAHN, 2011; DE OLIVEIRA, J. C., 2012). A metilação do DNA está envolvida na regulação de diversos processos celulares, incluindo a inativação do cromossomo X, *imprinting* gênico, estabilidade cromossômica, e a transcrição de genes. A metilação das ilhas CpG localizadas em regiões promotoras de genes é associada com a inativação da transcrição (silenciamento). Foi observada a metilação aberrante de novo de ilhas CpG e silenciamento de genes supressores tumorais em vários tipos de câncer humano. A expressão do receptor de hidrocarboneto aromático pode ser regulada por alterações na metilação da região promotora do gene (ALURU et al., 2011; STEFANSKA et al., 2012).

Proteínas da família “Ten Eleven Translocation” (TET1, TET2, TET 3) catalisam a oxidação de 5-metilcitosina (5mC) para 5-hidroximetilcitosina (5hmC) e, na sequência, para 5-formilcitosina (5fC) e 5-carboxicitosina (5caC) (figura 6) (SCHÜBELER, 2015). Os perfis de 5-hmC são alterados em câncer nos humanos, e representam um passo importante na via de desmetilação do DNA (WEISENBERGER; BROWN, 2016).

PCBs e outros poluentes orgânicos persistentes têm sido associados às alterações das vias epigenéticas, tanto em estudos experimentais como epidemiológicos (BACCARELLI; BOLLATI, 2009). Os estrógenos são hormônios primitivos amplamente distribuídos entre os organismos (ZHANG, X.; HO, 2011).

Figura 6 - Metilação do DNA. Reação reversível envolvendo metilação e desmetilação. As etapas incluem: (1) A enzima de novo DNA metiltransferase (DNMT3) transfere o grupo metil para o carbono 5 da citosina (C) originando 5-mC. A metilase de manutenção (DNMT1) metila o DNA hemimetilado. (2) A enzima TET inicialmente converte 5-mC à 5-hidroximetilcitosina (5-hmC). (3) posteriormente, a enzima TET converte 5-hmC em 5-formil-citosina (5-fC). (4) A enzima TET converte ainda 5-fC em 5-carboxil-citosina (5-caC). Timina DNA glicosidase (TDG) quebra a ligação glicosídica de 5-fC (4b) ou 5-caC (5), gerando um sitio abásico. (6) A via de reparo por excisão de base (BER) inclui a remoção do sítio abásico e a substituição do nucleotídeo.



Adaptado de BAYRAKTAR e KREUTZ (2017).

Os disruptores endócrinos (EDS) podem levar a efeitos epigenéticos, alterando uma grande variedade de funções celulares e fisiológicas. Vários xenobióticos foram relacionados com a ativação anormal da cromatina ou inativação de genes específicos. As modificações na programação epigenética induzidas pelos EDS podem ter papel importante no aumento da incidência de câncer dos testículos. A interação entre EDS, epigenética e câncer é destacada pelo fato de vários estudos terem demonstrado um perfil epigenético modificado em células tumorais, comparando-se com as células normais. Foi verificado que as células tumorais apresentam um padrão epigenético semelhante às células tronco espermatogoniais indiferenciadas (VEGA et al., 2012).

Walker e colaboradores investigaram os efeitos transgeracionais de PCBs no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Os seus resultados demostraram que PCBs interferem nas vias que regulam os níveis de metilação de DNA em rato. Por fim, vários estudos apontaram

que os PCBs podem ter efeitos a longo prazo na expressão de genes, após exposição no período perinatal, e sugerem que mecanismos epigenéticos podem estar envolvidos nos efeitos persistentes de exposição a PCBs (DE OLIVEIRA, J. C., 2012; WALKER; GORE, 2011).

Estudos feitos na progênie de ratas expostas a altas doses da mistura constituída por PCBs, dibenzodioxinas e dibenzofuranos encontrados em leite materno mostraram diminuição significativa da expressão do mRNA de DNMT1 no fígado e cérebro desse animais (DESAULNIERS et al., 2009).

1.8. Disfunção mitocondrial induzida por PCBs

As mitocôndrias constituem um importante alvo de ação primária ou secundária de xenobióticos e são responsáveis por diversas funções na célula (CAITO; ASCHNER, 2015). Elas desempenham papel fundamental na homeostase metabólica, incluindo a produção de energia (SHAUGHNESSY et al., 2014).

A mitocôndria é constituída por um sistema de membranas, no qual a matriz mitocondrial é contida pela membrana interna, e a membrana externa é separada da membrana interna pelo espaço intermembranas. As bicamadas lipídicas e proteicas e um complexo de proteínas transportadoras diferenciam as membranas interna e externa nas suas estruturas. A matriz mitocondrial contem DNA, ribossomos e enzimas envolvidas no ciclo de Krebs. O espaço intermembranas contem enzimas de vias de sinalização responsáveis pelo enovelamento e conformação de proteínas necessárias para a função respiratória. As membranas mitocondriais são ricas em cardiolipina e a sua integridade é importante para a eficiência da fosforilação oxidativa. O aumento dos níveis de ROS pode estar relacionado com a disfunção mitocondrial (ALY, H. A.; DOMÈNECH, 2009a; CAITOSAMUEL, 2015).

Segundo Aly et. al (2009b), as mitocôndrias são as principais fontes de ROS causadoras das lesões oxidativas em células de mamíferos. Cerca de 1-2% do oxigênio consumido pelas mitocôndrias é convertido em espécies reativas (ALY, H. A.; DOMÈNECH, 2009b). Essas organelas produzem ATP por meio da fosforilação oxidativa e regulam a síntese de esteróides, pirimidinas, heme, e agrupamentos de ferro-enxofre (Fe-S). Desempenham funções críticas na regulação homeostática de cálcio, cobre, manganês e ferro, gerando espécies reativas que podem ser citotóxicas, funcionando como via de sinalização celular. Exposições a xenobióticos podem resultar no recrutamento de moléculas, liberação de proteínas e substâncias

químicas que ativam a apoptose ou necrose (ALY, H. A.; DOMÈNECH, 2009b; CAITOSAMUEL, 2015). O ion cálcio pode ser um efetor fisiológico e patológico da função mitocondrial que modula a geração de ROS (BROOKES et al., 2004).

A disfunção das mitocôndrias está associada a algumas doenças, tais como câncer, doenças neurodegenerativas e diabetes tipo 2. As proteínas mitocondriais e o DNA mitocondrial (mtDNA) são vulneráveis aos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) (SHAUGHNESSY et al., 2014). A mitocôndria tem um papel importante em todas as vias bioquímicas, porém, no processo da espermatogênese, a motilidade espermática está fortemente relacionada à produção de ATP através da fosforilação oxidativa. No genoma mitocondrial existem algumas mutações que podem estar relacionadas a uma grande variedade de patologias (SAEEIDI, 2014).

Segundo BANUDEVI et al. (2006), estudos anteriores relataram que Aroclor 1242 inibe a atividade total ATPásica em fígado, rim e cérebro, inibe a fase 3 da respiração mitocondrial, interfere no desacoplamento da fosforilação oxidativa e no sequestro de cálcio em mitocôndrias de fígado de rato (BANUDEVI et al., 2006).

É cada vez mais enfatizado que as membranas celulares são sítios propícios para a ação dos xenobióticos. Reações entre PCBs e as biomembranas ocorrem devido às suas propriedades lipofílicas. Nas mitocôndrias, a produção de energia ocorre na membrana mitocondrial interna, com o fornecimento de mais de 95% de ATP por meio da fosforilação oxidativa (NISHIHARA; UTSUMI, 1985). Estudos demostraram que PCBs podem causar danos mitocondriais e induzir a citotoxidade em células renais de macaco verde Africano, modelo *in vitro* utilizado para estudar as ações dos congêneres de PCBs em células e mitocôndrias (SHEN et al., 2011).

PCBs e metabólitos quinonas de PCBs são potencialmente capazes de alterar a transferência de elétrons na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria. Isto leva a supor que as mitocôndrias das células epiteliais expostas aos PCBs podem ser importantes fontes de ROS. Os PCBs aumentam a geração de radical superóxido pelas mitocôndrias, inibindo o crescimento e induzindo a morte de células humanas de mama (MCF-10A) e epiteliais da próstata (RWPE-1) não malignas. Estes compostos provocam aumento da atividade da superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD) e CuZnSOD (ZHU, Y. et al., 2009).

1.9. Avaliação do risco

As avaliações do risco dos PCBs podem ser abordadas por pelo menos duas vias diferentes. A primeira via é fundamentada na avaliação de risco da exposição às misturas de PCBs utilizando dados de estudos em humanos e animais de experimentação, podendo ser avaliados vários *"endpoints"*, por exemplo imunotoxicidade, câncer, efeitos comportamentais e de desenvolvimento em humanos e animais. A segunda via baseia-se na avalição de risco a partir da exposição a congêneres individuais de PCBs empregando dados de estudos apenas em animais de experimentação. A toxicidade dos PCBs é provavelmente mediada pelas interações com receptores Ah, que são potentes indutores de isoenzimas do citocromo P450 (AHLBORG; HANBERG; KENNE, 1992).

O processo da avaliação do risco envolve quatro etapas que permitem o estudo comparativo entre os agentes de risco, diferentes populações e diferentes tempos de exposições. A primeira etapa, identificação do perigo, determina se um determinado produto químico está associado a determinados efeitos sobre a saúde. A segunda etapa denominada avaliação dose-resposta, baseia-se na determinação da relação entre a magnitude da exposição e a probabilidade de ocorrência dos efeitos à saúde. A terceira etapa, análise de exposição, tem por objetivo a determinação da extensão da exposição humana antes ou após a aplicação dos controles regulatórios. A última etapa, a caracterização dos riscos, envolve a descrição da natureza, a magnitude do risco humano, incluindo a incerteza do atendente (NRC, 1983).

1.9.1 Modelagem dose-resposta na caraterização do risco

Os métodos existentes para estimar o "*threshold"* (limiar) da toxicidade e estabelecer a modelagem dose-resposta incluem a abordagem em que não são encontrados efeitos adversos, o NOAEL (nível de efeito adverso não observável); o LOAEL (menor dose na qual são observados efeitos adversos); e a dose de referência (RfD) ou dose padrão (*Benchmark Dose*, BMD) (ROBERTS; JAMES; WILLIAMS, 2014; WATKINS, 2009). A RfD é uma estimativa de exposição diária, que provavelmente durante toda a vida não terá efeitos adversos apreciáveis. A RfD é calculada dividindo o NOAEL ou LOAEL, que normalmente são derivados da exposição a compostos como Aroclor (PCBs) na dieta, por fatores de correção (ou incerteza). RfDs são derivados de várias respostas tóxicas ou *endpoints* para o período de exposição. Os

fatores de incerteza são usados para compensar as deficiências de modelos experimentais e a significância e sensibilidade dos *endpoints* (GIESY; KANNAN, 1998). A BMD é usada como uma alternativa ao valor de NOAEL para cálculos de dose de referência (KLAASSEN; WATKINS III, 2009).

1.9.1.1 A abordagem de NOAEL

O NOAEL é definido para cada efeito ou *endpoint*, visando identificar o mais alto nível da dose experimental em que não são detectados efeitos, usando testes estatísticos para comparar cada grupo de dose com o grupo controle. O seu valor depende da seleção dos níveis de doses utilizados e da capacidade de detectar efeitos adversos. No entanto, estudos com tamanhos amostrais pequenos e métodos insensíveis são capazes de detectar efeitos em doses mais altas, resultando em maiores níveis de NOAEL. Caso haja um efeito estatisticamente significativo em todos os níveis de doses, a menor dose utilizada no estudo geralmente é selecionada como o LOAEL (HARDY et al., 2017).

1.9.1.2 A abordagem de BMD

A BMD é uma ferramenta estatística usada para determinar uma exposição tolerável a uma substância tóxica, e é estimada a partir da dose mais baixa que pode causar um efeito adverso. O cálculo é realizado ajustando um modelo matemático de dose-resposta a dados experimentais ou epidemiológicos. No modelo BMD, um limite inferior estatístico (BMDL) é usado como ponto de partida (POD) para definir uma exposição tolerável (KENNYP, 2002).

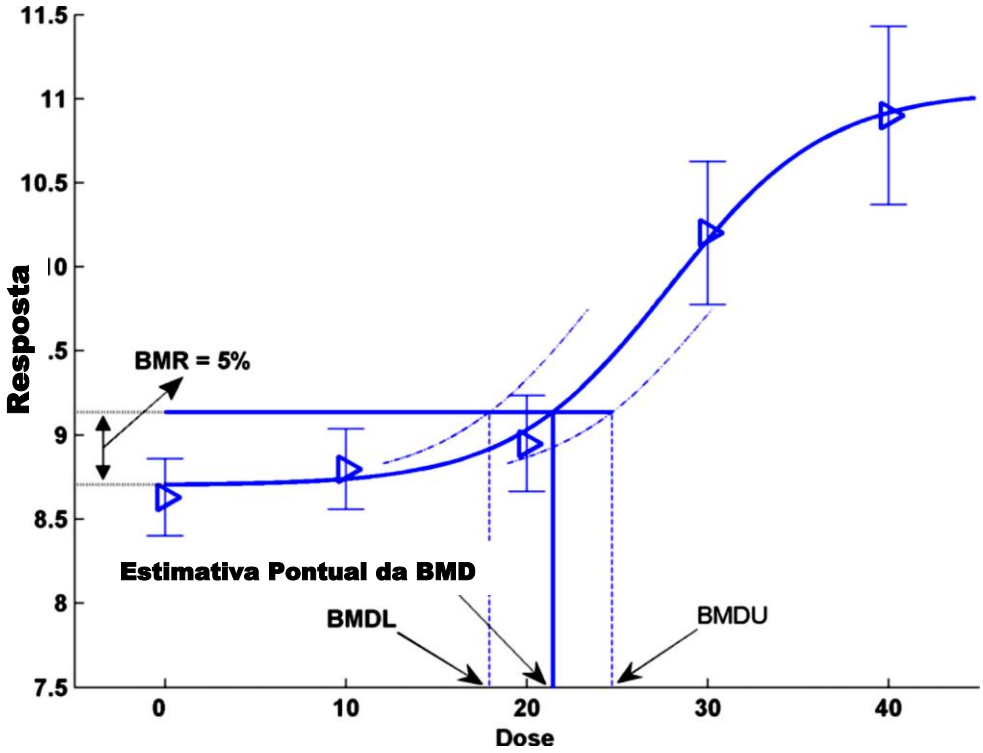
O conceito de BMD permite a quantificação das incertezas no conjunto de dados da relação dose-resposta. Atualmente, a análise de BMD tem sido utilizada como uma alternativa nas avaliações de riscos e assume que a relação existente entre exposição e efeito adverso é contínua. A abordagem BMD se inicia pela identificação de um critério para efeito adverso. Adicionando, BMD é definida como o nível de exposição que aumentará o risco abaixo do valor de *"cutoff"* por uma quantidade pré-especificada de 5% a 10% ou 5% a 15%. Este aumento é referido como uma resposta de *Benchmark* (BMR) (JACOBSON et al., 2002).

Os principais conceitos na abordagem de BMD estão apresentados na figura 7, em que é demostrado um BMDL calculado para um BMR de 5%. A interpretação de BMDL05 corresponde à dose em que a mudança de resposta pode ser menor do que 5%, com nível de confiança estatística de 95% (HARDY et al., 2017).

Segundo HARDY et al (2017), a abordagem da margem de exposição (MOE) poderia ser mais adequada na avaliação de risco de substâncias que são genotóxicas e cancerígenas. Eles propuseram usar o BDML10 como o POD, ou seja, o BMDL10 deve constituir o numerador do MOE (HARDY et al., 2017). Para análises de dados, o software de BMD mais conhecido é o software de *benchmark dose* (BMDS) desenvolvido pela US EPA (www.epa.gov/bmds) e o software PROAST desenvolvido pela RIVM (www.rivm.nl/proast). Quando os mesmos modelos são ajustados aos mesmos dados usando as mesmas hipóteses, o BMDS e PROAST levarão à mesma resposta (possivelmente com pequenas diferenças numéricas). A modelagem de *benchmark* é representado no BMDS por BMD, BMDL, BMDU e BMR; enquanto no PROAST software é apresentado por CED (efeito crítico da dose), CES (tamanho do efeito crítico); CEDL e CEDU, limite inferior e superior do intervalo de confiança de 90% para o CED (HARDY et al., 2017).

A abordagem de BMD pode ser aplicada a cada *endpoint* considerado nos estudos. O efeito crítico pode então ser selecionado numa forma análoga à da abordagem do NOAEL, na qual a decisão de aceitar um conjunto de dados para derivar um NOAEL como potencial POD é importante. Dados pobres ou limitados como por exemplo a alta variabilidade dentro do grupo controle, alto limite de deteção de métodos quantitativos, tamanhos amostrais pequenos, tenderão a resultar em altos níveis de NOAEL. Em contradição, a abordagem BMD fornece uma avaliação quantitativa formal da qualidade dos dados, tendo em conta todos os aspectos específicos dos dados (EUROPEAN FOOD SAFETY, 2009).

Figura 7. Principais Conceitos para a abordagem de BMD usando dados contínuos.



As respostas das médias observadas (triângulos) são plotadas, juntamente com seus intervalos de confiança. A curva sólida representa a modelagem dose-resposta ajustada, que determina a estimativa pontual da BMD, geralmente definida como uma dose baixa que corresponde a uma mudança na resposta, denotado de resposta de benchmark (BMR). As curvas tracejadas representam os limites de confiança superior e inferior de 95% para o tamanho do efeito em função da dose. As suas intersecções com a linha horizontal estão nos limites inferior e superior da BMD, denotadas BMDL e BMDU, respectivamente. O BMR é definido como uma alteração da resposta com base prevista pelo modelo ajustado. A curva ajustada produz uma resposta de base (background) estimada de 8,7, e um aumento de 5% é igual a 9,14. Assim, a BMD05 de 21.50 é obtida a partir da interseção da linha horizontal correspondente à resposta de 9,14, com o modelo de dose-resposta ajustado. Neste exemplo, o BMDL05 tem um valor de 18.

Fonte: HARDY et al. (2017)

1.10. Justificativa

Diversos estudos têm demonstrado que os PCBs causam diversos efeitos adversos à saúde humana e animal. Esses poluentes lipossolúveis, por não se dissolverem na água, acumulam-se nos organismos que nela vivem. A sua resistência à biodegradação e a elevada lipofilicidade, aliadas a uma baixa toxicidade em pequenas concentrações, favorecem seu acúmulo em altas concentrações nos seres vivos. Entretanto, alguns dos estudos foram inconclusivos e têm falhado em mostrar uma ligação entre a exposição a PCBs e o desenvolvimento de doenças, basicamente porque estudos epidemiológicos têm limitações que

afetam a sua capacidade de encontrar relações causais entre exposição e o desenvolvimento de doenças. Essas limitações são devidas, principalmente, a poucos indivíduos envolvidos nos estudos, na dificuldade de determinação dos níveis de exposição, e múltiplos fatores de confusão como fumar, beber, e exposição a outros contaminantes. Estudos em humanos sugerem que os PCBs tenham efeitos tanto carcinogênicos como não carcinogênicos. Consequentemente, a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA EUA) classifica os PCBs como prováveis carcinógenos humanos de risco carcinogênico moderado (EPA, 2013; KRUMM, 2002; MAJDIC; SAUNDERS, 1998).

Animais expostos aos PCBs sofrem efeitos reprodutivos sérios e permanentes, como prolongamento da menstruação e diminuição da fertilidade, concepção, e taxas de esperma. Além disso, os PCBs podem chegar ao feto atravessando a placenta e também podem ser transferidos para o recém-nascido via leite materno. Estudos sobre os efeitos de PCBs no sistema reprodutivo masculino permanecem inconclusivos. Alguns estudos com homens expostos aos PCBs ocupacionalmente não indicaram problemas de fertilidade, enquanto outros mostraram uma associação entre baixa contagem de espermatozóides e altos níveis de PCBs no sangue (EPA, 2013; KRUMM, 2002; MAJDIC; SAUNDERS, 1998).

Em países altamente poluídos com desreguladores endócrinos foi verificada uma alta incidência de endometriose (NICOLOPOULOU-STAMATI; PITSOS, 2001). Em Cabo Verde foi elaborado o Plano de Ação Nacional para Implementação da Convenção de Estocolmo sobre POPs, que visa a diminuição dos riscos à saúde pela exposição a substâncias químicas nocivas, o que promove também a redução de custo no setor de saúde, pertinente aos gastos destinados a tratamentos médicos e na segurança alimentar. Vários países têm investido em ações que consistem na redução ou eliminação dos riscos causados por POPs, tais como os PCBs, dioxinas e furanos(FAOLEX, 2011).

De acordo com (LANGER, 2008), os PCBs estão presentes em concentração considerável no leite materno humano, especialmente nos países industrializados, e crianças sob aleitamento materno pertencem a um grupo de risco especial. Há também risco de exposição a PCBs no local de trabalho. Os trabalhadores podem inalar ou ter contato da pele com essas substâncias durante o reparo ou manutenção de rotina de equipamentos mais antigos, transformadores elétricos e durante acidentes ou derrames. Exposição também pode ocorrer durante o descarte de materiais que contenham PCBs em depósitos de resíduos perigosos (SERVICES, 2001).

Distúrbios menstruais nas mulheres e alteração da morfologia e produção espermática são efeitos que resultam na dificuldade de um casal conceber, podendo estar associados à exposição a PCBs. Em geral, estudos dos parâmetros reprodutivos em humanos são limitados. No entanto, dados em humanos e animais indicam que PCBs oferecem risco para a reprodução nos seres humanos. Em muitos estudos foram encontrados níveis de PCBs e de compostos organoclorados elevados no sangue de mulheres que tiveram abortos repetidos. A toxicidade reprodutiva dos PCBs em fêmeas tem sido observada em várias espécies, sendo observada baixa taxa de implantação nos ratos adultos e/ou sua prole exposta durante a gestação e lactação, diminuição da concepção em camundongos, inibição reprodutiva parcial ou total nas martas, e diminuição da fertilidade em macacos (ATSDR, 2000).

A capacidade de PCBs em causar efeitos reprodutivos nos machos é menos clara do que nas fêmeas. Os resultados da contagem de espermatozóides, história de fertilidade, e exames testiculares foram normais em trabalhadores expostos ao Aroclor por vários anos. Contudo, análise do sêmen mostrou que concentrações crescentes de alguns congêneres individuais, mas não PCBs totais, foram associados com a diminuição da motilidade dos espermatozóides em homens inférteis (ATSDR, 2000).

Este projeto foi a continuidade do trabalho de mestrado, em que foram estudados os efeitos de Aroclor 1254 no sistema reprodutivo de camundongos machos. Alguns parâmetros usados, como modelo animal, substâncias administradas, tempo de exposição foram os mesmos usados anteriormente. No trabalho de mestrado foram testadas diferentes doses baixas de Aroclor 1254 e investigados seus efeitos na espermatogênese (CAI, J. et al., 2011).

2. OBJETIVOS

Investigar as possibilidades de Aroclor 1254 induzir alterações no metabolismo celular (intermediários da via glicolítica, ciclo de Krebs, aminoácidos, nucleotídeos), dano oxidativo (peroxidação lipídica e dano oxidativo em DNA nuclear e mitocondrial) e alterações de marcas epigenéticas (5-mC e 5-hmC) em DNA nuclear e mitocondrial de fígado, rim, testículo e espermatozoides de camundongos machos. Pretende-se contribuir para a elucidação de vias pelas quais os PCBs levam aos efeitos tóxicos, procurando por efeitos mais sensíveis para as avaliações de risco.

Objetivos específicos:

- Verificar no plasma, fígado, rim e testículos dos camundongos se há indução de estresse oxidativo, por meio da quantificação de MDA.
- Quantificar as lesões 8-oxodG e CEdG em DNA nuclear e mitocondrial de fígado, rim, testículo, para avaliação da genotoxicidade.
- Quantificar as marcas epigenéticas 5-mC e 5-hmC em DNA nuclear e mitocondrial de fígado, rim, testículo e espermatozóides, para avaliação de alterações epigenéticas.
- Quantificar metabólitos intermediários do metabolismo celular (intermediários da via glicolítica, ciclo de Krebs, aminoácidos, nucleotídeos) em fígado, rim e testículo.
- Calcular a *Benchmark Dose* (BMD) para os parâmetros analisados, comparando aos níveis de NOAEL e LOAEL obtidos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes

A mistura de bifenilas policloradas (Aroclor 1254) foi obtida da Sigma-Aldrich (Sigma - Aldrich, Co, EUA). A solução de Aroclor 1254 foi diluída em óleo de milho (NAVILLE et al., 2013) e foram gerados estoques para as administrações nas doses de 5, 50, 500, 1000 µg/kg. A seleção da dose de referência oral para exposição subcrônica ao Aroclor 1254 foi baseada nos documentos de orientação da EPA localizados no site da IRIS (https://rais.ornl.gov/tox/profiles/aroclor_1254_f_V1.html). Foram escolhidas diferentes doses de Aroclor 1254 para obtenção de curva dose-efeito para os parâmetros avaliados. Quetamina e xilazina (BAKER et al., 2013) foram utilizadas como anestésicos. Uma dose de xilazina (10 a 15 mg/Kg) / quetamina (100 a 150 mg/Kg) foi preparada na mesma seringa, e administrada na proporção de 2/1 pela via intraperitoneal nos camundongos. Todas as substâncias empregadas neste trabalho foram do mais alto grau de pureza disponível comercialmente. Etanol, metanol, acetonitrila e isopropanol, todos com grau de pureza HPLC, foram obtidos da empresa Carlo Erba Reagentes (Milão, Itália). Os *kits* para a extração de DNA (Gentra Puregene® Kit) foram fornecidos pela empresa QIAGEN (Hilden, Alemanha). O reagente de Bradford foi adquirido da BioRad (Hercules, EUA). Todos os outros reagentes usados foram provenientes da empresa Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, EUA). A agua utilizada foi deionizada em um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA).

3.2 Equipamentos

3.2.1 Equipamentos básicos

Para a realização dos procedimentos experimentais foram utilizados os equipamentos listados abaixo:

Microcentrífuga (modelo Mikro 120, marca Hettich, Alemanha), centrífuga (modelo 5702R, marca Eppendorf, Alemanha), centrífuga (modelo 5810R, marca Eppendorf, Alemanha), balança semi-analítica (modelo FA210N, marca Bioprecisa, Japão), balança analítica (modelo AT261-DeltaRange, marca Mettler Toledo, EUA), incubadora com controle de temperatura e agitação (modelo Vortemp 56, marca Labnet, EUA), agitador de tubos (modelo AP56, marca Phoenix, Brasil), agitador magnético (modelo 78HW-1, marca Biomixer, Brasil), potenciômetro digital (modelo PHS-3B, marca PHTEK, Brasil), banho maria (modelo 245, marca Cientec, Brasil), Dispersor IKA ULTRA TURRAX T10 (Homogeneizador de tecidos), autoclave (modelo 415, marca Fanem, Brasil) e um sistema a vácuo para secagem das amostras, contendo uma bomba a vácuo de alto desempenho, um micromódulo a baixas temperaturas e um concentrador (modelo miVAC, marca Genevac, Inglaterra).

3.2.2 Espectrofotômetro

As leituras de absorbância dos experimentos foram realizadas no leitor de microplacas com uma faixa de comprimento de onda entre 190 a 880nm *SpectraMAx 190®* (Molecular Devices – Chicago, IL, USA). Os dados obtidos foram analisados pelo software *SoftMax Pro* versão 5.4.

3.2.3 HPLC – DAD

O equipamento da marca Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão) foi utilizado para a realização das análises por UV/VIS. O sistema HPLC-DAD contém duas bombas LC-20AT, um detector de arranjo de fotodiodos PDA-20AV, um autoinjetor (Proeminence SIL-20AC) e um forno para colunas (CTO-10AS/VP) controlado por um módulo de comunicação CBM-20A. Os dados foram processados pelo software LC-Solution 1.21 (Shimadzu, Japão). As condições cromatográficas empregadas estão descritas no decorrer do texto.

3.2.4 Espectrometria de massas

As quantificações dos analitos das amostras por Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray (ESI-MS/MS) foram realizadas utilizando-se os espectrômetros de

massas disponibilizados pelo Prof. Paolo Di Mascio e Profa. Marisa H. G. Medeiros (IQUSP). A ionização das moléculas de interesse ocorreu tanto em modo positivo como negativo. O equipamento utilizado tem a seguinte descrição:

ESI-MS/MS – Sistema de HPLC da Agilent série 1200 (Wilmington, EUA) equipado com uma bomba binária (Agilent 1200 G1312B), uma bomba isocrática (Agilent 1200 G1310A), um forno para coluna (Agilent 1200 G1316B), um detector de absorbância de arranjo de diodos (Agilent 1200 DAD G1315C) e um injetor automático (G1367C Agilent 1200). O sistema de HPLC é integrado a um espectrômetro de massas Linear Quadrupole Ion Trap modelo 4000 QTRAP da empresa Applied Biosystems/MDS Sciex Instruments (Foster City, EUA). Os dados foram processados utilizando o *software* Analyst 1.6 (Applied Biosystems, EUA).

3.3. Animais e Exposição ao Aroclor 1254

Neste trabalho foram seguidos todos os procedimentos experimentais e recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química da Universidade de São Paulo. As manipulações dos animais foram baseadas no estatuto do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, protocolo número 369 de 06/09/12). Os camundongos machos C57 (50 animais) com 2 meses de vida e pesando 25-40g, parâmetros que representam a maturidade sexual do animal (CAI, J. et al., 2013; CAI, J. et al., 2011), foram utilizados neste estudo para avaliação dos efeitos da exposição *in vivo* ao Aroclor 1254.

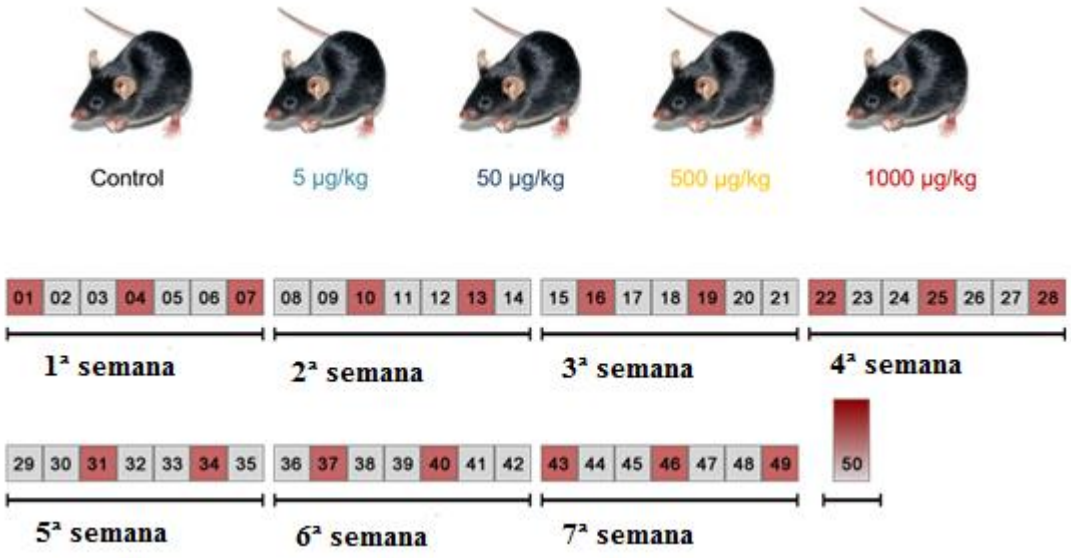
De acordo com a tabela 4 e figura 8, os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais (n = 9 a 11 por grupo). Foi feita a administração de PCBs (5, 50, 500, 1000 μg/kg) por gavagem a cada 3 dias (CAI, J. et al., 2013). Os camundongos do grupo controle receberam um volume igual do veículo.

Tabela 4 - Divisão dos animais por grupo de exposição ao aroclor 1254 durante 50 dias (17 administrações)

Grupo	**Aroclor 1245 (**μg/kg)	**Número de camundongos**
Controle	_____	10
Grupo 2	5	9
Grupo 3	50	11
Grupo 4	500	10
Grupo 5	1000	10

Durante o período de administração os animais foram acomodados em gaiolas pequenas de polipropileno contendo tampa aramada para apoiar o bebedouro e a ração *ad libitum.* As condições ambientais das salas foram padronizadas numa temperatura de 22±2ºC, umidade 55±10%, 15 a 20 trocas de ar por hora, iluminação com lâmpadas fluorescentes com fotoperíodo de 12 horas claro /12 horas escuro, controlado por um temporizador digital. As caixas foram trocadas duas vezes por semana e a disponibilidade de água e ração checada diariamente.

Figura 8 - Modelo de 50 dias de exposição ao Aroclor 1254 por gavagem. Protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo CEUA nº 434) no dia 11/10/2013.



3.4. Eutanásia e coleta de amostras

Após 50 dias de exposição, os animais foram anestesiados com uma solução de cloridrato de quetamina e xilazina, por via intra-peritoneal (xilazina 10 a 15 mg/Kg + 100 a 150 mg/Kg quetamina misturadas na mesma seringa, 2-3 mL, 1 administração). Foi realizada a coleta de sangue por punção cardíaca, a cavidade peritoneal aberta e consequente eutanásia por exsanguinação. Em seguida foi feita a coleta dos testículos, epidídimo para obtenção de espermatozoides, e os outros órgãos (figado, rim, pulmao, baço). As amostras foram congeladas a -80ºC para as extrações de DNA, RNA e proteínas. Testículos direitos de cada 3 animais dos grupos controle e expostos foram fixados em álcool 70 % para posterior análise histológica.

3.4.1. Biometria do testículo, fígado, rim e massa corporal

Após a eutanásia, as gônadas foram retiradas e pesadas individualmente. Para determinar a massa do testículo, fígado e rim, foram calculados o índice gonadossomático (IGS), índice hepatossomático (IHS) e o peso relativo do rim. Os pesos relativos das vísceras foram calculados a partir da seguinte fórmula PG/PC x 100, onde PG = peso total das gônadas e PC = peso corporal. O IGS representa a proporção (%) do peso corporal alocado em testículo. O índice hepatossomático (IHS) representa a proporção (%) do peso corporal alocado em fígado, sendo PF (peso do figado) e PC (peso corporal). A densidade desses órgãos em mamiferos é em torno de 1, sendo a massa considerada igual ao seu peso. Foi usado o mesmo procedimento para calcular a massa relativa do rim (QUEROL; QUEROL; GOMES, 2002).

3.4.2 Coleta de espermatozoides

O epidídimo e ducto deferente dos camundongos foram dissecados, colocados numa placa de Petri cotendo 1 mL PBS, cortados em pequenos pedaços com uma lâmina de bisturi, e deixados 30 minutos à temperatura de 37ºC, permitindo assim a difusão de esperma para o meio. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos de microcentrifuga e deixadas sedimentar por um período de 30 minutos a 37ºC. O sobrenadante de cada amostra foi transferido cuidadosamente para outro tubo, e este procedimento foi repetido por 3 vezes. O sobrenadante final contendo a fração de espermatozoides móveis foi removido cuidadosamente

e centrifugado a 6000 *g* durante 10 minutos para sedimentar os espermatozoides (STOUDER; PAOLONI-GIACOBINO, 2010).

3.4.3 Espermograma

Para a contagem de espermatozoides foi utilizada uma alíquota do sobrenadante contendo a fração móvel de espermatozoides, que foi diluída 20 vezes e transferida para câmara de Newbauer. A concentração foi calculada utilizando a seguinte fórmula: média aritmética do número de espermatozoides x fator de diluição x 10^4 (STOUDER; PAOLONI-GIACOBINO, 2011).

3.5 Quantificação de proteínas

A concentração total de proteínas foi determinada pelo método de Bradford. BSA foi diluído em água e utilizado como proteína padrão. Os pontos da curva padrão foram preparados em diferentes concentrações (0, 8, 10, 20, 40, 60, 70, 80 μg/mL), sendo feita a quantificação por espectrofotômetro UV-Vis. Os pontos da curva de BSA foram transferidos em duplicata sequencialmente para a placa de Elisa de 96 poços. As diluições das amostras foram realizadas na proporção de 1:500 (2 μL homogenato + 998 μL de H2O) e posteriormente transferidas em duplicatas para outros poços da placa de Elisa. Em seguida foram adicionados 40 μL de corante "Coomassie Brilliant Blue" BG-250 concentrado, homogeneizado com pipeta até ocorrer a mudança de cor e as leituras foram feitas por espectrofotometria em comprimento de onda de 595 nm.

3.6 Quantificação de MDA por HPLC/DAD

As determinações de MDA em plasma, fígado, rim e testículo foram utilizadas para avaliar a peroxidação lipídica. O método se baseia na reação de DNPH com MDA, formando o produto dosado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/DAD), como padronizado no laboratório (DE OLIVEIRA, A. A. F. et al., 2017) e descrito nos itens abaixo.

3.6.1. Derivatização de MDA

Alíquotas de 100 µL de plasma e sobrenadante dos homogenatos de fígado, rim, testículo (20 mg de tecido, homogeneizado em 200 µL de PBS e 29 µL de butil-hidroxitolueno 0,2%, v/v) foram hidrolisadas para liberação do MDA ligado a proteínas pela adição de 10 µL de NaOH 4 M, com subsequente incubação a 60 ºC por 30 min sob agitação a 100 rpm. Ao final da incubação, 150 µL de H_2SO_4 1% (v/v) foram adicionados e as amostras foram submetidas à vigorosa agitação por 20 segundos com posterior centrifugação a 9.300 *g* por 10 min. Após a centrifugação, 175 µL do sobrenadante foram coletados e incubados com 25 µL de uma solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH, 1 mg/mL em HCl 2M). A reação de derivatização ocorreu em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 min.

3.6.2. Quantificação de MDA por HPLC-DAD

Foram injetadas alíquotas de 5 µL no sistema de HPLC da Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão) descrito no item 3.2.3. A seguinte condição cromatográfica foi utilizada para as análises: uma coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com um gradiente de água (Solução A) e acetonitrila (Solução B), ambas suplementadas com ácido acético (0,2%; v/v), a 30 ºC, com fluxo de 1 mL/min (0 – 28 min, 20 – 100% de B; 28 – 30 min, 100 – 20% de B; 30 – 40 min, 20% de B). O detector de DAD foi fixado em 306 nm para o monitoramento do produto MDA-DNPH.

O software LC Solution foi utilizado para a integração e identificação dos analitos, comparando-se o tempo de retenção e espectro de absorbância com o da solução padrão.

3.7. Quantificação de metabólitos intermediários

A análise simultânea de metabólitos intermediários (α–cetoglutarato, fumarato, glutamina, glutamato, malato, lactato, succinato, piruvato, ATP, ADP, NAD^+, NADH, $NADP^+$, NADPH) foi realizada no sistema de HPLC–ESI–MS/MS descrito no item 3.2.4 de Material e Métodos. As preparações das amostras foram realizadas conforme descrito por Rahman et al.,

2014, com modificações. Aproximadamente 30 mg das amostras tecidual de fígado, rim e testículo foram homogeneizados em 500 µL de água deionizada, sob banho de gelo. Uma alíquota de 20 µL de homogeneizado foi utilizada para extração dos metabólitos intracelulares, conduzida com adição de 463,4 µL de uma solução de solvente de extração (40% acetonitrila, 40% metanol e 20% água) e 16,6 µL do padrão interno ([$^{13}C_{10}{}^{15}N_5$]ATP, 500 pmol). As amostras foram então homogeneizadas em vórtex e centrifugadas por 15 min a 20.000 g. Alíquotas de 450 µL foram transferidas para novos tubos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo para secagem completa a vácuo. As amostras foram então ressuspensas em 15 µL de H_2O e centrifugadas por 5 min a 16.000 *g*. Em seguida, foram injetados 3 µL no sistema HPLC–ESI–MS/MS.

As quantificações das amostras foram conduzidas com ionização por *electrospray* em modo negativo (ESI^-, $[M–H]^-$), utilizando-se os seguintes parâmetros otimizados: CUR, 18 psi; GS1, 60 psi; GS2, 50 psi; CAD, LOW; TEM, 600 ºC; EP, –10 V e IS, –4500 V. As fragmentações e energias utilizadas no monitoramento de múltiplas reações (MRM) são descritas na Tabela 5. As razões entre as áreas (metabólitos/$^{15}N_5$–$^{13}C_{10}$–ATP) foram utilizadas para quantificação. Curvas foram injetadas nos intervalos de 0,1 a 15 pmol de α–cetoglutarato e succinato; 0,1 a 100 pmol de NAD^+; 0,1 a 200 pmol de NADPH; 0,5 a 100 pmol de ADP e NADH; 25 a 400 pmol de ATP; 1 a 500 pmol de fumarato e malato; 5 a 1000 pmol de piruvato; 100 a 4000 pmol de lactato; 100 a 1500 pmol de glutamina e glutamato; todas corrigidas com 90 pmol de $^{13}C_{10}$–$^{15}N_5$–ATP no volume de injeção. Foi otimizada pelo grupo uma condição cromatográfica de par iônico para a separação dos analitos de interesse, como segue abaixo e descrito por OLIVEIRA et al., 2017.

Condição cromatográfica: uma coluna Luna C18(2) (150 x 2.0 mm i.d., 3.0 µm, 100A Phenomenex, Torrance, EUA) com uma pré–coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, EUA) foi eluída em gradiente por uma solução constituída de 0,1% de tributilamina, 0,03% ácido acético em água (Solução A) e 10 % da solução A em acetonitrila (Solução B), a 35 ºC, com fluxo de 175 µL/min (0 – 22 min, 10 – 100 % de B; 22 – 25 min, 100 % de B; 25 – 26 min, 100 – 10 % de B; 26 – 37 min, 10 % de B). A válvula de comutação de fluxo foi configurada para permitir a entrada de eluentes no espectrômetro de massas no intervalo de 1,5 – 18 min.

Tabela 5 - Fragmentações e energias usadas para a quantificação de metabólitos intracelulares em tecidos dos camundongos expostos ao Aroclor 1254.

Analito	Q1 (amu)	Q3 (amu)	Dwell Time (msec)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Lactato	89,1	43,0	50	–28	–20	–6
Piruvato	87,0	43,2	50	–28	–12	–6
Fumarato	115,0	71,0	50	–35	–15	–11
	115,0	59,0	50	–35	–15	–9
Succinato	116,9	72,9	50	–30	–16	–11
	116,9	98,9	50	–30	–16	–11
Malato	132,9	115,1	50	–35	–16	–3
	132,9	70,9	50	–35	–23	–3
α–cetoglutarato	144,9	101,0	50	–70	–12	–5
	144,9	57,0	50	–70	–17	–10
Glutamina	145,1	126,9	50	–45	–15	–10
	145,1	101,0	50	–45	–19	–9
Glutamato	145,9	128,1	50	–45	–17	–5
	145,9	102,0	50	–45	–19	–9
ADP	426,2	328,2	50	–80	–27	–6
	426,2	158,8	50	–80	–35	–6
	426,2	78,9	50	–80	–80	–13
ATP	506,2	158,9	50	–75	–48	–5
	506,2	78,9	50	–75	–120	–12
$[^{13}C_{10}{}^{15}N_5]$ATP	521,2	78,9	50	–75	–48	–5
NAD+	662,4	540,4	50	–40	–28	–5
	662,4	273,0	50	–40	–50	–5
	662,4	78,9	50	–40	–120	–5
NADH	664,5	408,2	50	–115	–44	–8
	664,5	273,0	50	–115	–53	–5
	664,5	78,9	50	–115	–120	–13
NADP+	742,3	620,3	50	–55	–25	–14
	742,3	408,1	50	–55	–49	–8
	742,3	78,9	50	–55	–120	–13
NADPH	744,0	408,1	50	–120	–51	–8
	744,0	158,8	50	–120	–78	–8
	744,0	78,9	50	–120	–130	–13

DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula.
Q1 e Q3: quadrupolos 1 e 3.

3.8 Extração de DNA nuclear e mitocondrial

A partir de homogenatos de fígado, rim e testículo foi extraído DNA utilizando-se Kit QUIAGEN®, com adaptações já padronizadas no laboratório (DE OLIVEIRA, A. A. F. et al., 2017). Para a extração de DNA mitocondrial e nuclear foram preparados homogenatos de 500 mg de tecido em 2,5 mL de tampão (Tris EDTA 10 mM, sacarose 250 mM, D-penicilamina 134 mM e desferoxamina 100 mM) em microtubo e depois transferidos para tubos de 15 mL. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 1000 *g* / 30 min e separado o sobrenadante para a obtenção do DNA mitocondrial. Da fração precipitada foi extraído o DNA nuclear.

3.8.1 Extração do DNA mitocondrial

Os sobrenadantes obtidos a partir dos homogenatos foram centrifugados a 10000 *g* por 15 min. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e adicionados 500 µL do tampão Tris EDTA (10 mM) gelado, suplementado com desferoxamina (130 mM) e D-penicilamina (134 mM). Após leve homogeneização em vortex, foram centrifugados a 1000 *g*/10 minutos (fígado) ou 10000 g/10 minutos (rim e testículo). Posteriormente foram descartados os sobrenadantes, e os *pellets* ressuspensos em 125 µL de tampão mitocondrial (glicose 50 mM, EDTA 10mM e Tris 25 mM) com adição de desferoxamina (0,5 mM) e D-penicilamina (10mM), e 250 µL SDS (1%) alcalino. As soluções foram neutralizadas com 40 µL (fígado) ou 27,5 µL (rim e testículo) NaOAc 3M em ácido acético 2M e centrifugadas a 10000 *g* por 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para microtubos e adicionados 20 µL da solução de proteinase K (20 mg/mL), seguida de uma incubação em banho maria durante 1 hora a 37 ºC. Após a incubaçao foram adicionados 20 µL da enzima RNAse A (15 – 20 mg/mL) e as amostras incubadas por 1 h a 37 ºC. Foram adicionados 250 µL (fígado) ou 200 µL (rim e testículo) da solução de precipitação de proteínas, as soluções agitadas vigorosamente no vortex e centrigugadas a 2000 *g* por 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de 15 mL e foram adionados 5 mL (fígado) ou 1 mL (rim e testículo) de isopropanol gelado, agitando levemente por 50 vezes para precipitação do DNA, e guardados a -20 ºC “ovenight”. As amostras foram então centrifugadas a 5000 *g* por 10 min, 4 °C, e o sobrenadante descartado. Para a lavagem do pellet foram adicionados 2 mL de etanol 70 %, seguido por centrifugação a 2000 *g* por 10 minutos, e

os sobrenadantes descartados. Os tubos permaneceram invertidos durante 30 min para a secagem do etanol. Os *pellets* de DNA foram ressupensos em 50 µL (fígado), 100 µL (testículo) e 150 µL (rim) de solução de desferoxamina/D-penicilamina (100 µM). A concentração de DNA nas soluções foi verificada pela intensidade de absorbância em λ = 260 nm, utilizando-se o equipamento nanodrop (software ND 1000) disponível no laboratório da Profa. Silvya Stuchi Maria Engler (FCFUSP).

3.8.2 Extração do DNA nuclear

Para a extração do DNA nuclear foram utilizados os pellets dos homogenatos de fígado centrifugados. Foram adicionados 10 mL do tampão A (320 mM sacarose, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris, 0,1 mM desferoxamina, 1% Triton X-100 em pH final de 7,5), as soluções agitadas vigorosamente para dissolver o pellet e centrifugadas a 1500 *g* por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e foram adicionados 5 mL da solução de lise de células (QUIAGEN) contendo desferoxamina (0,5 mM) e D-penicilamina (10 mM). As soluções foram homogenizadas em vortex até dissolver bem os pellets e suplementadas com 175 µL de SDS 10 %. Em seguida, os tubos foram agitados por inversão cerca de 20 vezes. Posteriormente foram adicionados 70 µL de proteinase K (20 mg/mL), os tubos agitados levemente no vortex e incubados em banho maria a 37 °C por 1 hora. Após a incubação, foram adicionados 20 µL de RNAse A e realizada nova incubação a 37 ºC por 1 hora. Foram então adicionados 2,5 mL da solução de precipitação de proteínas (QUIAGEN), as amostras agitadas vigorosamente no vortex e centrigugadas a 2000 *g* por 10 minutos. Em seguida os sobrenadantes foram transferidos para tubos de 50 mL. Por fim, foram adicionados 10 ml de isopropanol gelado, as soluções agitadas por inversão cerca de 30 vezes, e mantidas a -20 ºC "overnight" para precipitar o DNA. As amostras foram então centrifugadas a 2000 *g* por 10 min, 4 °C, e o sobrenadante descartado. Para a lavagem do DNA, foram adicionados 2 mL de etanol 70% gelado, com posterior centrifugação a 2000 *g* / 10 minutos, o sobrenadante descartado e os tubos invertidos durante 30 min para a secagem do pellet. A ressupensão foi feita com 150 µL (fígado e rim) ou 100 µL (testículo) da solução de desferroxamina (100 µM) contendo 10 mM de D-penicilamina, as soluções transferidas para microtubos e guardadas a –20 °C. A concentração de DNA nas soluções foi verificada pela intensidade de absorbância em λ = 260 nm, utilizando-se o equipamento nanodrop (software ND 1000) disponível no laboratório da Profa. Silvya Stuchi Maria Engler (FCFUSP).

3.8.3 Extração do DNA total de espermatozoides

Foi utilizado o Kit QUIAGEN® com algumas adaptações. Espermatozoides coletados dos epidídimos esquerdo e direito de cada animal foram contados em câmara de Newbauer, variando de $3x10^4$ a $9x10^4$ espermatozoides por epidídimo. As amostras de espermatozoides dos epidídimos de cada camundongo foram misturadas no mesmo eppendorf, em seguida adicionados 200 µL da solução de lise de células (QUIAGEN) contendo desferroxamina (0,5 mM) e D-penicilamina (10 mM), vortexados aproximadamente 30 segundos. Posteriormente foram adicionados 20 µL de proteinase K (15 a 20 mg/mL), e as amostras incubadas a 37 ºC por 1 hora. Foram adicionados 20 µL de RNAse, e as amostras novamente incubadas a 37 ºC por 1 hora. Em seguida foram adicionados 200 µL da solução de precipitação de proteínas (QUIAGEN) e as amostras centrifugadas a 2000 g/10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro eppendorf e adicionados 700 µL de isopropanol gelado, os tubos agitados por inversão aproximadamente 100 vezes e estocados *overnight* no freezer. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g/10 minutos, o sobrenadante descartado e a lavagem dos *pellets* foi feita com 500 µL de etanol 70% gelado (10.000 g/10 minutos). Após secagem ao ar, os *pellets* foram ressuspensos com 50 µL de desferroxamina (100 µM). A concentração de DNA nas soluções foi verificada pela intensidade de absorbância em λ = 260 nm, utilizando-se o equipamento nanodrop (software ND 1000) disponível no laboratório da Profa. Silvya Stuchi Maria Engler (FCFUSP).

3.9. Quantificação de 8-oxodG e CEdG em DNA nuclear e mitocondrial (fígado, rim, testículo)

Para a reação de hidrólise enzimática, alíquotas contendo 70 a 80 µg de DNA foram adicionadas a 3,8 µL de tampão Tris-HCl/$MgCl_2$ 200 mM (pH 7,4), 3,2 µL de DNAse 1 (1 unidade), 5,3 µL da solução contendo 75 fmol/µL do padrão [$^{15}N_5$]CEdG e 2 µL da solução contendo 1000 fmol/µL do padrão [$^{15}N_5$]8–oxodG. As amostras foram incubadas a 37 ºC por 1 h. Após a incubação foram adicionados 3,2 µL da enzima PDE1 (0,0005 unidade) e 4 µL da enzima fosfatase alcalina (3,2 unidades). As amostras foram novamente incubadas a 37 ºC por 1 h com agitação de 1000 rpm. Ao término da segunda hora, o volume final da incubação (100 µL) foi centrifugado por 10 min a 9300 *g* e uma alíquota de 10 µL do sobrenadante foi coletada para injeção de 5 µL no sistema de HPLC-DAD descrito no item 3.2.3 utilizado para

quantificação de 2'desoxiguanosina (dG). Alíquotas de 50 µL foram injetadas paralelamente no sistema de HPLC-ESI-MS/MS (descrito no item 3.2.4) para a quantificação das lesões (OLIVEIRA, 2012; SANTOS, 2014).

Para amostras contendo menores quantidades de DNA, os volumes de reagentes de hidólise foram ajustados proporcionalmente.

As análises foram realizadas em modo positivo (ESI^+, $[M+H]^+$), utilizando-se os parâmetros otimizados: CUR, 15 psi; GS1, 45 psi; GS2, 50 psi; CAD, LOW; TEM, 650 ºC; EP, 10 V e IS, 5500 V. Foi utilizado o modo de monitoramento de reação múltipla (MRM) para detecção e quantificação das lesões, sendo as fragmentações e energias utilizadas descritas na tabela 6.

3.9.1) Condição cromatográfica para quantificação de dG por HPLC-DAD

A seguinte condição cromatográfica foi utilizada: Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com um gradiente de ácido fórmico 0,1% em H_2O (Solução A) e ácido fórmico 0,1% em 50 % metanol e H_2O (Solução B), a um fluxo de 1 mL/min, 35 ºC, nas seguintes condições: 0 – 25 min, 0 – 40 % B; 25 – 26 min, 40 – 0 % B; 26 – 40 min, 0 % B. O detector de DAD foi fixado em 260 nm para a quantificação de dGuo. Curvas de calibração foram feitas no intervalo de 0,1 – 8 nmol de dG.

3.9.2. Condição cromatográfica para quantificação das lesões por HPLC-ESI-MS/MS

Foi utilizado um sistema com duas colunas conforme o descrito a seguir. *Válvula posição 0*: Coluna Luna C18 (2) 50 mm x 4,6 mm, ID, 2.6 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída com um gradiente de ácido fórmico 0,1% em água (Solução A) e 0,1% de ácido fórmico em metanol (Solução B), a um fluxo de 130 µL/min, 25 ºC, nas seguintes condições: 0 – 5 min, 0 – 4 % de B; 5 – 6 min, 4% de B; 6 – 11 min, 4 – 7 % de B; 11 – 12 min, 7 – 8 % de B; 12 – 16 min, 8 – 10 % de B; 16 – 25 min, 10 – 60 % de B; 25 – 26 min, 60 – 80 % de B; 26 – 33 min, 80 % de B; 33 – 35 min, 80 – 0 % de B; 35 – 50 min, 0 % de B (*Linha 1*). Concomitantemente uma coluna Luna C18

(2) 150 mm x 2,0 mm, ID, 3 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída em modo isocrático por uma solução constituída por 15% de metanol em água com 0,1% de ácido fórmico, a um fluxo de 130 µL/min, 25 ºC. O sistema é integrado ao espectrômetro de massas (Sistema ESI-MS/MS 2) (Linha 2). *Válvula posição 1*: Com a alteração do posicionamento da válvula, as duas linhas descritas acima passam a ser eluídas pelo gradiente da bomba binária e as duas colunas analíticas passam a integrar a mesma linha do sistema cromatográfico (Linha 3). As seguintes condições de posicionamento para a válvula de comutação de fluxo são empregadas: 0 – 13 min, posição 0; 13 – 35 min, posição 1; 35 – 50 min, posição 0. Para as quantificações foram injetadas curvas de calibração no intervalo de 250 a 2000 fmol de 8-oxodG (1000 fmol de [$^{15}N_5$]8-oxodG) e 2 a 100 fmol de CEdG (200 fmol de [$^{15}N_5$]CEdG).

Tabela 6 - Fragmentações e energias utilizadas para a quantificação das lesões 8-oxodG e CEdG em amostras de DNA.

Analito	Q1 (amu)	Q3 (amu)	Dwell Time (msec)	DP (V)	CE (V)	CXP
8-oxodG	284	168	120	36	21	8
	284	140	120	36	45	6
[$^{15}N_5$]8-oxodG	289	173	120	36	21	8
CEdG	340	223	120	51	21	12
	340	177	120	51	41	8
[$^{15}N_5$]CEdG	345	228	120	51	21	12

DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula.
Q1 e Q3: compartimento de analise de massa.

3.10. Quantificação de 5-metil-2'-desoxicitidina (5-mC) e 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina (5-hmC) em DNA nuclear e mitocondrial.

Os níveis de metilação e hidroximetilação global do DNA foram avaliados no sistema de HPLC-ESI-MS/MS descrito no item 3.2.4 de Material e Métodos, conforme padronizado no laboratório (DE OLIVEIRA, A. A. F. et al., 2017).

3.10.1. Quantificação de 5-mC e 5-hmC em DNA nuclear de fígado

Para a realização da hidrólise enzimática, alíquotas contendo 6 µg de DNA em desferroxamina (0,1 mM) e 60 fmol de [$^{15}N_5$]1,N^6-etenodA (padrão interno) foram adicionadas

a 2,5 µL de tampão Tris-HCl/$MgCl_2$ 200 mM (pH 7,4) e 1,2 unidade de DNAse 1 (3,8 µL). As amostras foram incubadas a 37 ºC por 1 h. Após a incubação foram adicionados 0,0005 unidade de fosfodiesterase 1 (PDE1) (3,2 µL) e 1,2 unidade de fosfatase alcalina (1,5 µL). As amostras foram novamente incubadas a 37 ºC por 1 h com agitação de 1000 rpm. Ao término da segunda hora, ao volume final da incubação (60 µL) foram adicionados 140 µL de acetonitrila. As amostras foram submetidas à vigorosa agitação por 20 segundos com posterior centrifugação a 9300 *g* por 10 min. Após a centrifugação, alíquotas de 50 µL foram injetadas no sistema de HPLC-ESI-MS/MS (item 3.2.4).

As análises foram conduzidas com ionização por *electrospray* em modo positivo (ESI^+, $[M+H]^+$), utilizando-se os seguintes parâmetros otimizados: CUR, 15 psi; GS1, 45 psi; GS2, 50 psi; CAD, LOW; TEM, 650 ºC; EP, 10 V e IS, 5500 V. As fragmentações e energias utilizadas no MRM são descritas na Tabela 7. Curvas de calibração foram feitas utilizando-se 2 – 1200 pmol de dC, 0,1 – 116 pmol de 5-mC, 0,0005 – 0,010 pmol de 5-hmC e 360 fmol de $[^{15}N_5]1,N^6$-etenodA como padrão interno.

A seguinte condição cromatográfica foi utilizada: Coluna *Syncronis* HILIC (2) 150 mm x 4,6 mm, ID, 5 µm, (Thermo Scientific, USA) com uma pré–coluna HILIC 4,0 x 3,0 mm (Thermo Scientific, USA) foi eluída com um gradiente de acetonitrila (Solução A) e tampão acetato de amônio 5 mM com 0.05% de hidróxido de amônio (Solução B), a um fluxo de 300 µL/min, 35 ºC, nas seguintes condições: 0 – 35 min, 0 – 40 % B; 35 – 36 min, 40 – 0 % B; 36 – 56 min, 0 % B. A válvula de comutação de fluxo foi configurada para permitir a entrada de eluentes no espectrômetro de massas no intervalo de 16 – 27 min.

Tabela 7 - Fragmentações e energias utilizadas para a quantificação de 5-mC e 5-hmC em amostras de DNA nuclear de fígado.

Analito	Q1 (amu)	Q3 (amu)	Dwell Time (msec)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
dC	228	112	120	36	15	6
5-mC	242	126	120	36	15	6
5-hmC	258	142	120	36	15	6
$[^{15}N_5]1,N^6$-εdA	281	165	120	41	27	8

DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula.
Q1 e Q3: compartimento de analise de massa.

3.10.2. Quantificação de 5-mC e 5-hmC nas demais amostras de DNA

A reação da hidrólise ocorreu da seguinte forma: alíquotas contendo 1 µg de DNA em desferroxamina (0,1 mM) foram adicionadas a 1 µL de tampão Tris-HCl/MgCl2 (200 mM pH 7,4), 1,6 µL de uma solução de 1,N^6-etenodA (100 fmol/ µL), 1,6 µL de uma solução de [$^{15}N_3$]5-hmC (100 fmol/ µL), 1 µL de DNAse (0,31 unidade). As amostras foram incubadas a 37 ºC/1 h. Após a incubação foram adicionados 0,00016 unidade de PDE (1 µL) e 0,8 unidade de fosfatase alcalina (1 µL) e depois incubadas a 37 ºC por 1 h com agitação de 1000 rpm. Ao término da segunda hora, com volume final da incubação de 20 µL, as amostras foram submetidas à vigorosa agitação por 10 segundos com posterior centrifugação a 9300 *g* por 10 min. Após a centrifugação uma alíquota de 10 µL foi injetada no sistema HPLC-ESI-MS/MS descrito no item 3.2.4 de Material e Métodos e 5 µL foram injetados no HPLC-DAD para a quantificação de dC (λ = 297 nm, condição cromatográfica descrita acima para quantificação de dG). As Curvas de calibrações foram feitas utilizando-se 10 – 800 pmol de dC, 0,05 – 16 pmol de 5-mC, 0,05 – 0,4 pmol de 5-hmC, 80 fmol de 1,N^6-etenodA e [$^{15}N_3$]5-hmC como padrões internos.

Foi utilizada a seguinte condição cromatográfica para as quantificações de 5-mC e 5-hmC por HPLC-ESI-MS/MS: coluna Luna Omega PS C18 (150 x 2.1 mm i.d., 5.0 µm, 100A Phenomenex) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída em gradiente por uma solução constituída de tampão acetato de amônio 5 mM (Solução A) e 50 % de metanol em água com 0,1% de ácido fórmico (Solução B), a 35 ºC, com fluxo de 350 µL/min (0 – 3 min, 0 % de B; 3 – 7 min, 0 – 90 % de B; 7 – 8 min, 90 – 0 % de B; 8 – 18 min, 0 % de B). A válvula de comutação de fluxo foi configurada para permitir a entrada de eluentes no espectrômetro de massas no intervalo de 2 – 9,5 min.

As análises foram conduzidas com ionização por *electrospray* em modo positivo (ESI^+, $[M+H]^+$), com os seguintes parâmetros otimizados: CUR, 10 psi; GS1, 50 psi; GS2, 50 psi; CAD, medium; TEM, 450 ºC; EP, 10 V e IS, 5500 V. As fragmentações e energias utilizadas no MRM estão apresentadas na tabela 8.

Tabela 8. Fragmentações e energias utilizadas para análises dos níveis de metilação e hidroximetilação do DNA.

Analito	Q1	Q 3	Dwell Time (msec)	DP (V)	CE (V)

5-hmC 1	258,082	142	100	17	8
5-hmC 2	258,082	124,1	100	33	5
[$^{15}N_3$]5-hmC	261,082	145	100	17	8
5-mC 1	242	126	100	17	5
5-mC 2	242	108,6	100	53	20
ϵdA	276,2	159,9	100	27	8
ϵdA	276,2	105,8	100	69	20
dC 1	228,055	112	100	15	20
dC 2	228,055	116,9	100	19	6

DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula.
Q1 e Q3: compartimento de analise de massa.

3.11. Análise Estatística

Neste estudo os dados obtidos em cada experimento foram analisados pelo teste de ANOVA para identificar os níveis de NOAEL e comparados com a modelagem de *benchmark dose*, que se baseia na avaliação da relação dose resposta e identificação dos *endpoints* (efeitos).

Os dados foram apresentados como média ± desvio ou erro padrão. Todas as análises dos resultados obtidos foram feitas com o *software* GraphPad Prism® 5 e PASW Statistics®17. As variáveis numéricas foram inicialmente avaliadas quanto ao tipo distribuição por meio do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os dados obtidos das variáveis que apresentaram distribuição normal foram avaliados por Teste t ou ANOVA. Os testes de Tukey, Bonferroni ou Dunnet foram usados como pós-teste para verificar a significância da diferença entre os grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Dados estatisticamente significativos foram analisados para a modelagem da dose resposta usando a abordagem do "*Benchmark dose"* (BMD) com PROAST software versão 3.9 no R (www.rivm.nl/proast). Nesta abordagem, os modelos Exponencial e Hill são ajustados aos dados do tamanho amostral estudado. A BMD (concentração do efeito crítico) com limites do intervalo de confiança inferior a 5% e superior a 95% (BMDL, BMDU) é derivada dos modelos ajustados numa resposta de *benchmark* (BMR) predefinida (tamanho do efeito crítico, CES). O CES utilizado neste estudo foi de 5% para dados contínuos. A qualidade de ajuste foi determinada pela probabilidade logarítmica (*log likelihood*) de cada modelo. Na avaliação dos

resultados, os dados que não produziram uma dose-resposta estatisticamente significativa com modelos exponenciais e Hill não foram considerados suficientemente informativos para conclusões robustas. Além disso, os dados que produziram respostas de dose com um grande intervalo de confiança (relação BMDU / BMDL > 100) não foram considerados adequados para obter uma dose de referência válida. Adicionando, os dados da modelagem de benchmark analisados neste estudo pelo Proast *software* foram apresentados como CED, CES, CEDL e CEDU. (COMMITTEE, E. S. et al., 2017; EUROPEAN FOOD SAFETY, 2009; VAN ESTERIK et al., 2016)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do modelo experimental

No período de exposição, os camundongos foram pesados 17 vezes (a cada 3 dias) durante 50 dias. O peso de cada animal serviu de base para calcular o volume de administração da solução de Aroclor 1254. Foi calculado o ganho da massa corporal individualmente dos animais dos grupos experimentais e não foi observada diferença significativa entre o grupo controle e os grupos expostos.

Os parâmetros avaliados no dia da eutanásia dos animais encontram-se na tabela 9, tais como a média do peso corporal dos camundongos ao final do período de exposição, a variação de peso ao longo do período de exposição, massa relativa média dos testículos (IGS), fígado (IHS) e rim. Observou-se um aumento, não significativo, na variação da massa corporal dos animais expostos às duas maiores doses. Todavia, não foram observadas diferenças significativas das massas relativas dos testículos, fígado e rim entre os grupos expostos e controle. Quanto aos espermatozoides coletados do epidídimo, verificou-se que o Aroclor causou diminuição da quantidade coletada de espermatozoides no grupo exposto a 1000 µg/kg.

Tabela 9 - Biometria da massa corporal e dos órgãos dos camundongos na fase reprodutiva após exposição ao Aroclor 1254

	Controle	**5 µg/kg**	**50 µg/kg**	**500 µg/kg**	**1000 µg/kg**	**Valor-p**
Peso corporal (g)	30,16±0,46	30,19±0,54	30,69±0,61	28,10±1,23	28,93±0,33	0,07
Variação de peso	2,88±0,18	2,03±0,27	2,18±0,19	3,52±0,32	3,29±0,13	< 0,0001
IGS do TE (%)	0,28±0,011	0,27±0,007	0,31±0,005	0,30±0,006	0,28±0,006	0,065
IGS do TD (%)	0,28±0,001	0,28±0,01	0,31±0,006	0,27±0,007	0,29±0,008	0,086
Concentração espermática ($x10^4$ Sptz/mL) (n=5)	1296±479,5	811±108	1293±543,5	920±164,4	436±36,1	0,36
IHS (%)	5,3±0,098	5,4±0,069	5,3±0,13	5,46±0,21	5,43±0,13	0,95
Rim (%)	1,43±0,079	1,648±0,03	1,433±0,05	1,47±0,06	1,38±0,016	0,0732

Valores expressos em média±erro padrão. Dados obtidos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos tratados e controles. Animais foram eutanasiados após 50 dias. Índice gonadossomático

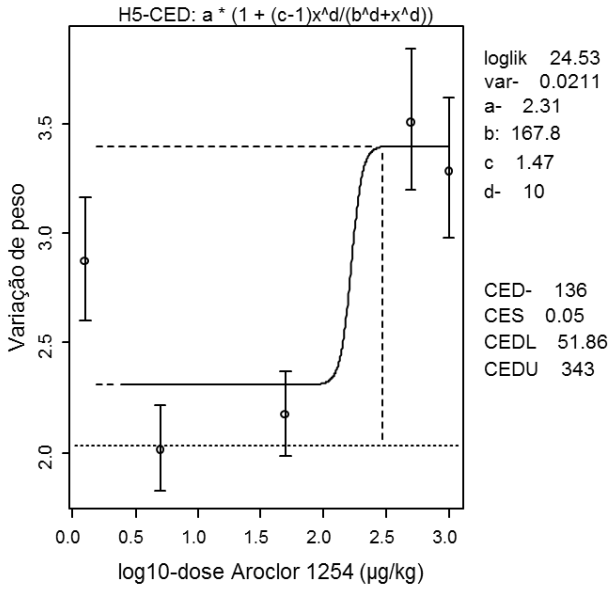
(IGS), índice hepatossomático (IHS), Testículo direito (TD), Testículo esquerdos(TE), espermatozóide (Sptz). N = 9 a 10 animais por grupo.

Estudos anteriores mostraram que a exposição ao Aroclor 1254 durante o período de lactação diminuiu significativamente o crescimento da prole e reduziu em 5-10% o peso corporal dos camundongos adultos. A administração subcrônica de PCB nas doses de 1, 10 e 15 mg / kg por dia durante 10-15 semanas resultou numa diminuição significativa do peso corporal, epidídimo, vesícula seminal e glândula pituitária (MURUGESAN et al., 2005). Em trabalho anterior que constituiu minha dissertação de mestrado, a exposição a doses de PCBs no intervalo de 0,5 a 500 µg / kg a cada 3 dias por gavagem foi insuficiente para reduzir o peso corporal em camundongos, enquanto que o peso do testículo diminuiu significativamente na maior dose testada. Além disso, os parâmetros espermáticos e análises histopatológicas dos túbulos seminíferos mostraram uma alteração degenerativa na espermatogênese no caso da exposição à maior dose (CAI, J. et al., 2011).

Quanto à toxicidade hepática, em outro estudo foi verificado que a exposição a PCBs levou ao aumento do peso do fígado e elevação dos níveis séricos da atividade TG e AST, além de alterações histopatológicas (LU, C. et al., 2010). Em contradição, em outro estudo ratos expostos a PCBs (2 mg/kg de peso corporal) tiveram diminuição significativa da massa corporal e pesos relativos de órgãos, como o fígado, rim e pulmão (BANUDEVI et al., 2006).

A modelagem de *benchmark* para o efeito de PCBs foi aplicada na caraterização do modelo experimental usando o software Proast. Os pesos de fígado, rim e testículo com $p>0,05$ não foram afetados pelo Aroclor 1254. A relação dose efeito para investigar os efeitos de PCBs em percentuais de pesos dos órgãos não foi aprovada pela abordagem de BMD, sendo que a significância ($p<0,05$) é um dos paramentros usados para os dados poderem ser analisados por esta modelagem. O efeito de Aroclor 1254 na variação do peso corporal foi representado pelo tamanho do efeito máximo derivado da relação dose efeito durante o período da exposição. Na figura 9 está representada a dedução do tamanho do efeito máximo da curva dose efeito, indicando um "*endpoint"* para a variação do peso corporal. Valores de CED e seus níveis de confiança inferiores foram calculados nas curvas de melhores ajustes dos parâmetros utilizados. O efeito da dose crítica com CES de 5% para o efeito de Aroclor 1254 na variação do peso corporal foi 136 µg/kg de Aroclor, com CEDL de 51,86 e CEDU 343 µg/kg de Aroclor 1254.

Figura 9 - Relação dose-efeito da variação do peso corporal em animais expostos ao Aroclor 1254 após 50 dias de exposição. Camundongos C57 foram expostos por gavagem a uma dieta de 0 – 1000 µg/kg de Aroclor por kg de peso corporal de 3 em 3 dias alternados durante 17 administrações. A função das curvas é mostrada na linha superior no canto superior direito do gráfico, seguida de parâmetros de significância e forma da curva (loglik, var). CES, tamanho do efeito crítico. CED, efeito crítico da dose; CEDL, CEDU, limite inferior e superior do intervalo de confiança de 90% para o CED, calculado pelo método *bootstrap*; encontrado no texto como BMD, BMDL e BMDU. A análise foi feita com a versão PROAST 38.9.



Neste estudo, o método de BMD foi usado para estimar o valor de BMD (CED) e BMDL (CEDL) na variação do peso corporal dos animais expostos ao Aroclor 1254 em diferentes concentrações durante 50 dias. CEDL foi significativamente relacionado com o ponto de *"cut off"* para a variação do peso corporal. Conforme Send et al. (2008), o método de BMD é uma alternativa para o NOAEL tradicional e tem sido apresentado como um aperfeiçoamento metodológico no campo da avaliação de risco. Para o *"endpoint"* do modelo contínuo, BMD é definido como correspondente à variação percentual da resposta relativa em relação ao intervalo dinâmico de resposta (SAND; VICTORIN; FILIPSSON, 2008).

Segundo BUHA et al. (2013), Aroclor 1254 foi aplicado a ratos adultos em estudo de sonda de 28 dias. A abordagem da dose de benchmark foi apropriada, uma vez que todas as doses utilizadas no estudo foram associadas a um efeito adverso significativo e, portanto, nenhum NOAEL poderia ser estimado. O peso relativo do fígado foi significativamente maior em todos os animais expostos quando comparados aos controles (BUHA et al., 2013).

A forma comum de analisar os dados coletados de estudos de dose-efeito em animais é testar estatisticamente cada grupo de dose em relação a grupos controle para diferenciar significativamente e determinar o NOAEL. Crump (1984) introduziu o conceito BMD como uma alternativa à abordagem NOAEL, devido a sérias objeções em relação ao NOAEL. O comitê científico da Autoridade Européia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) recomendou esta abordagem para derivar pontos de referência na avaliação de risco alegando que a abordagem BMD é cientificamente uma abordagem mais avançada do que a NOAEL / LOAEL (EFSA, 2009). (BUHA et al., 2013; COMMITTEE, E. F. S. A. S., 2009; CRUMP, 1984). A análise de BMD é particularmente adequada para a avaliação de risco com base em dados contínuos de estudos de exposição humana, nos quais muitas vezes é difícil identificar limiares discretos da relação dose-resposta (JACOBSON et al., 2002). A ausência de um NOAEL confiável também é comum em experiências com animais de laboratório, onde os efeitos adversos são muitas vezes evidentes, mesmo com as mais baixas doses testadas (JACOBSON et al., 2002).

4.2 - Avaliações dos indicadores de estresse oxidativo, metilação de DNA e intermediários do metabolismo celular

As espécies reativas podem causar oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados e levar à formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o MDA, considerado um importante marcador do estresse oxidativo. Os níveis de MDA foram quantificados por HPLC-DAD após derivatização com DNPH, como descrito em Material e Métodos.

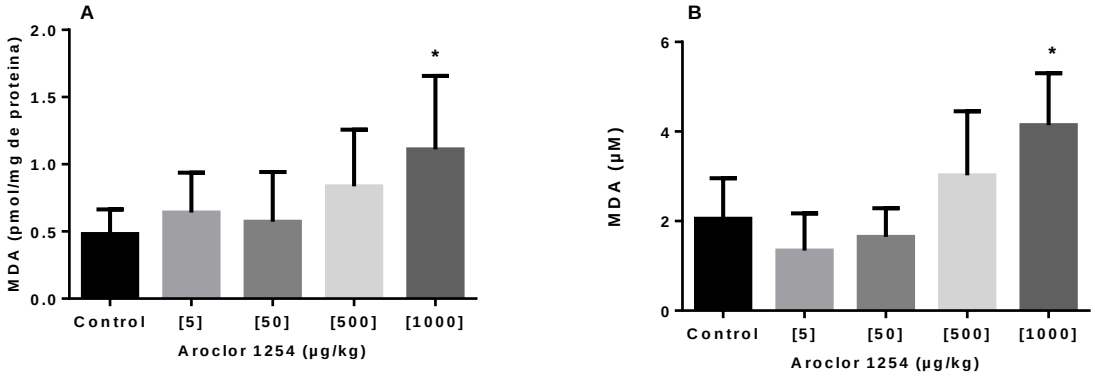
A investigação de metabólitos intermediários em fígado, rim e testículo dos camundogos expostos ao Aroclor 1254 durante 50 dias foi feita utilizando-se o método padronizado pelo grupo, como exposto no item Material e Métodos. Foi feita a quantificação dos metabólitos succinato, fumarato, glutamina, glutamato, malato, lactato, piruvato, ATP, ADP, NAD^+, NADH, $NADP^+$, NADPH. A curva de linearidade foi verificada para todos os analitos e obtidos valores de coeficiente de determinação (*r2*) superiores a 0,99. Foram também investigadas as possíveis vias de ação dos PCBs pelos mecanismos epigenéticos e genotóxicos que podem levar à modulação dos efeitos tóxicos. Os marcadores da metilação e adutos de DNA foram quantificados em DNA nuclear e mitocondrial de rim, testículo, fígado e em DNA global de espermatozoides. Os dados obtidos serão apresentados separadamente para cada tecido.

4.2.1. Fígado e plasma

4.2.1.1. Quantificação de Malondialdeído

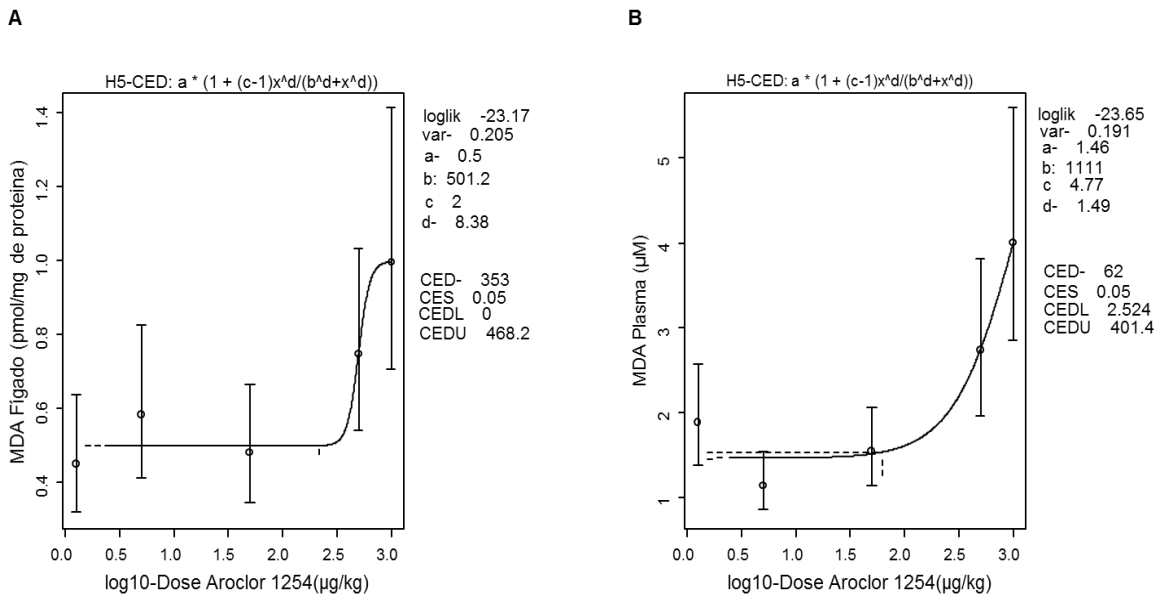
Os resultados indicados na figura 10 e tabela 14 mostram a concentração de MDA no fígado (10 A) e plasma (10 B). Tanto em fígado como em plasma, os animais expostos a 1000 µg/kg apresentaram um aumento estatisticamente significativo (p <0,05) em comparação com o grupo controle.

Figura 10 - Níveis de MDA-DNPH em fígado e plasma de camundongos após 50 dias de exposição ao Aroclor 1254. A figura (A) representa níveis de MDA no fígado e (B) concentração em plasma. Os resultados são expressos como média±erro padrão. Asterisco indica diferença significativa entre o grupo exposto e controle (*P<0,05). Os resultados foram obtidos pelo método de derivatização com dinitrofenilhidrazina seguido da análise por HPLC-DAD (λ = 306 nm).



A relação dose efeito foi usada para investigar os efeitos de Aroclor 1254 nos níveis de malondialdeído. Valores de CED e seus baixos níveis de confiança foram calculados para o melhor ajuste da curva obtida em cada parâmetro. A dose de efeito crítico (CED) com CES de 5% para o efeito de Aroclor 1254 em relação aos níveis de MDA em fígado foi de 353 µg/kg, sendo CEDL e CEDU igual a zero e 468,2 µg/kg, respetivamente (figura 11 A). Em plasma o valor de CED encontrado foi de 62 µg/kg, sendo CEDL de 2,524 µg/kg e CEDU 401,4 µg/kg Aroclor 1254 (figura 11 B). Os CED calculados para os efeitos de PCBs nos níveis de malondíaldeido em fígado e plasma foram inferiores aos valores de NOAEL obtidos.

Figura 11 - Análise da relação dose-efeito para os níveis de MDA em fígado e plasma de camundongos C57 expostos a diferentes doses de Aroclor 1254. A figura (A) indica os níveis de MDA no fígado e (B) concentração em plasma. Os dados foram ajustados com o software Proast. O CES (tamanho do efeito crítico) foi definido em 5 % (linha tracejada horizontal). A dose de efeito crítico correspondente (CED) é representada pela linha pontilhada vertical. CEDL e CEDU representam o limite inferior e superior do nível de confiança de 90%. As doses de PCBs são apresentadas como log10.



Os níveis de malondialdeído foram quantificados para verificar a presença de estresse oxidativo no plasma e tecido hepático. Foi observada a indução de peroxidação lipídica em animais expostos à dose mais alta de Aroclor 1254. Segundo BUHA, et al. (2015), a geração de ROS pode desempenhar um papel importante na indução de hepatotoxicidade por PCBs e o entendimento do mecanismo da formação de ROS por PCBs pode ser útil para compreender os efeitos causados em humanos **(BUHA et al., 2015)**. Estudos realizados por Schlezinger et al. (2006) demostraram que PCB 126 e PCB 169 estimulam a liberação de ROS a partir da indução das enzimas microssomais, e a formação de espécies reativas no sítio ativo pode levar a inativação das enzimas hepáticas (SCHLEZINGER et al., 2006).

A determinação dos níveis séricos de MDA é um ensaio bastante aplicado para avaliar a peroxidação lipídica (MATEOS et al., 2005). Estudos mostraram que ratos expostos a PCBs tiveram aumento da produção de ROS e da peroxidação lipídica, condição que pode levar a alterações de componentes celulares vitais, como proteínas e ácidos nucleicos. Essas reações podem alterar as propriedades intrínsecas das membranas, como a fluidez e transporte de íons,

alterar a atividade enzimática, inibir a síntese de proteínas, lesar o DNA e induzir morte celular (BANUDEVI et al., 2006).

Os PCBs podem causar câncer de fígado em roedores e seres humanos. Embora o seu mecanismo de carcinogenicidade ainda seja desconhecido, presume-se que a ativação de AhR esteja envolvida na promoção do câncer por PCBs (LI, R. et al., 2014). De acordo com outros estudos, os níveis de MDA foram significativamente maiores em fígado da prole de ratas expostas ao Aroclor 1254, em comparação com o grupo controle. O Aroclor 1254 aumentou a peroxidação lipídica hepática, provavelmente por induzir diretamente a produção de ROS (DOGAN; ERIŞIR, 2011).

Conforme Buha et al. (2015), dentre os marcadores de estresse oxidativo investigados na sua pesquisa, o menor valor calculado de CEDL foi observado para os níveis de malondialdeído. Em contradição, Tarrant (2010) afirmou que embora o MDA do tecido hepático seja um parâmetro muito sensível da lesão oxidativa, não pode ser proposto como um biomarcador de efeitos tóxicos de PCB neste tecido (BUHA et al., 2015; TARRANT, 2010).

Segundo EFSA (2009), o Comitê Científico (SC) recomenda a abordagem de *benchmark dose* (BMD) como um método cientificamente mais avançado em comparação com NOAEL para a derivação de um ponto de referência (RP). Portanto, recomenda-se o uso de BMD em vez do uso tradicional de NOAEL, uma vez que permite uma extensa utilização de informação e quantificação das incertezas dos dados da relação dose-efeito. A utilização da abordagem de *benchmark* foi proposta para derivar o ponto de referência (RP) usado no cálculo da margem de exposição (MOE) para as substâncias genotóxicas e cancerígenas. A metodologia no documento de orientação da EFSA foi aplicada para derivar RPs de BMDLs (CEDLs) para vários tipos de produtos químicos, como por exemplo, praguicidas, aditivos e contaminantes de alimentos (EUROPEAN FOOD SAFETY, 2009).

4.2.1.2. Quantificação de intermediários do metabolismo celular

No fígado foram quantificados succinato, fumarato, glutamina, glutamato, malato, lactato, piruvato, ATP, ADP, NAD^+, NADH, $NADP^+$, NADPH (tabela 10). Foi observada redução estatisticamente significativa dos níveis de ATP, ADP, razão $NADP^+$/NADPH e piruvato em animais expostos a 1000 µg/kg de Aroclor 1254; glutamato nos grupos expostos a

5 µg/kg e 1000 µg/kg de Aroclor 1254; malato e fumarato nos grupos expostos a 500 µg/kg e 1000 µg/kg de Aroclor 1254, comparando com o controle (tabela 10).

Tabela 10. Níveis de metabólitos intermediários no fígado após exposição ao Aroclor 1254. (N=7 a 8; média ± desvio padrão; valores em pmol/µg de proteína; Anova e pós teste Tukey; *****p<0,05 em relação ao respetivo grupo controle).

	Controle	5 µg/kg	50 µg/kg	500 µg/kg	1000 µg/kg	valor-p
ATP	372,2±121,7	401,2±136,9	345,8±70,19	336,1±56,57	187,8±48,07*	0,0001
ADP	102,9±73,98	72,95±28,95	64,19±29,56	50,16±24,02	28,90±6,072*	0,0106
NADH	9,930±3,65	10,70±0,1	9,369±0,89	12,94±1,97	8,686±0,63	0,1375
NAD^+	8,98±3,34	9,69±2,72	8,48±2,57	11,73±5,39	7,85±1,83	0,5564
$NADP^+$	73,67±14,00	71,66±12,88	64,67±15,13	54,51±8,936	58,06±12,38	0,0245
NADPH	1,474±0,6193	1,876±1,076	1,994±0,6606	2,662±1,271	2,382±0,7970	0,1005
$NADP^+$/ NADPH	41,60±11,37	45,66±16,54	41,23±17,53	29,81±10,95	21,03±8,596*	0,0025
Glutamato	3399±1105	2086±667,1*	2228±548,7	2753±1173	2195±728,1*	0,0152
Glutamina	652,1±242,7	462,1±146,0	577,1±192,1	595,1±361,3	433,7±98,64	0,1993
Lactato	16983±7287	12959±2879	14015±3348	18264±7060	15850±3641	0,0352
Piruvato	1510±876,3	1502±776,5	1404±827,6	1134±665,7	517,8±258,5*	0,0185
Malato	1569±227,3	1414±223,3	1316±348,8	1196±243,3*	1172±202,3*	0,0232
Succinato	62,79±23,47	49,61±17,87	42,98±20,46	46,69±10,68	48,16±22,62	0,3130
Fumarato	1323±348,1	1006±300,8	904,3±362,9	793,4±308,9*	785,3±274,3*	0,0148

A abordagem da dose de *benchmark* foi aplicada somente aos intermediários que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) nos grupos expostos em relação ao controle. Os valores de NOAEL para succinato, glutamina, NAD^+, NADH, $NADP^+$, NADPH não foram estimados baseados nos resultados obtidos neste experimento uma vez que não foram observadas alterações estatisticamente significativas após tratamento com diferentes doses de Aroclor 1254. Valores de CEDL foram inferiores aos valores estimados de NOAEL para todos os metabólitos investigados. Na tabela 11 e figuras 12 e 13 estão indicados os valores de CED,

CEDL e CEDU dos analitos que apresentaram alterações significativas. O efeito nos níveis de ATP foi caraterizado pelo CED de 453 µg/kg de Aroclor 1254 com CEDL e CEDU 192,3 e 773,2 µg/kg de Aroclor 1254, respectivamente. O ADP apresentou CED de 1,36 µg/kg, CEDL e CEDU zero e 296,1 µg/kg de Aroclor 1254, respetivamente; enquanto a razão $NADP^+$/NADPH obteve 73,8 µg/kg de CED, 1,116 µg/kg de CEDL e 323,2 µg/kg de CEDU. Os efeitos adversos de PCBs nos cálculos de valores de CED para glutamato, lactato, piruvato, malato e fumarato foram (530; 142; 247; 0,757 e 0,05) µg/kg apresentando os seguintes CEDL e CEDU (529,7 e 546,1; 5,458 e inf.; 38,69 e 708,1; 0 e 62,29; 0 e 11,33) µg/kg de Aroclor 1254. Os marcadores que apresentaram $p<0,05$ foram aceitos para serem avaliados na modelagem de BMD.

Tabela 11 – Efeito do Aroclor 1254 nos níveis de metabólitos intermediários no fígado dos animais.

	Efeito	CES (%)	CED (µg/kg)	CEDL (µg/kg)	CEDU (µg/kg)
ATP	↓	0,05	453	192,3	773,2
ADP	↓	0,05	1,36	0	296,1
$NADP^+$/NADPH	↓	0,05	73,8	1,116	323,2
glutamato	↓	0,05	530	529,7	546,1
lactato	↓	0,05	142	5,456	inf
piruvato	↓	0,05	247	38,69	708,1
malato	↓	0,05	0,757	0	62,29
fumarato	↓	0,05	0,05	0	11,33

↓ - diminuição significativa do parâmetro avaliado em comparação com o grupo controle. Os dados foram ajustados com o software Proast. O CES (tamanho do efeito crítico) foi definido em 5 %. A dose de efeito crítico correspondente (CED) é representada pela linha pontilhada vertical. CEDL e CEDU representam o limite inferior e superior do nível de confiança de 90%.

Os dados indicam aumento do consumo ou diminuição de geração de glutamato, piruvato e de intermediários do ciclo de Krebs (malato, fumarato) no tecido hepático de camundongos expostos ao Aroclor 1254. Essas alterações metabólicas foram acompanhadas por queda da razão ADP/ATP nos animais expostos, indicando que apesar da diminuição dos níveis de ATP em relação ao controle, as células continuaram gerando energia suficiente para o seu metabolismo. Não foi observado aumento dos níveis de lactato, o que indica não haver aumento de atividade da via glicolítica para suprir eventual decréscimo da fosforilação oxidativa.

Segundo Kling e Gamble (1981), os PCBs (Aroclor 1254) administrados em ratos (0,01%, p/v) inibiram a enzima de clivagem de citrato. Os resultados sugeriram que a diminuição da atividade da enzima pode explicar a diminuição da síntese de ácidos graxos nos fígados de ratos expostos a PCBs (KLING; GAMBLE, 1981).

Figura 12 - Análise da relação dose-efeito para os níveis de intermediários do metabolismo celular em tecido hepático dos animais após exposição ao Aroclor 1254 em diferentes doses. A) ATP; B) ADP; C) razão $NADP^+$/NADPH. Os dados foram ajustados com o software Proast. O CES (tamanho do efeito critico) foi definido em 5 % (linha tracejada horizontal). A dose de efeito crítico correspondente (CED) é representada pela linha pontilhada vertical. CEDL e CEDU representam o limite inferior e superior do nível de confiança de 90%. As doses de PCBs são apresentadas como log10.

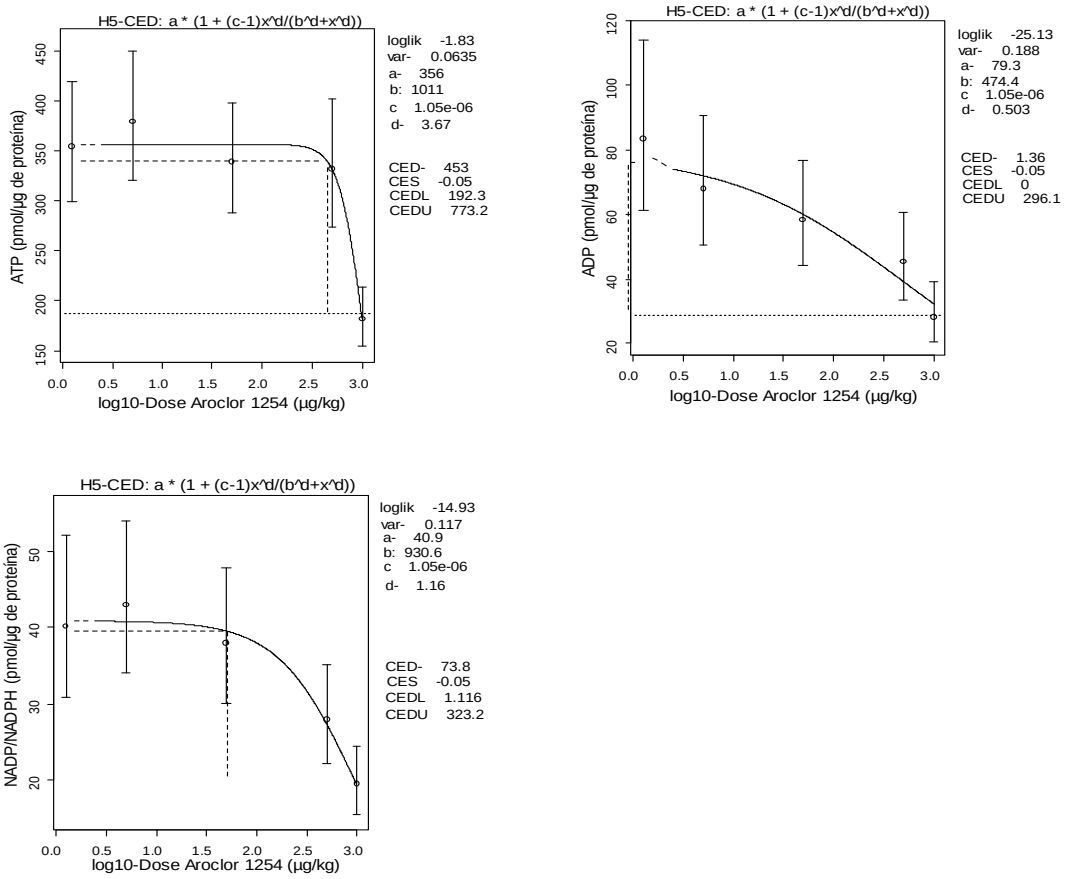
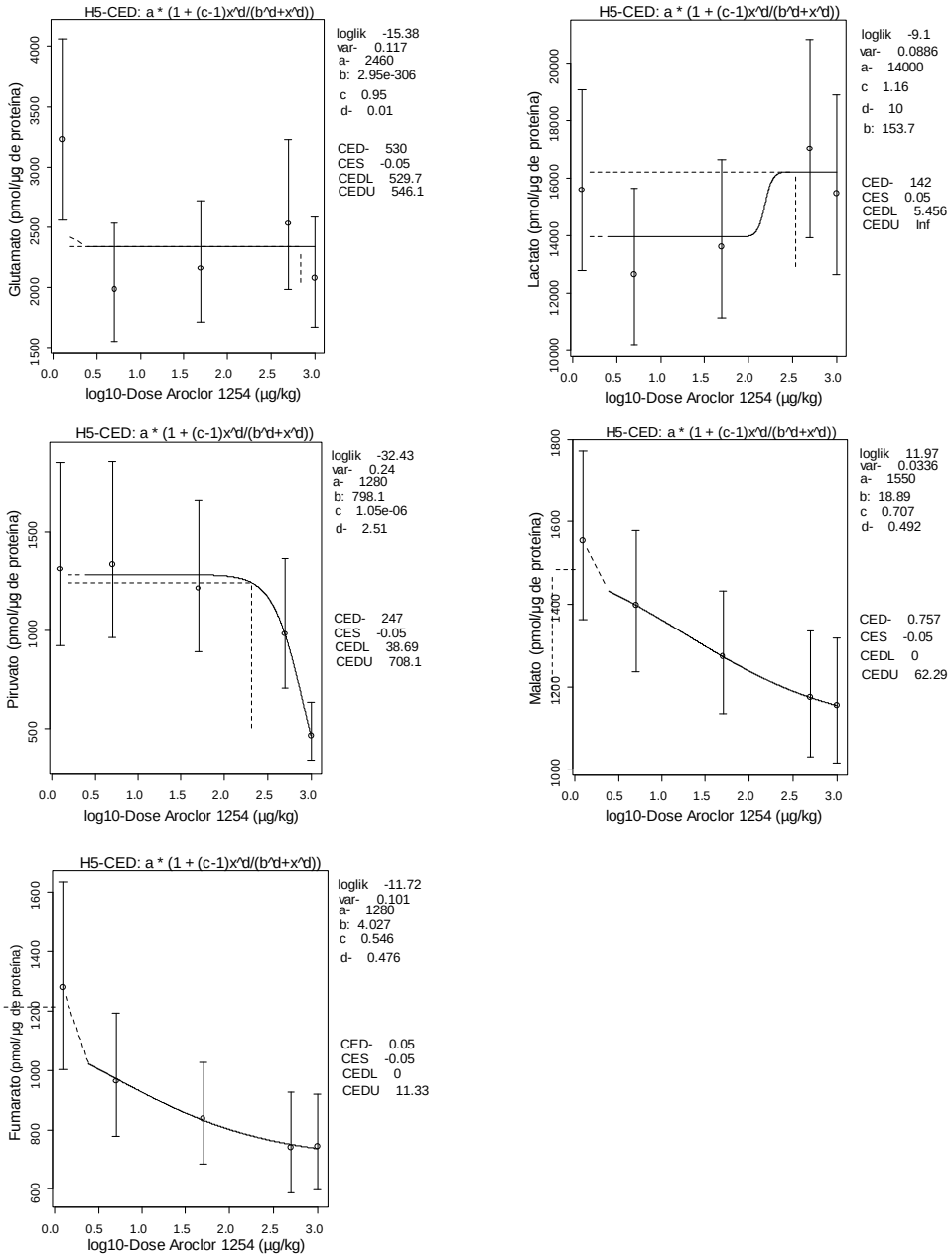


Figura 13 - Análise da relação dose-efeito para os níveis de intermediários do metabolismo celular em tecido hepático dos animais após exposição ao Aroclor 1254 em diferentes doses. A) glutamato; B) lactato; C) piruvato, D) malato, E) fumarato. Os dados foram ajustados com o software Proast. O CES (tamanho do efeito crítico) foi definido em 5 % (linha tracejada horizontal). A dose de efeito crítico correspondente (CED) é representada pela linha pontilhada vertical. CEDL e CEDU representam o

limite inferior e superior do nível de confiança de 90%. As doses de PCBs são apresentadas como log10.

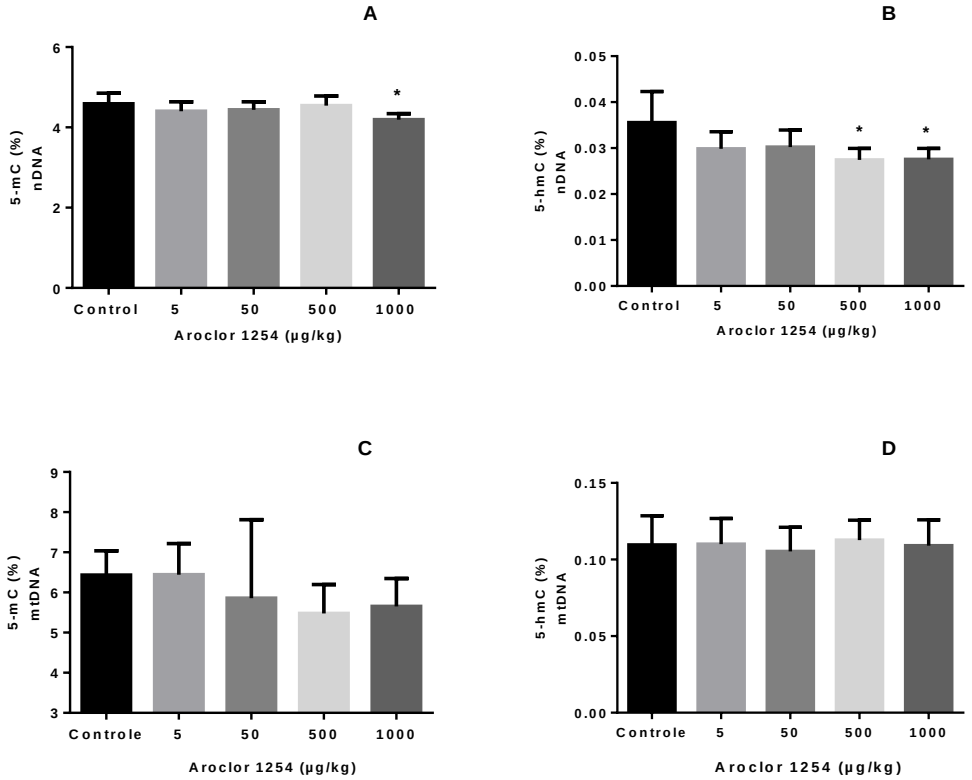


4.2.1.3 - Quantificação das marcas epigenéticas 5-mC e 5-hmC no DNA nuclear e mitocondrial do fígado

Foram quantificadas as marcas epigenéticas 5-mC e 5-hmC no DNA nuclear extraído do fígado dos camundongos. Houve redução significativa dos níveis de 5-mC e 5-hmC no fígado dos animais expostos ao Aroclor 1254 ($p<0,05$) (figura 14 A e B). Os níveis de 5-hmC

no grupo exposto à dose de 500 µg/kg (0,02744±0,002511 %) e 1000 µg/kg (0,02756±0,002388 %) de Aroclor 1254 foram significativamente diferentes do grupo controle (0,03555±0,006762 %). Os níveis de 5-mC diminuiram significativamente nos animais expostos a 1000 µg/kg (4,195±0,1477 %) de Aroclor 1254, comparando com o grupo controle (4,585±0,2695 %). Na figura 16 encontram-se os cromatogramas representativos das análises de 5-mC e 5-hmC. Além disso, as marcas epigenéticas 5-mC e 5-hmC foram avaliadas em DNA mitocondrial do fígado, não sendo encontradas diferenças significativas nos animais expostos em relação ao grupo controle (figura 14 C e D).

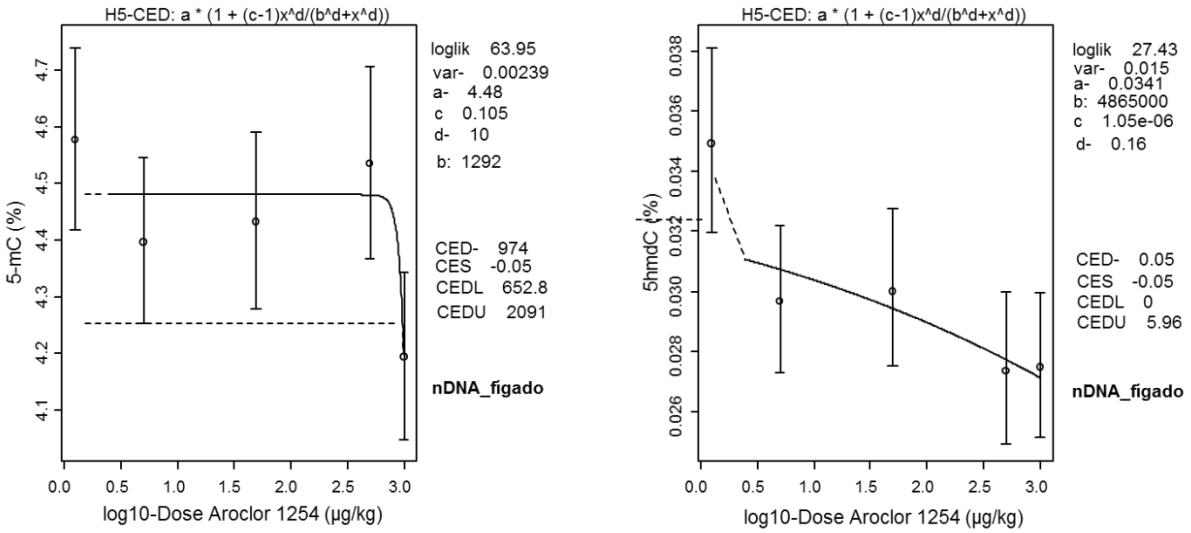
Figura 14 - Análise dos níveis de 5-mC e 5-hmC em DNA nuclear e mitocondrial extraído de fígado de camundongos expostos ao Aroclor 1254. Os dados foram obtidos como descrito no item 3.11 de Material e Métodos. A significância das diferenças entre os grupos foi verificada pelo teste ANOVA seguido de pós teste Tukey. Figura A e B (5-mC e 5-hmC em DNA nuclear). Figura C e D (5-mC e 5-hmC em mtDNA). N= 7 a 9 animais por grupo. *p<0,05 comparado com o grupo controle.



A modelagem de *Benchmark Dose* foi aplicada para analisar as marcas epigenéticas. Os resultados indicaram para 5-mC CED de 974 µg/kg, com CEDL de 652,8 µg/kg; e para 5-hmC CED de 0,05 µg/kg, com CEDL de 0 e CEDU de 5,96 µg/kg de Aroclor 1254 (figura 15).

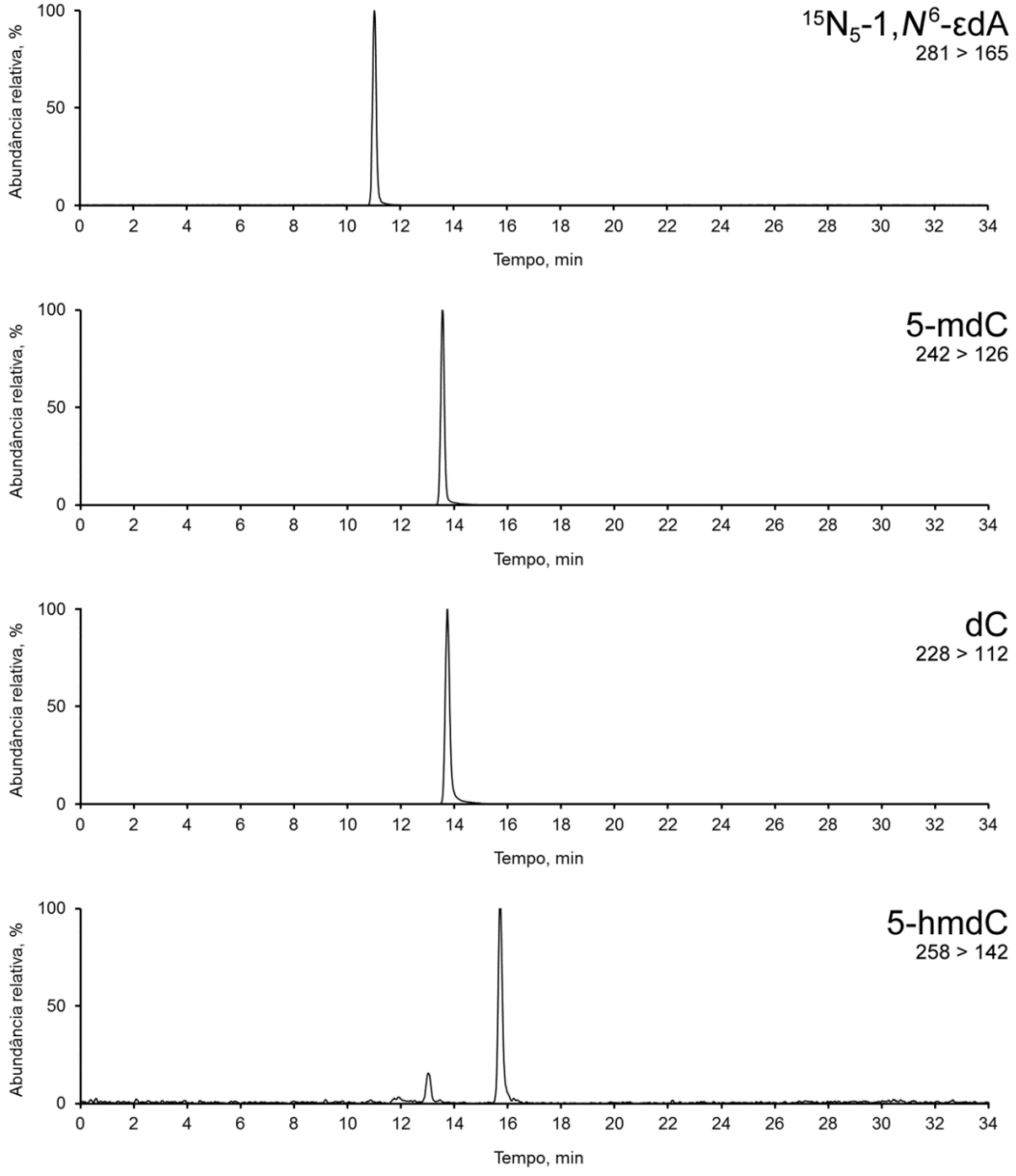
As marcas 5-mC e 5-hmC em DNA mitocondrial não apresentaram critérios para serem avaliadas pela modelagem de BMD.

Figura 15 - Análise da relação dose-efeito para os níveis de 5-mC e 5-hmC em DNA nuclear de tecido hepático dos animais após exposição ao Aroclor 1254 em diferentes doses. O CES (tamanho do efeito critico) foi definido em 5%. A dose de efeito crítico (CED) corresponde à redução da incidência dos níveis de 5-mC (a) e diminuição da incidência dos níveis de 5-hmC (b) em resposta à exposição. CEDL e CEDU representam o limite inferior e superior do nível de confiança de 90%. As doses de PCBs são apresentadas como log10.



De acordo com Ruiz-Hernandez et al. (2015), compostos químicos ambientais têm ganhado considerável atenção como determinantes da metilação do DNA. Os xenobióticos podem interferir em vias metabólicas e epignéticas, resultando em estado de metilação anormal do DNA (RUIZ-HERNANDEZ et al., 2015).

Figura 16 - Cromatogramas representativos das análises de 5-mC, 5-hmC, obtidos por HPLC-ESI-MS/MS a partir de homogenato de fígado de camundongo exposto ao Aroclor 1254, como descrito no item 3.7 de Material e Métodos. O padrão [$^{15}N_5$]1,N^6-εdA foi usado como padrão interno.



O estudo dos efeitos epigenéticos de contaminantes ambientais é uma área relativamente nova em toxicologia. Investigações em fígados de ratos demonstraram que exposições aos poluentes orgânicos persistentes (POPs), incluindo PCBs e MeHg, diminuíram os níveis de SAM, mRNA de DNMT, e metilação global do DNA (DESAULNIERS et al., 2009). Muitos desses POPs se comportam como desreguladores endócrinos, promovendo alteração da

metilação do DNA, o que pode estar associado com o desenvolvimento de doenças transgeracionais (RUSIECKI et al., 2008).

Existem evidências de que a hipometilação global e hipermetilação de genes específicos podem ocorrer precocemente durante o processo de tumorigênese. A perda da metilação global leva à instabilidade do genoma, rearranjo cromossômico, perda de "imprinting" e ativação de transposons, predispondo mutações em genes e um aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias (MIRBAHAI et al., 2011). A hipermetilação das ilhas CpG em regiões promotoras de genes supressores de tumor é uma característica comum em câncer. No entanto, ainda não está claro porque certas regiões se tornam hipermetiladas e outras permanecem não metiladas. A descoberta de que 5-mC pode ser oxidada a 5-hmC por enzimas TET tem levantado muitas questões sobre o papel da 5-hmC em reprogramação epigenética. Tem sido postulada uma função para 5-hmC como um intermediário na desmetilação de DNA (CHEN et al., 2013).

4.2.1.4 - Quantificação das lesões 8-oxodG e CEdG em DNA nuclear e mitocondrial de fígado

Foram quantificadas as lesões 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) e N^2-carboxietil-2'-desoxiguanosina (CEdG) no DNA nuclear hepático. Como apresentado na figura 17, a exposição ao Aroclor 1254 não induziu a formação dessas lesões no DNA, apesar da indução de estresse oxidativo verificada pela quantificação de MDA. Os níveis de 8-oxodG encontrados foram: no grupo controle, 11,03±2,760; exposto a 5 µg/kg, 11,14±3,535; exposto a 50 µg/kg, 10,08±2,045; exposto a 500 µg/kg, 12,31±1,854; e exposto a 1000 µg/kg, 11,53±3,234 8-oxodG/10^6dG. Os níveis de CEdG encontrados foram: no grupo controle, 2,078±0,70; exposto a 5 µg/kg, 2,534±0,67; exposto a 50 µg/kg, 2,681±0,47; exposto a 500 µg/kg, 2,377±0,48; e exposto a 1000 µg/kg, 2,922±0,43 CEdG/10^6dG. Nas figuras 18 e 19 encontram-se os cromatogramas representativos dos adutos 8-oxodG e CEdG.

Foi aplicada a abordagem de *benchmark* aos níveis de 8-oxodG em DNA mitocondrial de fígado. A relação dose efeito foi usada para comparar o *endpoint* de *benchmark dose* com os dados do NOAEL (figura 17 D). O ajuste da curva dose efeito revelou um aumento dos níveis de 8-oxodG comparando com o grupo controle. A dose de efeito crítico (CED) foi de 113 µg/kg; CEDL e CEDU igual a 13,44 µg/kg e 373,8 µg/kg de Aroclor 1254, respectivamente.

Figura 17 - Níveis de 8-oxodG e CEdG em DNA nuclear **(A e B)** e mitocondrial **(C)** de fígado de camundongos expostos ao Aroclor 1254 durante 50 dias. Os dados são apresentados como média± erro padrão da média. N= 8 a 10 animais por grupo. *P<0,05 comparando diferentes grupos com o grupo controle. Modelagem de benchmark **(D)** para determinar a relação dose efeito da exposição ao Aroclor 1254 nos níveis de 8-oxodG em DNA mitocondrial do tecido hepático. O CES (tamanho do efeito critico) foi definido em 5%. A dose de efeito crítico (CED) é representada pelo aumento da incidência dos níveis de 8-oxodG em DNA mitocondrial. CEDL e CEDU representam o limite inferior e superior do nível de confiança de 90%. As doses de Aroclor 1254 são apresentadas como log10.

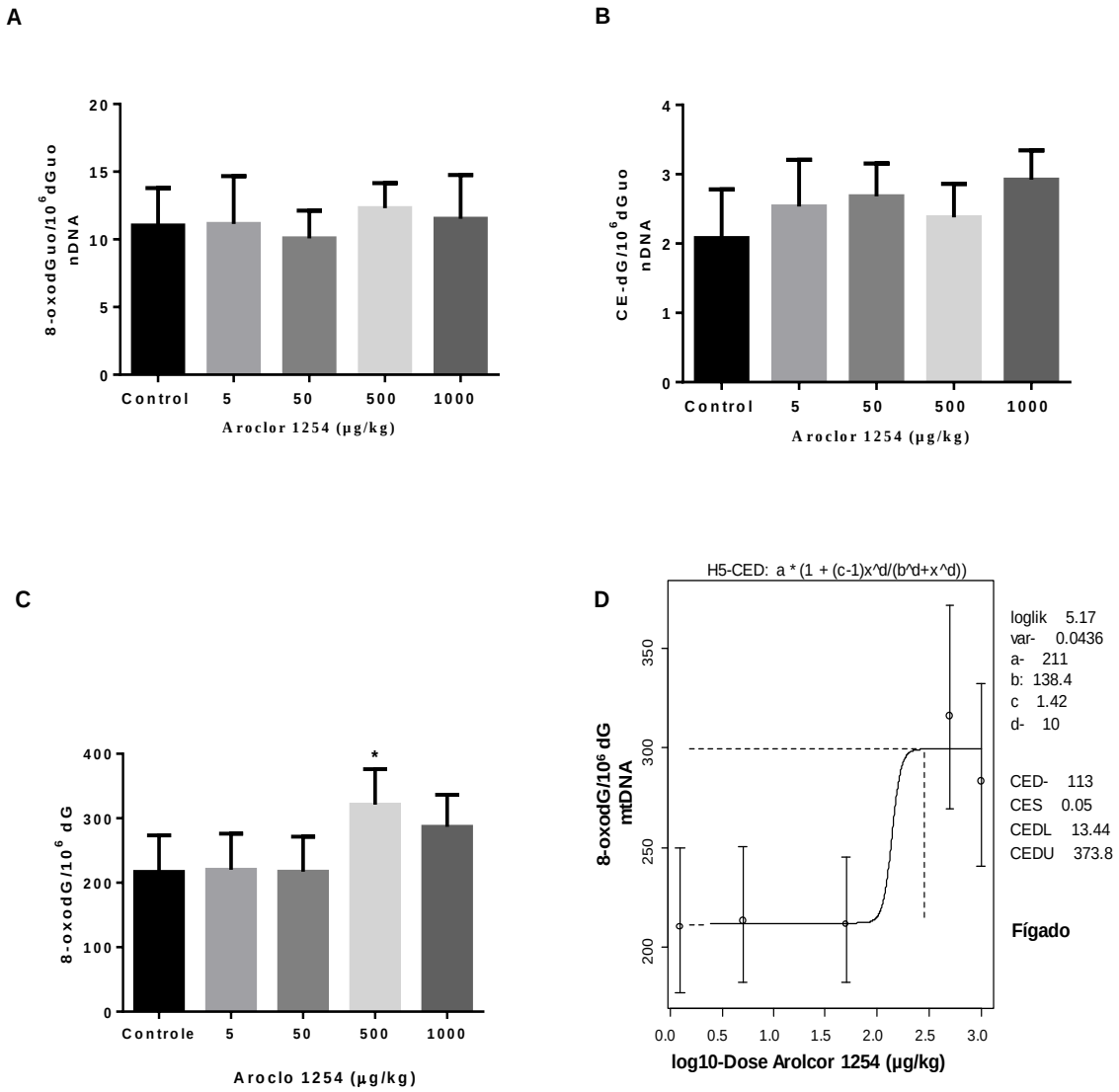


Figura 18 - Cromatogramas representativos da análise de 8-oxodG, obtidos por HPLC-ESI-MS/MS a partir do homogenato de fígado de camundongo exposto ao Aroclor 1254, como descrito no item 3.7 de Material e Métodos.

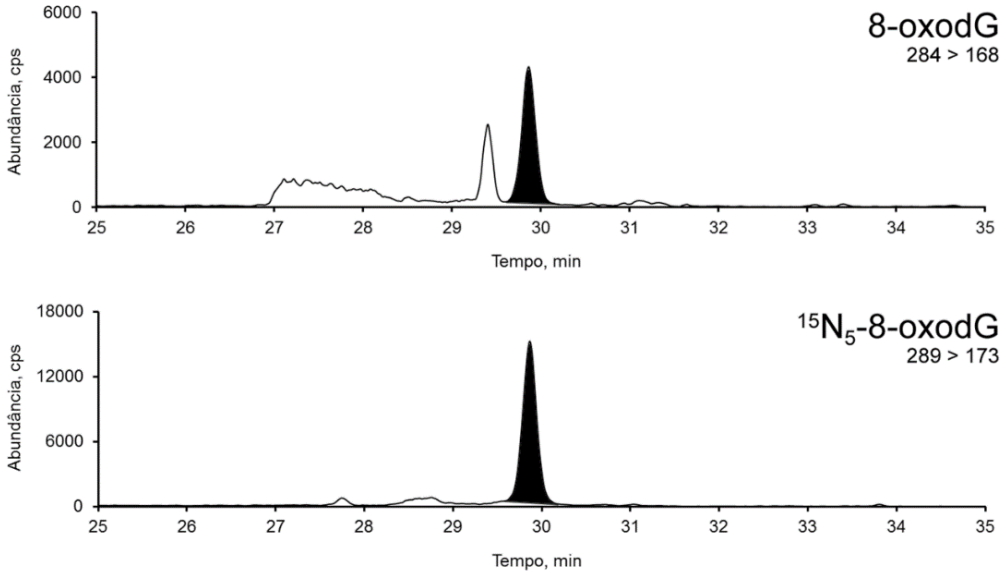
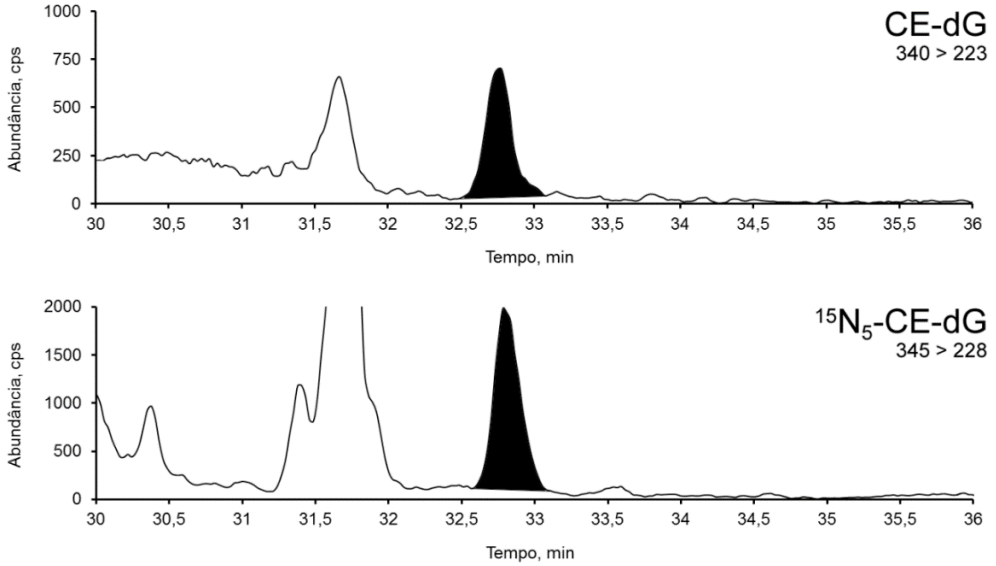


Figura 19 - Cromatogramas representativos da análise de CEdG, obtidos por HPLC-ESI-MS/MS a partir do homogenato de fígado de camundongo exposto ao Aroclor 1254, como descrito no item 3.7 de Material e Métodos.



A lesão mutagênica 8-oxodG é largamente utilizada como marcador de estresse oxidativo em estudos epidemiológicos e mecanísticos (BIANCHINI et al., 2001; CADET; DOUKI, 2011). O aduto CEdG pode resultar da reação de metilglioxal com o grupo amino exocíclico da guanina (CHEPELEV et al., 2013). Algumas fontes de metilglioxal são o processo

de peroxidação lipídica, degradação enzimática ou não enzimática de dihidroxiacetona fosfato (intermediário da via glicolítica), metabolismo de acetona, glicerol, glicina e treonina (VISTOLI et al., 2013) . O acúmulo de CEdG no DNA pode levar a alterações da expressão gênica, da atividade de proteínas (BREYER et al., 2008) e aumento de mutações (CAO; JIANG; WANG, 2007; TAMAE et al., 2011) , eventos relacionados ao desenvolvimento de doenças.

PCBs podem ser metabolizados para mono e di-hidroxi metabólitos, e também para quinonas. As quinonas podem induzir danos diretamente ao DNA, por ligação covalente, e indiretamente podem provocar lesões ao DNA via geração de ROS em ciclos redox, resultando na formação de 8-oxodG e quebras na cadeia de DNA (SPENCER et al., 2009). Vários estudos têm focado sobretudo na forma como as funções hepáticas são afetadas em ratos após a administração de PCBs. Há a hipótese de que as lesões em DNA causadas por congêneres de PCB sejam devidas à sua interação diretamente com a molécula de DNA. O Aroclor 1254 não apresentou efeito significativo na formação de adutos em cultura de células de fígado humano (HepG2), rato e ave. Entretanto, a administração repetida de Aroclor 1254 em ratos induziu a formação de adutos de DNA no fígado, rins e testículo, sugerindo que a biotransformação de Aroclor 1254 para metabólitos ativos pode ser um pré-requisito para qualquer efeito genotóxico (DUBOIS et al., 1995). Exposição de animais a altas doses de Aroclor 1254 pode levar a aumento de ROS, contribuindo para a indução de citotoxicidade em tecidos (AN et al., 2012).

Estudos anteriores reportaram lesão hepática significativa após a exposição de ratos a doses elevadas de PCB169. Também foi demostrado que PCB169 induziu o aumento dos níveis de 8-oxodG no DNA (LI, R. et al., 2014). Em peixes, a quantificação de 8-oxodG tem sido apontada como um novo índice de dano ao DNA induzido por poluentes (NEGRATO et al., 2013). Os processos de reparo das modificações das bases de DNA têm sido estudados em detalhes. A remoção de lesões oxidativas de DNA é certamente importante para a limitação da mutagênese e citotoxicidade (COOKE et al., 2003). Sabe-se que 8-oxodG pode ser eficientemente removida por meio do reparo por excisão de bases (BER) (XU, W. et al., 2015). Devido à sua localização, o DNA mitocondrial é um alvo importante para as espécies reativas.

Em resumo, verificou-se no fígado dos animais expostos ao Aroclor 1254 a indução de estresse oxidativo (aumento dos níveis de MDA no tecido e de 8-oxodG no DNA mitocondrial), alteração do metabolismo celular, e queda dos níveis globais de 5-mC e 5-hmC no DNA nuclear. Essas alterações podem estar inter-relacionadas e ser dependentes da ativação do receptor Ah e da biotransformação dos PCBs. O conjunto de alterações ocorrendo de forma persistente pode favorecer a transformação celular e o desenvolvimento de câncer. O cálculo

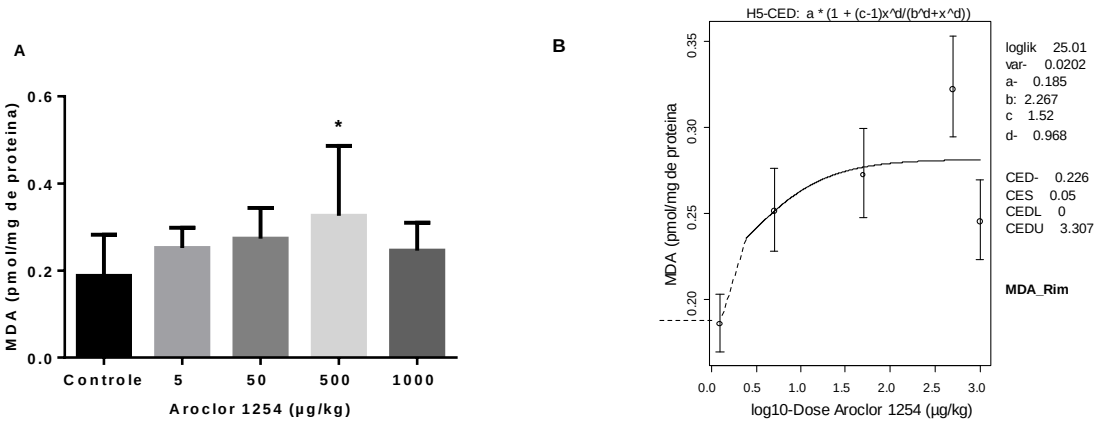
estatístico da dose de efeito crítico (CED) revelou que doses muito inferiores às testadas podem afetar os parâmetros investigados (por exemplo, o metabolismo celular e os níveis de 5-hmC no DNA nuclear). Dada a importância dessas alterações para o desenvolvimento de doenças, além da sensibilidade verificada, são parâmetros que devem ser considerados nas avaliações de toxicidade de PCBs.

4.2.2. Rim

4.2.2.1. Quantificação de Malondialdeído

Os níveis renais de MDA encontram-se representados na figura 20 e tabela 14. Os animais expostos a 500 e 1000 µg/kg apresentaram um aumento estatisticamente significativo (p <0,05) em comparação com o grupo controle. A abordagem de *benchmark* foi aplicada (figura 20 B). A dose de efeito crítico (CED) do Aroclor 1254 foi de 0,78 µg/kg, com CEDL de zero e CEDU 5,046 µg/kg. A modelagem de *benchmark* apresentou um *endpoint* inferior ao do NOAEL tradicional da figura 20 A.

Figura 20 - (A) Níveis de MDA-DNPH nos rins de camundogos expostos ao Aroclor 1254 durante 50 dias. Resultados são expressos como média±erro padrão. Asterisco indica diferença significativa entre o grupos exposto e controle (*P<0,05). Os resultados foram obtidos pelo método de derivatização com dinitrofenilhidrazina seguido da análise por HPLC-DAD (λ = 306 nm). **(B)** Relação dose-efeito para níveis de MDA em rim de camundongos expostos a diferentes doses de Aroclor 1254 durante 50 dias. O tamanho do efeito crítico (CES) foi ajustado em 5%. A dose de efeito crítico correspondente e seu limite inferior e superior do intervalo de confiança de 90 % são marcados como CED, CEDL e CEDU. As doses de Aroclor 1254 são apresentadas como log10.



Segundo Lu et al. (2009), a exposição à mistura de TCDD e PCBs causou alteração do estado antioxidante do rim, evidenciando uma diminuição significativa no nível de glutationa reduzida (GSH), aumento do nível de MDA e da atividade de seleno-enzima glutationa peroxidase (GSH-Px). Foram administrados intragastricamente 10 µg / kg de TCDD, PCBs (Aroclor 1254, 10 mg / kg) ou a combinação (10 µg / kg TCDD + 10 mg / kg Aroclor 1254) após 12 dias consecutivos de exposição em ratos Sprague-Dawley. O estresse oxidativo pode desempenhar um papel importante na toxicidade de TCDD e PCBs, sendo que antioxidantes podem atenuar os efeitos induzidos por esses toxicantes. No entanto, TCDD e PCBs podem induzir significativamente a nefrotoxicidade. As combinações destes dois compostos podem produzir graves lesões nos rins, isto é, danos muito mais graves do que a exposição a PCBs ou TCDD separadamente (LU, C.-F. et al., 2009).

No estudo realizado por DOGAN e ERIŞIR (2011), nenhuma alteração significativa dos níveis de MDA no tecido renal foi evidenciada na prole das ratas expostas ao Aroclor 1254, comparando com o controle. Nesse caso, houve aumento das atividades de antioxidantes enzimáticos, como catalase, glutationa-S-transferase e glutationa peroxidase, provavelmente suficientemente eficaz para proteger contra o dano oxidativo devido à exposição à mistura de PCBs (DOGAN; ERIŞIR, 2011). Entretanto, a excreção renal é uma via importante para a remoção de PCBs do organismo e o tecido renal pode ser sensível aos danos causados por esses toxicantes (PATHAK; KUNDU, 2013).

De acordo com o trabalho publicado por BANUDEVI (2006), redução significativa da atividade específica da enzima SOD foi observada no fígado, pulmão e rim de ratos expostos a PCB. A diminuição da atividade da SOD foi acompanhada de acúmulo do ânion-radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e outras ROS, induzindo o dano oxidativo. O antioxidante α-tocoferol compensou o declínio da atividade da SOD induzido pelo PCB nestes órgãos. A atividade da enzima catalase também apresentou-se diminuída nestes órgãos após a exposição ao PCB (BANUDEVI et al., 2006).

Segundo Milovanovic et al. (2015), compostos como PCBs e tetrabromobisfenol A, de estrutura química e perfil toxicológico semelhante ao dos PBDEs, são conhecidos por induzir estresse oxidativo em rim de ratos após exposição subaguda, sendo um dos mecanismos de nefrotoxicidade (MILOVANOVIC et al., 2015). Foi observada redução dos níveis totais de grupos -SH e aumento da peroxidação lipídica nos rins de animais expostos a BDE-209. As doses calculadas de CED e CEDL para os efeitos de BDE-209 nos níveis de MDA e –SH totais foram inferiores a 10 (EUROPEAN FOOD SAFETY, 2009; MILOVANOVIC et al., 2015).

4.2.2.2. Quantificação de intermediários do metabolismo celular

No tecido renal (tabela 12) a exposição ao Aroclor 1254 levou a uma diminuição estatisticamente significativa dos níveis de ATP em animais que receberam a dose de 1000 µg/kg; ADP nos grupos que receberam 5 µg/kg, 50 µg/kg e 500 µg/kg; NAD^+ nos grupos que receberam 5 µg/kg e 500 µg/kg; e glutamina no grupo que recebeu 500 µg/kg. Houve um aumento significativo dos níveis de lactato nos grupos que receberam 5 µg/kg, 50 µg/kg, 500 µg/kg e 1000 µg/kg; e de malato nos grupos que receberam 500 µg/kg e 1000 µg/kg.

Tabela 12 - Níveis de metabólitos intermediários no rim após exposição ao Aroclor 1254. (N=7 a 8; média ± desvio padrão; valores em pmol/µg de proteína; Anova e pós teste Tukey).

	Controle	5 µg/kg	50 µg/kg	500 µg/kg	1000 µg/kg	valor-p
ATP	379,3±67,76	389,8±105,3	317,0±71,52	303,9±70,41	242,1±23,00*	0,0025
ADP	66,57±25,98	46,12±16,83*	44,91±8,58*	43,53±8,56*	47,37±6,18	0,0376
NADH	0,23±0,18	0,25±0,17	0,28±0,17	0,59±0,45	0,42±0,28	0,0483
NAD^+	12,05±7,04	5,78±1,55*	7,47±1,79	6,87±1,14*	7,96±2,20	0,0089
$NADP^+$	105,7±50,17	79,86±27,99	80,62±18,76	84,82±19,01	86,96±14,61	0,2993
NADPH	2,75±2,75	1,98±1,98	1,96±1,96	2,20±2,20	2,92±2,92	0,1074
Glutamato	67851±8024	63072±3845	65263±6751	71843±9329	71311±6837	0,0635
Glutamina	1336±835,9	1147±426,0	753,4±101,9	661,5±196,2*	795,4±118,7	0,0137
Lactato	1642±564,0	1738±782,8*	2990±707,6*	5698±1080*	4460±750,5*	< 0,0001
Piruvato	7196±2024	6606±3266	7134±782,9	6452±3146	8002±554,5	0,6646
Malato	7794±1162	7253±946,7	7609±1408	9420±668,3*	9574±1322*	< 0,0001
Succinato	1037±220,9	865,1±220,9	897,5±137,7	1074±225,3	1077±230,3	0,0648
Fumarato	2172±1291	1606±474,1	1294±248,2	1699±624,8	1799±245,2	0,1867

Somente os metabólitos com diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p<0,05$) foram considerados na modelagem de *benchmark dose* (figura 21 e tabela 13). Para alteração no nível de ATP foi calculado o CED de 4,13 µg/kg de Aroclor 1254, com CEDL zero e CEDU de 343,9 µg/kg. Para o ADP, CED foi de 0,05 µg/kg, CEDL zero e CEDU

4,304 µg/kg de Aroclor 1254. Para alteração dos níveis de NAD^+, o CED foi de 999 µg/kg, CEDL zero e CEDU não foi calculado. CED para glutamina foi de 5,06 µg/kg, com CEDL zero e CEDU 51,5 µg/kg de Aroclor 1254. Para o lactato, o CED foi 35,1 µg/kg, CEDL 1,374 µg/kg e CEDU 38,31 µg/kg. Quanto ao malato, CED foi 115 µg/kg, CEDL 18,93 µg/kg e CEDU 408,3 µg/kg de Aroclor 1254.

Estudos anteriores mostraram que PCBs aumentam ROS em células de câncer de mama humano e causam ativação de poli(ADP-ribose)polimerase (PARP), que consome NAD^+. NAD^+ regula uma variedade de processos celulares vitais. Atua como coenzima para a glicólise e o ciclo do ácido tricarboxílico, sendo reduzido para NADH e transferindo elétrons para a síntese de ATP na cadeia respiratória mitocondrial. NAD^+ também serve como precursor para $NADP^+$, que atua como coenzima para a via das pentoses, sendo que a forma reduzida (NADPH) está envolvida na manutenção dos níveis de glutationa reduzida (GSH) (HELYAR et al., 2009; SZABÓ; DAWSON, 1998).

No tecido renal observamos que os níveis de NAD^+ nos camundongos expostos ao Aroclor 1254 diminuíram significativamente em comparação com o grupo controle. A menor disponibilidade de NAD^+ pode levar a menor atividade de enzimas dependentes de NAD^+. A malato desidrogenase é uma das enzimas do ciclo de Krebs que depende de NAD^+. Diminuição da atividade dessa enzima levaria a aumento dos níveis de malato, o que foi observado no tecido renal.

A exposição ao Aroclor 1254 também levou à elevação significativa dos níveis de lactato no tecido renal e queda dos níveis de glutamina. A queda da razão NAD^+/NADH pode levar à diminuição do fluxo de elétrons pela cadeia respiratória mitocondrial, diminuindo a produção de ATP via fosforilação oxidativa. Como consequência, as células podem passar a consumir mais glicose e oxidá-la até lactato mesmo na presença de oxigênio (glicólise aeróbica). Essa alteração metabólica é conhecida como efeito Warburg, e pode ser importante para o desenvolvimento de doenças, como o câncer (FAUBERT et al., 2017). Com a diminuição da entrada de piruvato no ciclo de Krebs, o consumo de glutamina (sendo convertida a glutamato e α-ceto-glutarato) passa a ser uma alternativa para a entrada de cabono no ciclo de Krebs (YANG; VENNETI; NAGRATH, 2017). A queda observada dos níveis de glutamina reforça a hipótese da reprogramação metabólica nos rins dos animais expostos ao Aroclor 1254.

Figura 21 - Análise da relação dose-efeito para os níveis de intermediários do metabolismo celular em tecido renal dos animais após exposição ao Aroclor 1254 em diferentes doses. O tamanho do efeito (CES) crítico foi estabelecido em 5%. A dose de efeito crítico correspondente (CED) é representada por linha pontilhada vertical. Os limites inferior e superior do intervalo de confiança de 90% são marcados como CEDL e CEDU. As doses de AROCLOR 1254 são apresentadas como log10.

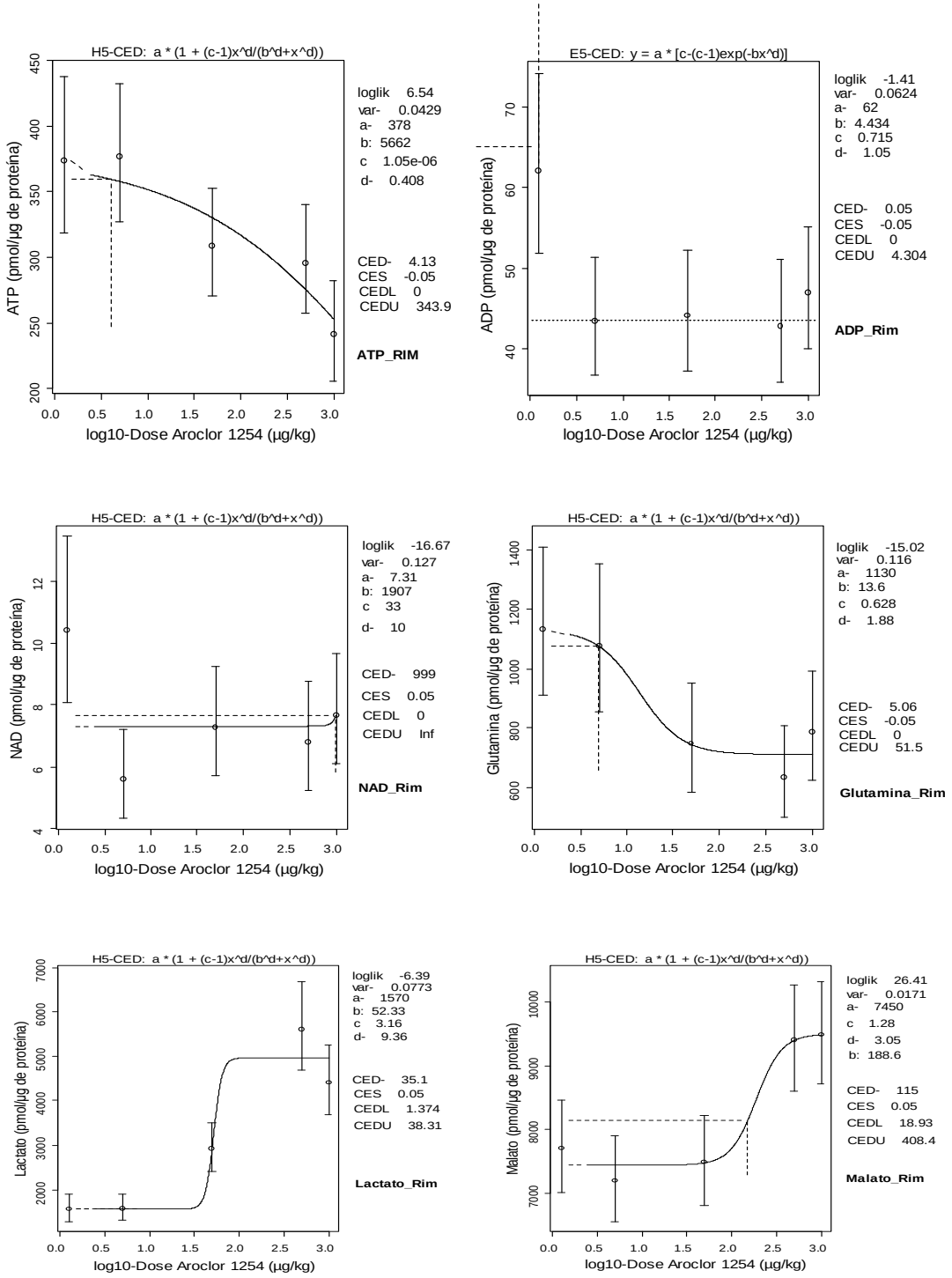


Tabela 13 - Efeito do Aroclor 1254 nos níveis de metabólitos intermediários no rim dos animais.

	Efeito	CES (%)	CED (µg/kg)	CEDL (µg/kg)	CEDU (µg/kg)
ATP	↓	0,05	4,13	0	343,9
ADP	↓	0,05	0,05	0	4,304
NAD+	↓	0,05	999	0	_____
glutamina	↓	0,05	5,06	0	51,5
lactato	↑	0,05	35,1	1,374	38,31
malato	↑	0,05	115	18,93	408,3

↓ ↑ diminuição ou aumento significativo do parâmetro avaliado em comparação com o grupo controle. Os dados foram ajustados com o software Proast. O CES (tamanho do efeito crítico) foi definido em 5%. A dose de efeito crítico correspondente (CED) é representada pela linha pontilhada vertical. CEDL e CEDU representam o limite inferior e superior do nível de confiança de 90%.

4.2.2.3. Quantificação das marcas epigenéticas 5-mC e 5-hmC no DNA nuclear e mitocondrial do rim

Houve redução dos níveis de 5-hmC no DNA mitocondrial renal dos animais expostos a 1000 µg/kg de Aroclor 1254, comparando com o grupo controle (figura 22 D). Não houve diferença dos níveis de 5-mC em DNA mitocondrial, ou dos níveis de 5-mC e 5-hmC no DNA nuclear.

A modelagem de *benchmark* foi aplicada para os níveis de 5-hmC encontrados em DNA mitocondrial, tendo sido calculados CED, CEDL e CEDU de 30,1 µg/kg, 10,47 µg/kg e 106 µg/kg de Aroclor 1254, respectivamente (figura 23).

Figura 22. Níveis de 5-mC e 5-hmC em DNA nuclear (A e B) e mitocondrial (C e D) em rim de camundongos expostos ao Aroclor 1254. Os dados são apresentados como média± erro padrão da média. N= 8 a 10 animais por grupo. *P<0,05 comparando com o grupo controle.

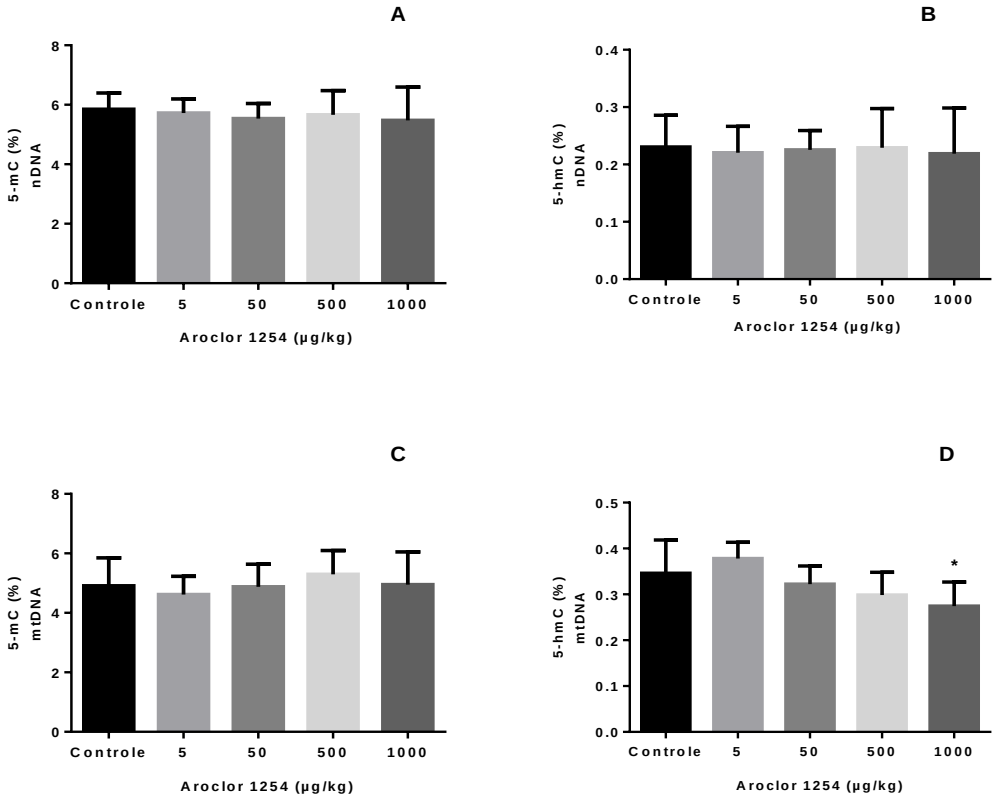
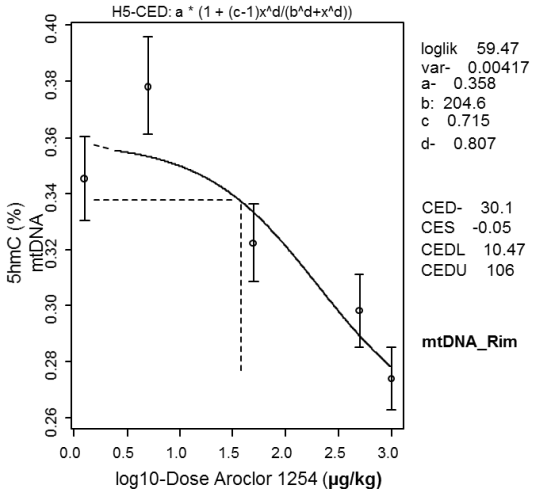


Figura 23. Análise da relação dose-efeito para os níveis de 5-hmC em DNA mitocondrial do tecido renal dos animais após exposição ao Aroclor 1254 em diferentes doses. O CES foi de 5%. A dose de efeito crítico correspondente (CED) é representada por linha pontilhada vertical. O limite inferior e superior do intervalo de confiança de 90% são marcados como CEDL e CEDU. As doses de Aroclor 1254 são apresentadas como log10.

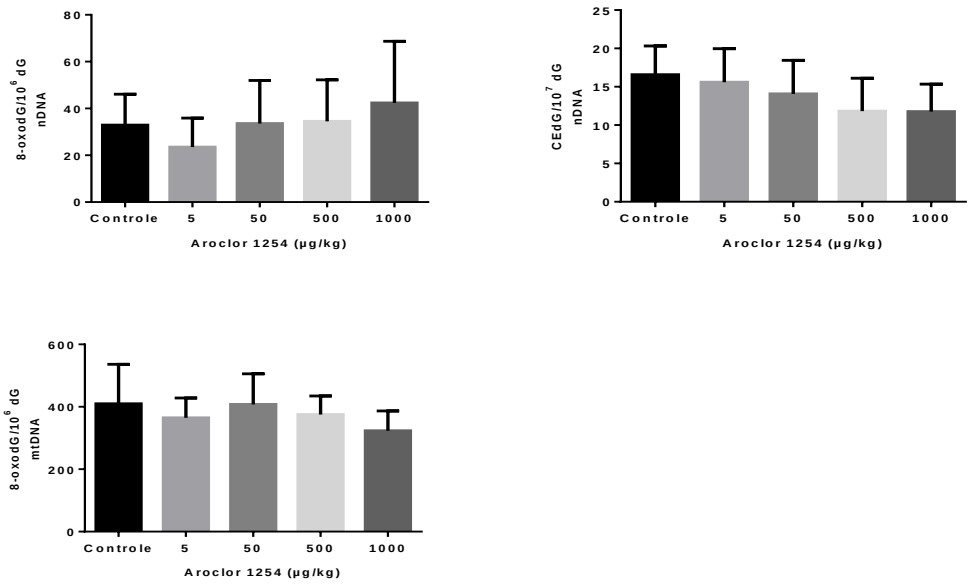


Segundo Fleisch et al. (2015), os desreguladores endócrinos podem interferir na expressão de genes mediada por hormônios via alterações nas transduções de sinais e alterações epigenéticas. No entanto, alterações epigenéticas podem ocorrer sem a mediação de receptores (FLEISCH; WRIGHT; BACCARELLI, 2015). Alterações epigenéticas são fundamentais para o desenvolvimento e progressão do câncer (FEINBERG, 2004), mas pouco se sabe sobre os efeitos dessas alterações em DNA mitocondrial. A queda dos níveis de 5-hmC no DNA mitocondrial pode significar menos oxidação de 5-mC para 5-hmC, o que pode levar a aumento dos níveis de 5-mC em genes que são fundamentais para a manutenção da cadeia de transporte de elétrons, diminuindo a transcrição desses genes. Essa alteração epigenética pode manter estável ao longo das gerações celulares a reprogramação metabólica das células, diminuindo a geração de ATP via fosforilação oxidativa, com consequente aumento da glicólise aeróbica.

4.2.2.4. Quantificação das lesões 8-oxodG e CEdG em DNA nuclear e mitocondrial de rim

Os dados de 8-oxodG em DNA nuclear e mitocondrial e de CEdG em DNA nuclear estão apresentados na figura 24, não tendo sido observadas diferenças dos grupos expostos em relação ao controle.

Figura 24 - Níveis de CEdG e 8-oxodG em DNA nuclear e mitocondrial do tecido renal de camundongos expostos ao Aroclor 1254 em diferentes doses. Análises estatísticas utilizando teste de ANOVA seguido de pós teste Bonferroni não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.



Em estudo realizado por Li et al. (2005) foram avaliados os níveis de 8-oxodG em rim e fígado de animais expostos a diferentes concentrações de PCBs e 1,1,-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etileno (p,p'-DDE). As concentrações de PCBs e DDE foram determinadas por cromatografia gasosa / espectrometria de massas (GC / MS) após homogeneização da amostra, saponificação, extração líquido-líquido e extração em fase sólida de sílica gel. Não foi observada correlação significativa entre DDE e 8-oxodG ou PCB e 8-oxodG para os diferentes grupos estudados (LI, C.-S. et al., 2005).

Em resumo, verificou-se no rim dos animais expostos ao Aroclor 1254 a indução de estresse oxidativo (aumento dos níveis de MDA no tecido, mas não de dano oxidativo em DNA), reprogramação metabólica, e queda do nível global de 5-hmC no DNA mitocondrial. O cálculo estatístico da dose de efeito crítico (CED) revelou que doses muito inferiores às testadas podem afetar os parâmetros investigados (por exemplo, nível de MDA e o metabolismo celular). As alterações metabólicas induzidas no tecido renal foram diferentes das induzidas no tecido hepático e observou-se diferença entre os dois tecidos quanto à indução de alterações epigenéticas e genotóxicas.

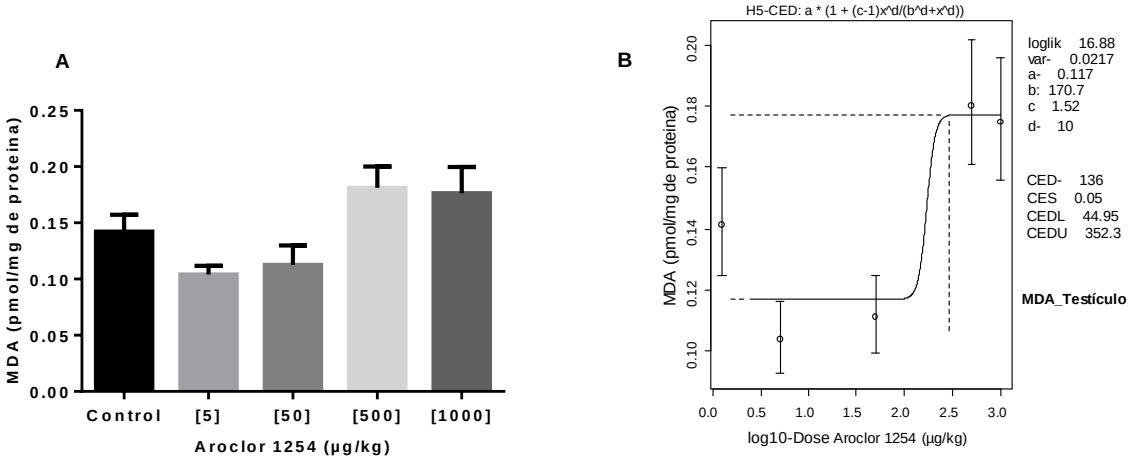
4.2.3. Testículos e espermatozoides

4.2.3.1. Quantificação de malondialdeído em testículos

Os testículos dos animais expostos ao Aroclor 1254 não apresentaram um aumento significativo dos níveis de MDA em relação ao grupo controle (figura 25 A e tabela 14). Entretanto, foi aplicada a abordagem de *benchmark* para análise da relação dose efeito, tendo sido calculados CED de 136 µg/kg, CEDL de 44,95 µg/kg e CEDU de 352,3 µg/kg de Aroclor 1254.

Figura 25 - Níveis de MDA-DNPH em testículo de camundogos expostos ao Aroclor 1254 durante 50 dias. (A) Resultados são expressos como média±erro padrão. Os dados não apresentaram diferença significativa entre o grupos expostos e controle. Os resultados foram obtidos pelo método de derivatização com dinitrofenilhidrazina seguido da análise por HPLC-DAD (λ = 306 nm). (B) Análise da relação dose-efeito para níveis de MDA em testículo de camundongos expostos a diferentes doses de Aroclor 1254 durante 50 dias. O tamanho do efeito crítico (CES) foi ajustado em 5%. A dose de efeito crítico correspondente e seu limite

inferior e superior do intervalo de confiança de 90% são marcados como CED, CEDL e CEDU. As doses de Aroclor 1254 são apresentadas como log10.



Experimentos realizados por Lovato et al. (2015) demostraram que a exposição a PCBs levou a aumentos significativos dos níveis de ROS e TBARS em testículo, e uma diminuição significativa dos níveis de tióis totais (T-SHs), evidenciando um estado de estresse oxidativo. A peroxidação lipídica observada em ratos expostos a PCBs é atribuída ao aumento da produção de ROS e à depleção do estado antioxidante testicular (LOVATO et al., 2016).

Em testículo, foi descrito que a indução de ROS por exposição ao Aroclor 1254 levou à lesão do tecido testicular, iniciando a auto-propagação da reação de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica no testículo foi associada a alterações metabólicas dos animais expostos aos PCBs, e o seu aumento pode levar à diminuição da função da membrana (MURUGESAN et al., 2005). ROS induzem apoptose das células germinativas testiculares por diversos mecanismos regulatórios (ATEŞŞAHIN et al., 2010).

ROS podem causar danos aos espermatozoides, DNA mitocondrial e estruturas de membrana das organelas citoplasmáticas através da oxidação de fosfolípidos, proteínas e nucleotídeos. Peróxido de hidrogênio e radical hidroxila parecem ser os principais agentes dos efeitos citotóxicos nos espermatozoides. Um dos principais mecanismos de ação dos PCBs é a indução de estresse oxidativo (ALY, H. A. et al., 2017; ALY, H. A.; DOMÈNECH; ABDEL-NAIM, 2009; AYDIN; ERKAN, 2017).

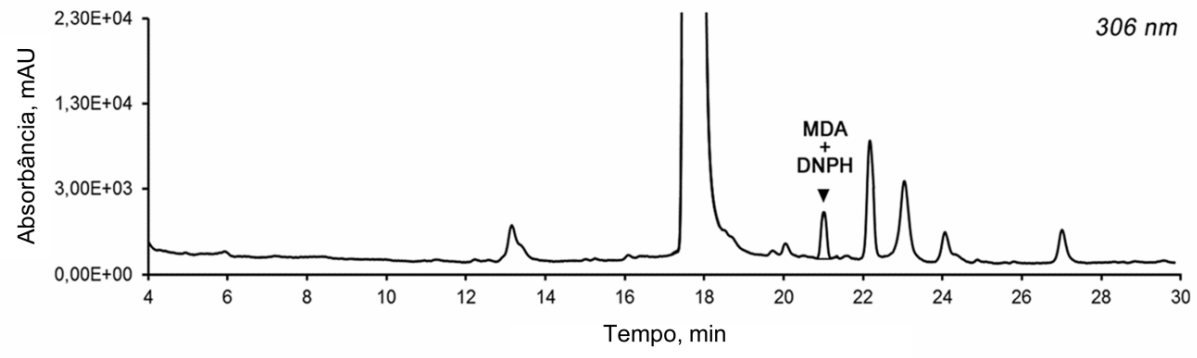
Na tabela 14 são apresentados os níveis de MDA em plasma, testículo, fígado e rim. Na figura 26 encontra-se um cromatograma representativo das análises.

Tabela 14 - Níveis de MDA-DNPH em plama, fígado, rim e testículo dos animais expostos ao Aroclor 1254.

MDA	Controle	5 µg/kg	50 µg/kg	500 µg/kg	1000 µg/kg	Valor dep
Plasma (µM)	2,054±0,32	1,34±0,28	1,65±0,21	3,02±0,54	4,14±0,44*	< 0,0001
Fígado	0,48±0,07	0,64±0,11	0,57±0,13	0,84±0,15	1,11±0,21*	0,0311
Rim	0,19±0,03	0,25±0,01	0,27±0,02	0,33±0,05*	0,25±0,02*	0,0498
Testículos	0,14±0,015	0,10±0,01	0,11±0,02	0,18±0,02	0,18±0,024	0,0082

Valores de MDA expressos como média±erro padrão. plasma (µM) e fígado, rim, testículo (pmol/mg de proteina).

Figura 26 - Cromatograma representativo da análise do produto MDA-DNPH em amostra de plasma, fígado, rim e testículo.



4.2.3.2. Quantificação de intermediários do metabolismo celular em testículos

Os dados encontram-se na tabela 15. A exposição ao Aroclor 1254 levou à diminuição estatisticamente significativa da concentração de glutamato no grupo que recebeu 500 µg/kg; malato e fumarato nos grupos que receberam 5 µg/kg, 50 µg/kg, 500 µg/kg e 1000 µg/kg; succinato nos grupos que receberam 5 µg/kg e 50 µg/kg; e da razão NADH/NAD^+ nos grupos que receberam 5 µg/kg, 500 µg/kg e 1000 µg/kg.

Tabela 15 - Níveis de metabólitos intermediários no testículo após exposição ao Aroclor 1254. (N=7 a 8; média ± desvio padrão; valores em pmol/µg de proteína; Anova e pós teste Bonferroni).

	Controle	5 µg/kg	50 µg/kg	500 µg/kg	1000 µg/kg	valor-p
ATP	47,37±6,94	62,41±8,35	62,57±16,56	57,99±10,24	59,11±12,17	0,1061
ADP	0,88±0,15	1,07±0,15	0,61±0,16	0,92±0,21	0,95±0,29	0,0067
NADH	25,04±3,90	24,28±6,50	25,17±6,56	19,59±5,75	19,93±5,42	0,1995
NAD^+	0,78±0,19	1,16±0,29	0,95±0,38	1,29±0,36	1,34±1,01	0,2859
$NADP^+$	21,73±5,202	26,51±5,31	26,17±10,55	17,18±5,17	16,15±1,402	0,0512
NADPH	2,30±1,51	1,60±0,39	3,55±3,54	1,11±0,30	0,99±0,35	0,0872
Glutamato	5477±1571	4519±1066	4427±373,4	3300±407,5*	3737±761,1*	0,0076
Glutamina	815,6±162,6	673,8±85,47	705,7±206,5	713,4±181,7	672,4±143,3	0,0276
Lactato	6935±1931	7432±1223	6583±2403	4255±602,1	5161±2864	0,0774
Piruvato	460,5±67,74	351,6±98,23	492,0±290,6	312,9±126,7	380,1±152,4	0,2441
Malato	322,1±113,9	185,9±58,69*	189,1±56,60*	113,8±47,44*	117,9±20,41*	< 0,0001
Succinato	291,3±226,1	90,75±13,05*	100,3±75,11*	141,8±52,92	130,1±37,62	< 0,0001
Fumarato	53,15±13,19	30,90±7,387*	36,02±13,08*	23,54±6,917*	20,00±2,260*	< 0,0001
NADH/ NAD^+	33,32±7,03	21,52±5,14*	24,87±3,23	13,32±4,45*	15,08±5,86*	< 0,0001

A modelagem de *benchmark dose* foi utilizada para avaliar a relação dose efeito de Aroclor nos níveis de metabólitos intermediários (tabela 16 e figura 27). Os níveis de CED

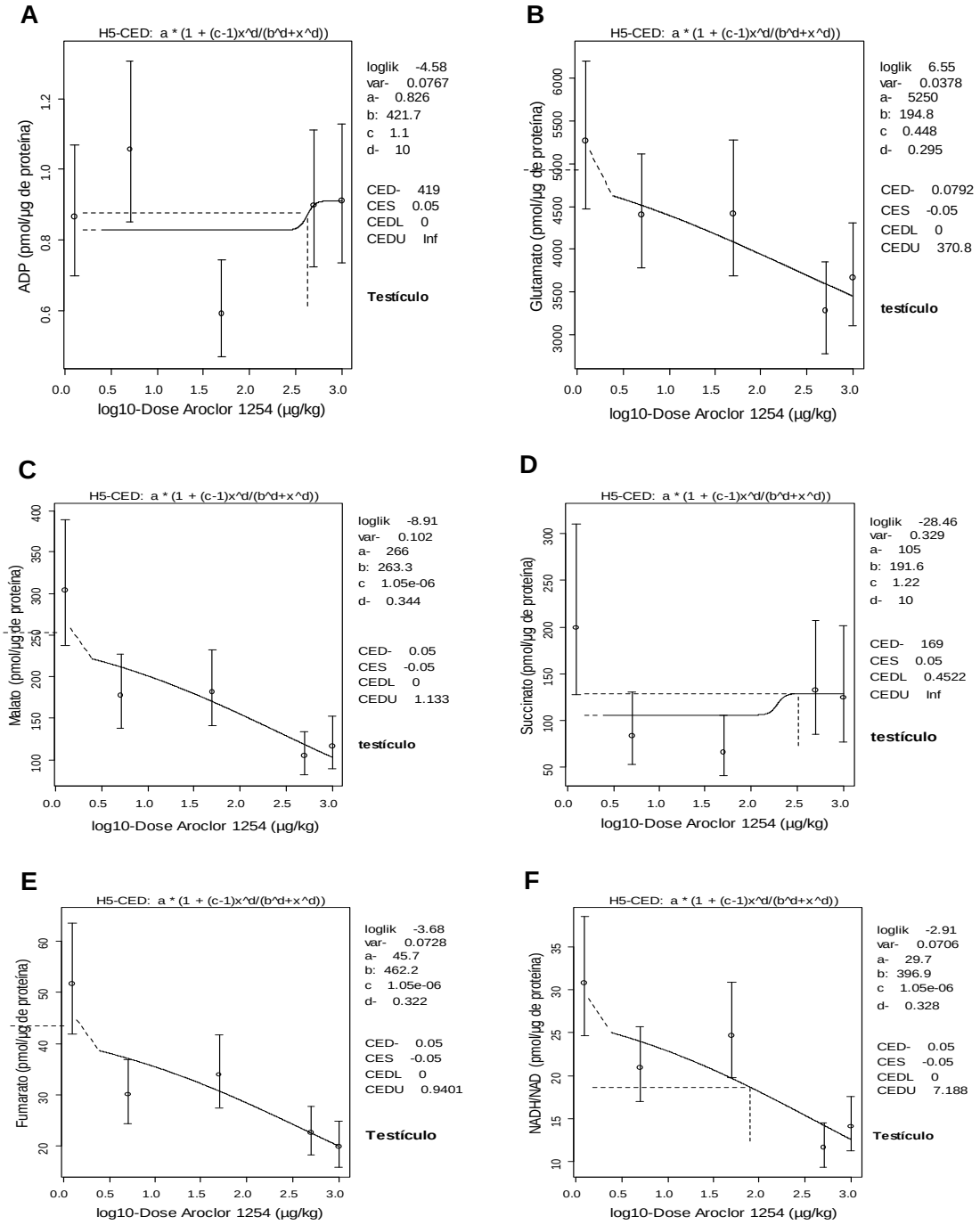
calculados para ADP, succinato, glutamato, malato, fumarato e razão NADH/NAD$^+$ foram, respectivamente, 419 µg/kg, 169 µg/kg, 0,0792 µg/kg, 0,05 µg/kg, 0,05 µg/kg, 0,05 µg/kg. Os respectivos CEDL foram 0 µg/kg, 0,4522 µg/kg, 0 µg/kg, 0 µg/kg, 0 µg/kg, 0 µg/kg. Para glutamato, malato, fumarato e razão NADH/NAD$^+$ os CEDU calculados foram 370,8 µg/kg, 1,133 µg/kg, 0,9401 µg/kg e 7,188 µg/kg. Para os metabólitos que apresentaram "inf" significa que os CEDU não foram calculados. Os níveis de ADP, NADP+, glutamina obtiveram significância de $p<0,05$, mas não apresentaram uma diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos de animais tratados com Aroclor 1254 em relação ao grupo controle.

Tabela 16 - Efeito do Aroclor 1254 nos níveis de metabólitos intermediários em testículos dos animais.

	Efeito	CES (%)	CED **(µg/kg)**	CEDL **(µg/kg)**	CEDU **(µg/kg)**
ADP	↑	0,05	419	0	inf
succinato	↓	0,05	169	0,45	inf
glutamato	↓	0,05	0,079	0	370,8
malato	↓	0,05	0,05	0	1,13
fumarato	↓	0,05	0,05	0	0,94
NADH/NAD$^+$	↓	0,05	0,05	0	7,19

↓ ↑ diminuição ou aumento significativo do parâmetro avaliado em comparação com o grupo controle. Os dados foram ajustados com o software Proast. O CES (tamanho do efeito crítico) foi definido em 5%. A dose de efeito crítico correspondente (CED) é representada pela linha pontilhada vertical. CEDL e CEDU representam o limite inferior e superior do nível de confiança de 90%.

Figura 27 - Análise da relação dose-efeito para os níveis de intermediários do metabolismo celular em testículo dos animais após exposição ao Aroclor 1254 em diferentes doses. O tamanho do efeito (CES) crítico foi estabelecido em 5%. A dose de efeito crítico correspondente (CED) é representada por linha pontilhada vertical. O limite inferior e superior do intervalo de confiança de 90% são marcados como CEDL e CEDU. As doses de Aroclor 1254 são apresentadas como log10.



Os efeitos metabólicos observados em testículos se assemelham aos observados no fígado dos animais expostos. Apesar da alteração metabólica, houve manutenção da razão

ADP/ATP e não foi observado aumento dos níveis de lactato. O aumento da razão NAD^+/NADH pode indicar maior fluxo de elétrons pela cadeia respiratória mitocondrial e pode explicar a queda dos níveis de intermediários do ciclo de Krebs.

Em estudo realizado por Kennedy et al. (2012) foi observado que TCDD diminuiu a glicólise, levando a redução de equivalentes como NADH e succinado na mitocôndria. Os equivalentes NADH e succinato são essencias para produção de ATP. O NADH é produzido durante a glicólise e tanto o NADH como o succinato são produzidos pelo ciclo de Krebs. Sendo assim, a regulação negativa da glicólise acabaria por conduzir a menores concentrações de equivalentes redutores (KENNEDY et al., 2012).

4.2.3.3. Quantificação das marcas epigenéticas 5-mC e 5-hmC no DNA nuclear e mitocondrial de testículos e de 5-mC no DNA total de espermatozoides

Em DNA mitocondrial de testículo, foi observado aumento significativo dos níveis de 5-hmC nos animais expostos a 5, 50 e 500 µg/kg de Aroclor 1254, comparando com o grupo controle (figura 28 D). Não houve diferença dos níveis de 5-mC em DNA mitocondrial. Foi observado aumento dos níveis de 5-mC em DNA nuclear de testículo dos animais expostos a 5 µg/kg de Aroclor 1254.

Quanto aos espermatozoides, foi observada redução significativa dos níveis de 5-mC nos grupos de animais expostos a 5, 50 e 500 µg/kg de Aroclor (figura 28 E).

A modelagem de *benchmark* foi aplicada aos níveis de 5-hmC em DNA mitocondrial testicular e 5-mC em DNA global de espermatozoides, tendo sido calculado CED de 0,05 µg/kg e CEDL zero para ambos os casos (figura 29 A e B). CEDU para 5-hmC em DNA mitocondrial testicular foi 3,017 µg/kg e para 5-mC em DNA de espermatozoides foi 3,704 µg/kg de Aroclor 1254.

Estudos in vitro e in vivo sugeriram que a neurotoxicidade de PCBs pode ser mediada em parte por efeitos de PCBs na metilação do DNA do cérebro em desenvolvimento. Além disso, os PCBs reduziram os níveis de DNMT e S-adenosilmetionina no fígado de ratos Sprague-Dawley fêmeas na pré-puberdade. Alterações associadas a PCBs na metilação do DNA podem influenciar o desenvolvimento sexual e alterar os padrões específicos de expressão gênica do sexo no cérebro (KEIL; LEIN, 2016). Estudos recentes realizados durante a

embriogênese de Zebrafish sugeriram que a exposição ao poluente pode induzir uma alteração na metilação do DNA, levando a uma disfunção da expressão do gene Dnmt (SPINELLI; CAVALIERI, 2017).

Figura 28 - Níveis de 5-mC e 5-hmC em DNA nuclear e mitocondrial de testículo e DNA global de espermatozoides de camundongos após 50 dias de exposição ao Aroclor 1254. Na figura encontram-se os níveis de 5-mC e 5-hmC em DNA nuclear (A e B) e mitocondrial (C e D). A figura (E) representa os níveis de 5-mC em DNA global de espermatozoides. Os dados são apresentados como média± erro padrão da média. N = 8 a 10 animais por grupo. *P<0,05 comparando diferentes grupos com o grupo controle.

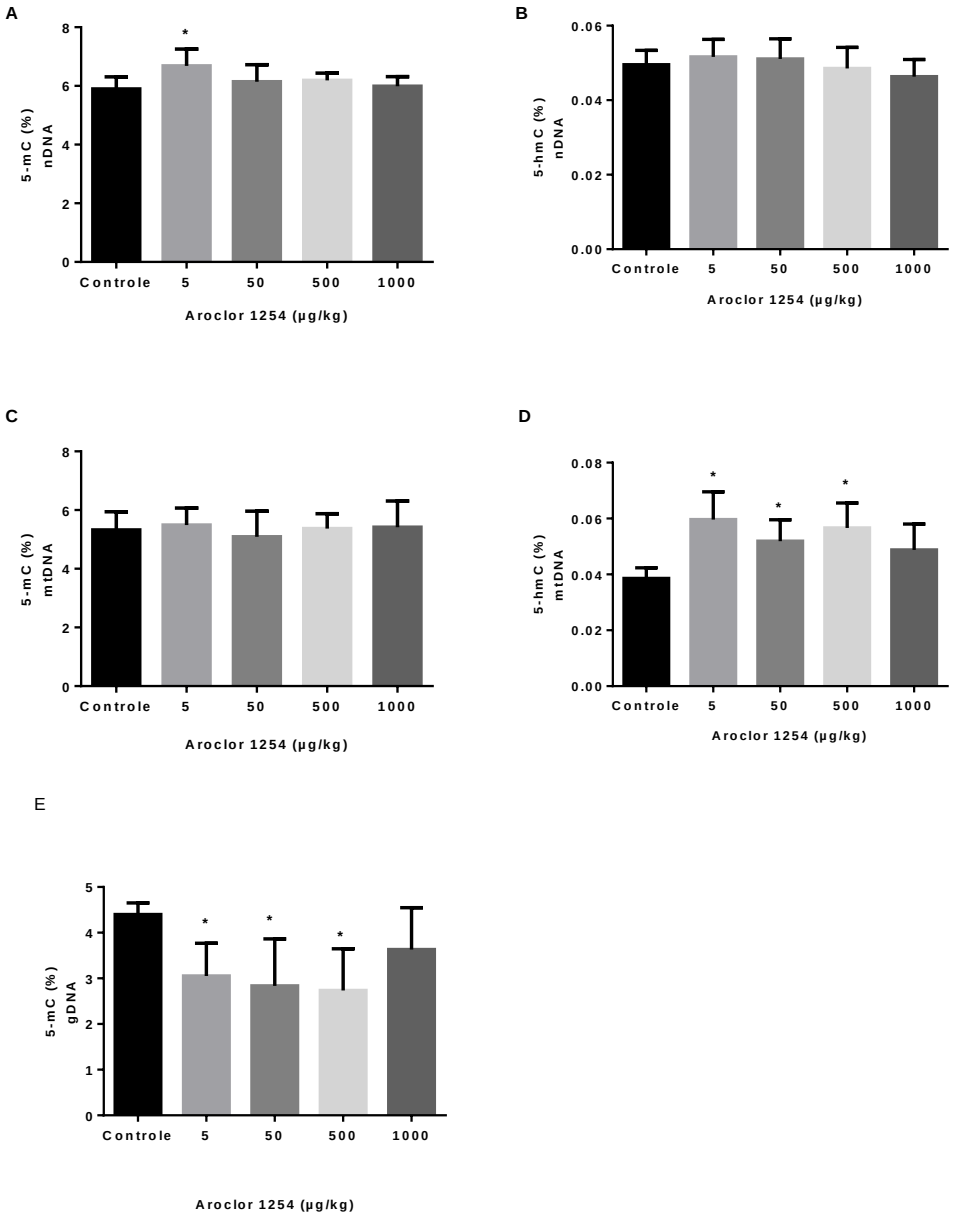
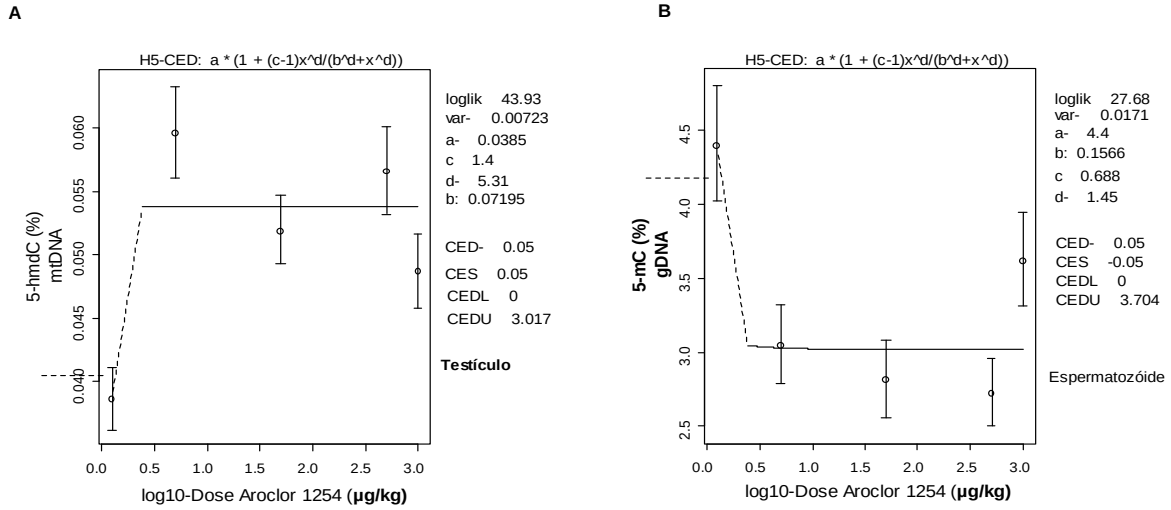


Figura 29 - Análise da relação dose-efeito para as marcas epigenéticas no sistema reprodutor de camundongos após exposição a diferentes doses de Aroclor 1254 durante 50 dias. (A) 5-hmC em DNA mitocondrial de testículo e (B) 5-mC em DNA total de espermatozóides. O CES foi de 5 %. Dose de efeito crítico correspondente (CED) e o limite inferior e superior do intervalo de confiança de 90% são marcados como CEDL e CEDU. As doses de Aroclor 1254 são apresentadas como log10.

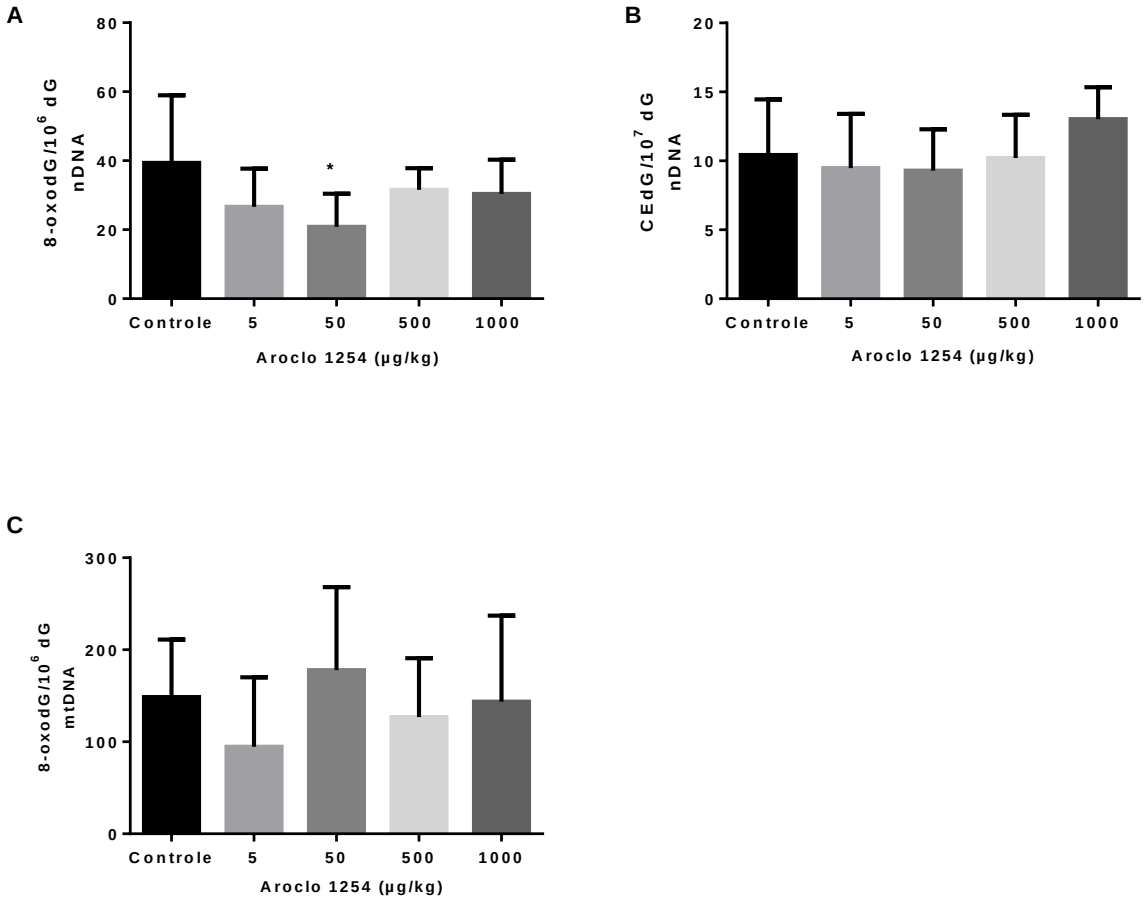


A metilação correta do DNA tem um papel importante na produção de esperma, sendo que a hipermetilação tem sido associada a parâmetros de espermatozóides deficientes, infertilidade masculina idiopática e insuficiência na gravidez (SCHAGDARSURENGIN et al., 2012).

4.2.3.4. Quantificação das lesões 8-oxodG e CEdG em DNA nuclear e mitocondrial de testículos

Foi observada uma redução significativa dos níveis de 8-oxodG no DNA nuclear testicular dos animais expostos a 50 µg/kg de Aroclor 1254 em comparação com o grupo controle (figura 30 A), mas os níveis nos animais do grupo controle estão anormalmente altos. Os níveis de 8-oxodG em DNA mitocondrial (figura 30 C) e CEdG no DNA nuclear (figura 30 B) dos animais expostos não apresentaram alteração significativa em relação ao grupo controle.

Figura 30 - Níveis de 8-oxodG e CEdG em DNA nuclear (A e B), e de 8-oxodG em DNA mitocondrial (C) de testículo de camundongos expostos a diferentes doses de Aroclor 1254. Análise estatística utilizando teste ANOVA seguido de pós teste Bonferroni. *p< 0,05 apresentam diferença significativa em relação ao controle.



Dados da literatura apontam que os contaminantes ambientais, como PCBs, são capazes de elevar os níveis de ROS e induzir desbalanço oxidativo, alterando o processo de apoptose, espermatogênese e esteroidogênese (MATHUR et al., 2011). Tavares et al. (2016) relataram que os PCBs podem interferir com a integridade do DNA nuclear e induzir estresse oxidativo em esperma de rato exposto ao Aroclor 1254. Exposições a baixas concentrações de Aroclor 1254 (10^{-9}, 10^{-8} ou 10^{-7} M) por 3 h induziram o estresse oxidativo e aumentaram dano ao DNA de esperma, a peroxidação lipídica, diminuíram a motilidade do esperma e os níveis de ATP. Além disso, o Aroclor 1254 promoveu a liberação do citocromo c e a ativação da caspase-3, culminando em apoptose (TAVARES et al., 2016).

Em resumo, verificou-se em testículo dos animais expostos ao Aroclor 1254 uma alteração metabólica semelhante à observada no fígado dos animais e diferente do que foi observado no tecido renal, e aumento dos níveis globais de 5-hmC no DNA mitocondrial. Nos espermatozoides observou-se queda dos níveis globais de 5-mC. O cálculo estatístico da dose de efeito crítico (CED) revelou que doses muito inferiores às testadas podem afetar os parâmetros investigados (por exemplo, o metabolismo celular e as marcas epigenéticas) em testículo e esperma.

No Anexo 1 encontra-se um resumo dos dados de todas as amostras avaliadas pela modelagem de benchmark.

5. CONCLUSÃO

Os dados obtidos permitiram verificar que a exposição dos camundongos ao Aroclor 1254 levou a:

1 – aumento da peroxidação lipídica em plasma, fígado e rim, mas não em testículo

2 – alteração do metabolismo intermediário em fígado, rim e testículo

3 – aumento dos níveis de 8-oxodG no DNA mitocondrial de fígado

4 – hipometilação e hipohidroximetilação global do DNA nuclear de fígado, hipohidroximetilação global do DNA mitocondrial de rim, hiperhidroximetilação global do DNA mitocondrial de testículo, e hipometilação global do DNA total de espermatozoides

Dentre os parâmetros avaliados, alterações do metabolismo intermediário e de marcas epigenéticas (5-mC e 5-hmC em DNA nuclear ou mitocondrial) estiveram presentes em todos os tecidos (fígado, rim, testículo), mas com diferenças entre os padrões observados em cada tecido. Os parâmetros mais sensíveis à presença do Aroclor 1254 segundo a modelagem de *benchmark* foram: A) em fígado, o metabolismo celular e os níveis de 5-hmC no DNA nuclear; B) em rim, o metabolismo celular e os níveis de MDA; C) em testículo, o metabolismo celular e os níveis de 5-hmC no DNA mitocondrial; D) em esperma, os níveis de 5-mC no DNA total. Assim, sugere-se o uso de parâmetros de metabolismo celular e marcas epigenéticas no DNA nas avaliações de toxicidade de PCBs a fim de melhor avaliar os riscos relacionados à exposição.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELLA, V. et al. Non-dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB 101, PCB 153 and PCB 180) induce chondrocyte cell death through multiple pathways. **Toxicology letters,** v. 234, n. 1, p. 13-19, 2015.

AHLBORG, U. G. et al. Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs: Report on WHO-ECEH and IPCS consultation, December 1993. **Chemosphere,** v. 28, n. 6, p. 1049-1067, 1994.

AHLBORG, U. G.; HANBERG, A.; KENNE, K. **Risk assessment of polychlorinated biphenyls (PCBs)**. Nordic Council of Ministers, 1992. ISBN 9291200751.

AITKEN, R. J.; CURRY, B. J. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. **Antioxidants & redox signaling,** v. 14, n. 3, p. 367-381, 2011.

AITKEN, R. J.; ROMAN, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Oxidative medicine and cellular longevity,** v. 1, n. 1, p. 15-24, 2008.

AL-ANATI, L. et al. Hydroxyl metabolite of PCB 180 induces DNA damage signaling and enhances the DNA damaging effect of benzo [a] pyrene. **Chemico-biological interactions,** v. 239, p. 164-173, 2015.

ALDINI, G. et al. **Biomarkers for antioxidant defense and oxidative damage**. John Wiley & Sons, 2011. ISBN 0470961759.

ALI, U. et al. Influential role of black carbon in the soil–air partitioning of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the Indus River Basin, Pakistan. **Chemosphere,** v. 134, p. 172-180, 2015.

ALURU, N.; KARCHNER, S. I.; HAHN, M. E. Role of DNA methylation of AHR1 and AHR2 promoters in differential sensitivity to PCBs in Atlantic Killifish, Fundulus heteroclitus. **Aquatic toxicology,** v. 101, n. 1, p. 288-294, 2011.

ALY, H. A. Aroclor 1254 induced oxidative stress and mitochondria mediated apoptosis in adult rat sperm in vitro. **Environmental toxicology and pharmacology,** v. 36, n. 2, p. 274-283, 2013.

ALY, H. A. et al. Lipoic acid and Calligonum comosumon attenuate aroclor 1260-induced testicular toxicity in adult rats. **Environmental toxicology,** v. 32, n. 4, p. 1147-1157, 2017.

ALY, H. A.; DOMÈNECH, Ò. Aroclor 1254 induced cytotoxicity and mitochondrial dysfunction in isolated rat hepatocytes. **Toxicology,** v. 262, n. 3, p. 175-183, 2009a.

_____. Cytotoxicity and mitochondrial dysfunction of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in isolated rat hepatocytes. **Toxicology letters,** v. 191, n. 1, p. 79-87, 2009b.

ALY, H. A.; DOMÈNECH, Ò.; ABDEL-NAIM, A. B. Aroclor 1254 impairs spermatogenesis and induces oxidative stress in rat testicular mitochondria. **Food and chemical toxicology,** v. 47, n. 8, p. 1733-1738, 2009.

ALY, N. et al. Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice. **Pesticide Biochemistry and Physiology,** v. 97, n. 1, p. 7-12, 2010.

AN, J. et al. The toxic effects of Aroclor 1254 exposure on the osteoblastic cell line MC3T3-E1 and its molecular mechanism. **Toxicology,** v. 295, n. 1, p. 8-14, 2012.

ANDRIC, S. A. et al. Inhibition of rat testicular androgenesis by a polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1248. **Biology of reproduction,** v. 62, n. 6, p. 1882-1888, 2000.

ATEŞŞAHIN, A. et al. Modulatory effects of lycopene and ellagic acid on reproductive dysfunction induced by polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) in male rats. **Basic & clinical pharmacology & toxicology,** v. 106, n. 6, p. 479-489, 2010.

ATSDR. TOXICOLOGICAL PROFILE FOR POLYCHLORINATED BIPHENYLS (PCBs). **Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service**, 2000.

AUGUSTO, O. **Radicais Livres: bons, maus e naturais**. Oficina de Textos, 2006. ISBN 9788579751455.

AYDIN, Y.; ERKAN, M. The toxic effects of polychlorinated biphenyl (Aroclor 1242) on Tm3 Leydig cells. **Toxicology and Industrial Health**, p. 0748233717699783, 2017.

BACCARELLI, A.; BOLLATI, V. Epigenetics and environmental chemicals. **Current opinion in pediatrics,** v. 21, n. 2, p. 243, 2009.

BAKER, N. A. et al. Coplanar polychlorinated biphenyls impair glucose homeostasis in lean C57BL/6 mice and mitigate beneficial effects of weight loss on glucose homeostasis in obese mice. **Environ Health Perspect,** v. 121, n. 1, p. 105-110, 2013.

BANUDEVI, S. et al. Role of α-tocopherol on antioxidant status in liver, lung and kidney of PCB exposed male albino rats. **Food and chemical toxicology,** v. 44, n. 12, p. 2040-2046, 2006.

BARBALACE, R. C. The chemistry of polychlorinated biphenyls. **Environmental Chemistry. com**, 2003.

BAYRAKTAR, G.; KREUTZ, M. R. Neuronal DNA Methyltransferases: Epigenetic Mediators between Synaptic Activity and Gene Expression? **The Neuroscientist**, p. 1073858417707457, 2017.

BIANCHINI, F. et al. Inverse correlation between alcohol consumption and lymphocyte levels of 8-hydroxydeoxyguanosine in humans. **Carcinogenesis,** v. 22, n. 6, p. 885-890, 2001.

BREYER, V. et al. Analysis and biological relevance of advanced glycation end-products of DNA in eukaryotic cells. **The FEBS journal,** v. 275, n. 5, p. 914-925, 2008.

BROOKES, P. S. et al. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **American Journal of Physiology-Cell Physiology,** v. 287, n. 4, p. C817-C833, 2004.

BUHA, A. et al. Polychlorinated biphenyls as oxidative stress inducers in liver of subacutely exposed rats: implication for dose-dependence toxicity and benchmark dose concept. **Environmental research,** v. 136, p. 309-317, 2015.

BUHA, A. et al. Relative Liver Weight in Rats Subacutely Exposed to Polychlorinated Biphenyls. In: (Ed.). **Environmental Security Assessment and Management of Obsolete Pesticides in Southeast Europe**: Springer, 2013. p.287-294.

CADET, J.; DOUKI, T. Oxidatively generated damage to DNA by UVA radiation in cells and human skin. **Journal of Investigative Dermatology,** v. 131, n. 5, p. 1005-1007, 2011.

CAI, J.-L. et al. Decrease in prosaposin in spermatozoon is associated with polychlorinated biphenyl exposure. **International journal of clinical and experimental pathology,** v. 8, n. 3, p. 2436, 2015.

CAI, J. et al. A novel effect of polychlorinated biphenyls: impairment of the tight junctions in the mouse epididymis. **toxicological sciences,** v. 134, n. 2, p. 382-390, 2013.

CAI, J. et al. Disruption of spermatogenesis and differential regulation of testicular estrogen receptor expression in mice after polychlorinated biphenyl exposure. **Toxicology,** v. 287, n. 1, p. 21-28, 2011.

CAITO, S. W.; ASCHNER, M. Mitochondrial redox dysfunction and environmental exposures. **Antioxidants & redox signaling,** v. 23, n. 6, p. 578-595, 2015.

CAITOSAMUEL, W. Mitochondrial Redox Dysfunction and Environmental Exposures. **Antioxidants & redox signaling**, 2015.

CAO, H.; JIANG, Y.; WANG, Y. Stereospecific Synthesis and Characterization of Oligodeoxyribonucleotides Containing an N 2-(1-Carboxyethyl)-2 '-deoxyguanosine. **Journal of the American Chemical Society,** v. 129, n. 40, p. 12123-12130, 2007.

CHEN, M.-L. et al. Quantification of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA from hepatocellular carcinoma tissues by capillary hydrophilic-interaction liquid chromatography/quadrupole TOF mass spectrometry. **Clinical chemistry,** v. 59, n. 5, p. 824-832, 2013.

CHEPELEV, N. L. et al. Bisphenol A activates the Nrf1/2-antioxidant response element pathway in HEK 293 cells. **Chemical research in toxicology,** v. 26, n. 3, p. 498-506, 2013.

COGLIANO, J. PCBs: cancer dose-response assessment and application to environmental mixtures. 1996.

COGLIANO, V. J. Assessing the cancer risk from environmental PCBs. **Environmental Health Perspectives,** v. 106, n. 6, p. 317, 1998.

COMMITTEE, E. F. S. A. S. Use of the benchmark dose approach in risk assessment. **EFSA J,** v. 15, p. 7-72, 2009.

COMMITTEE, E. S. et al. Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment. **EFSA Journal,** v. 15, n. 1, p. e04658-n/a, 2017.

COOKE, M. S. et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **The FASEB Journal,** v. 17, n. 10, p. 1195-1214, 2003.

CRUMP, K. S. A new method for determining allowable daily intakes. **Fundamental and applied toxicology,** v. 4, n. 5, p. 854-871, 1984.

DA SILVA CRUVINEL, K. A. et al. PCBS e a contaminação do solo: risco ambiental e à saúde humana (DOI: 10.5216/reec. v7i2. 24263). **REEC-Revista Eletrônica de Engenharia Civil,** v. 7, n. 2, 2013.

DAMSTRA, T. et al. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. **Geneva: World Health Organization**, 2002.

DE AZEVEDO, C. E.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. Toxicologia das bifenilas policloradas. **Oecologia Brasiliensis,** v. 11, n. 2, p. 179-187, 2007.

DE OLIVEIRA, A. A. F. et al. Sustained kidney biochemical derangement in treated experimental diabetes: a clue to metabolic memory. **Scientific Reports,** v. 7, p. 40544, 01/12/online 2017.

DE OLIVEIRA, J. C. Epigenética e doenças humanas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde,** v. 33, n. 1, p. 21-34, 2012.

DENG, X. et al. Digital gene expression analysis of reproductive toxicity of benzo [a] pyrene in male scallop chlamys farreri. **Ecotoxicology and environmental safety,** v. 110, p. 190-196, 2014.

DESAULNIERS, D. et al. Effects of mixtures of polychlorinated biphenyls, methylmercury, and organochlorine pesticides on hepatic DNA methylation in prepubertal female Sprague-Dawley rats. **International journal of toxicology,** v. 28, n. 4, p. 294-307, 2009.

DIZDAROGLU, M. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research,** v. 763, p. 212-245, 2015.

DOGAN, A.; ERISIR, M. Effects of Aroclor 1254 and vitamin E on bone oxidant/antioxidant status in adult, pregnant rats and their pups [j]. **Revue M6d V6t,** v. 163, n. 12, p. 589-594, 2012.

DOGAN, A.; ERIŞIR, M. Alterations of the oxidant/antioxidant equilibrium in liver, brain, kidney and heart tissues of offspring born from pregnant rats exposed to Aroclor 1254 alone or in combination with vitamin E. **REVUE DE MEDECINE VETERINAIRE,** v. 162, n. 7, p. 364-370, 2011.

DONG, H. et al. Polychlorinated biphenyl quinone induces oxidative DNA damage and repair responses: The activations of NHEJ, BER and NER via ATM-p53 signaling axis. **Toxicology and applied pharmacology,** v. 286, n. 1, p. 10-16, 2015.

DUBOIS, M. et al. DNA adducts and P450 induction in human, rat and avian liver cells after exposure to polychlorobiphenyls. **Mutation Research/Genetic Toxicology,** v. 345, n. 3, p. 181-190, 1995.

ENDO, F. et al. Effects of single non-ortho, mono-ortho, and di-ortho chlorinated biphenyls on cell functions and proliferation of the human prostatic carcinoma cell line, LNCaP. **Reproductive Toxicology,** v. 17, n. 2, p. 229-236, 2003.

EPA. Polychlorinated Biphenyls (PCBs). Health Effects of PCBs. 2013. Disponível em: <http://www3.epa.gov/epawaste/hazard/tsd/pcbs/pubs/effects.htm>. Acesso em: 04 October 2015.

EUROPEAN FOOD SAFETY, A. Guidance of the Scientific Committee on Use of the benchmark dose approach in risk assessment. **EFSA Journal,** v. 7, n. 6, p. 1150-n/a, 2009.

FAOLEX. Cape Verde: Resolution No. 18/2011 approving the National Action Plan for the implementation of the Persistent Organic Pollutants Management System. Vol. 2013: Boletim Oficial, I Serie, No. 18, 24 May 2011, p. 704. 2011. Disponível em: <http://faolex.fao.org/cgi-bin/faolex.exe?database=faolex&search_type=link&table=result&lang=eng&format_name=%40ERALL&rec_id=109318 >. Acesso em: 15/10/2015.

FAROON, O.; JONES, D.; DE ROSA, C. Effects of polychlorinated biphenyls on the nervous system. **Toxicology and Industrial Health,** v. 16, n. 7-8, p. 305-333, 2000.

FAROON, O. M. et al. Polychlorinated biphenyls: human health aspects. **Concise international chemical assessment document**, 2003.

FAUBERT, B. et al. Lactate Metabolism in Human Lung Tumors. **Cell,** v. 171, n. 2, p. 358-371. e9, 2017.

FEINBERG, A. P. The epigenetics of cancer etiology. Seminars in cancer biology, 2004. Elsevier. p.427-432.

FERRANTE, M. C. et al. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in European eel (Anguilla anguilla) from the Garigliano River (Campania region, Italy). **Chemosphere,** v. 78, n. 6, p. 709-716, 2010.

FERREIRA, A.; MATSUBARA, L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira,** v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FIELD, J. A.; SIERRA-ALVAREZ, R. Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls. **Environmental pollution,** v. 155, n. 1, p. 1-12, 2008.

FLEISCH, A. F.; WRIGHT, R. O.; BACCARELLI, A. A. Is Environmental Epigenetics Relevant to Endocrine Disease? In: (Ed.). **Environmental Epigenetics**: Springer, 2015. p.55-74.

FULL SEMESTRE, P. Exposure to enveronmental hazards. Endocrine disruptors. Exposure pathway. . 2003. Disponível em: < http://enhs.umn.edu/current/5103/endocrine/mechanisms.html >. Acesso em: 04 october.

GIESY, J. P.; KANNAN, K. Dioxin-like and non-dioxin-like toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for risk assessment. **Critical reviews in toxicology,** v. 28, n. 6, p. 511-569, 1998.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2015. ISBN 0198717482.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, 2015. ISBN 9780198717485.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell,** v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARDY, A. et al. Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment. **EFSA Journal,** v. 15, n. 1, 2017.

HAYASHI, Y. Overview of genotoxic carcinogens and non-genotoxic carcinogens. **Experimental and Toxicologic Pathology,** v. 44, n. 8, p. 465-471, 1992.

HELYAR, S. G. et al. PCB-induced endothelial cell dysfunction: role of poly (ADP-ribose) polymerase. **Biochemical pharmacology,** v. 78, n. 8, p. 959-965, 2009.

HENRY, T. R.; DEVITO, M. J. **Non-dioxin-like PCBs: effects and consideration in ecological risk assessment**. Ecological Risk Assessment Support Center, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency, 2003.

HINTON, D. E.; KLAUNIG, J. E.; LIPSKY, M. M. PCB-induced alterations in teleost liver: a model for environmental disease in fish. **Mar Fish Rev,** v. 40, p. 47-50, 1978.

HOPF, N. B. et al. Evaluation of cumulative PCB exposure estimated by a job exposure matrix versus PCB serum concentrations. **Environmental Science and Pollution Research,** v. 21, n. 10, p. 6314-6323, 2014.

IARC. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Polychlorinated Biphenyls and Polybrominated Biphenyls**. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer: 2016. ISBN ISBN-13: 978-9283213260. ISBN-13: 978-9283201410. ISBN-13: 978-9283213307.

IPCS. POLYCHLORINATED BIPHENYLS: HUMAN HEALTH ASPECTS. **WHO. Concise international chemical assessment document,** v. document 55, 2003.

JACOBSON, J. L. et al. A Benchmark Dose Analysis of Prenatal Exposure to Polychlorinated Biphenyls. **Environmental Health Perspectives,** v. 110, n. 4, p. 393-398, 2002.

JENG, H. A. Exposure to endocrine disrupting chemicals and male reproductive health. **Frontiers in public health,** v. 2, 2014.

KABIR, E. R.; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, I. A Review on Endocrine Disruptors and their Possible Impacts on Human Health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 2015.

KEIL, K. P.; LEIN, P. J. DNA methylation: a mechanism linking environmental chemical exposures to risk of autism spectrum disorders? **Environmental epigenetics,** v. 2, n. 1, 2016.

KENNEDY, L. H. et al. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated production of reactive oxygen species is an essential step in the mechanism of action to accelerate human keratinocyte differentiation. **toxicological sciences,** v. 132, n. 1, p. 235-249, 2012.

KENNYP. Critical Issues in Benchmark Calculations from Continuous Data. **Critical Reviews in Toxicology,** v. 32, n. 3, p. 133-153, 2002/01/01 2002.

KIMBROUGH, R. D. et al. Mortality among capacitor workers exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs), a long-term update. **International archives of occupational and environmental health,** v. 88, n. 1, p. 85-101, 2015.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull (Lange)**. AMGH Editora, 2009. ISBN 8580551323.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M.; HOCEVAR, B. A. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. **Toxicologic pathology,** v. 38, n. 1, p. 96-109, 2010.

KLING, D.; GAMBLE, W. In vivo inhibition of citrate cleavage enzyme by polychlorinated biphenyls. **Cellular and Molecular Life Sciences,** v. 37, n. 12, p. 1258-1259, 1981.

KOIFMAN, S. et al. Exposição aos agrotóxicos e câncer ambiental. **É veneno ou é remédio**, p. 75-99, 2003.

KRUMM, P. PCBs: measuring the danger. **Journal of environmental health,** v. 64, n. 10, p. 31, 2002.

KRUMWIEDE, D.; HUEBSCHMANN, H. **Analysis of PCBs in Food and Biological Samples Using GC-Triple Quadrupole MS-MS**. 2008. 42-43

LANGER, P. Persistent organochlorinated pollutants (PCB, DDE, HCB, dioxins, furans) and the thyroid--review 2008. **Endocrine regulations,** v. 42, n. 2-3, p. 79-104, 2008.

LEES, R. Kidney cancer in utility workers exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs). **British journal of industrial medicine,** v. 47, n. 5, p. 358, 1990.

LI, C.-S. et al. Analysis of Oxidative DNA Damage 8-Hydroxy-2 ‘-deoxyguanosine as a Biomarker of Exposures to Persistent Pollutants for Marine Mammals. **Environmental science & technology,** v. 39, n. 8, p. 2455-2460, 2005.

LI, R. et al. Effect of caffeic acid derivatives on polychlorinated biphenyls induced hepatotoxicity in male mice. **Journal of biomedical research,** v. 28, n. 5, p. 423, 2014.

LOCHHEAD, P. et al. Etiologic field effect: reappraisal of the field effect concept in cancer predisposition and progression. **Modern Pathology,** v. 28, n. 1, p. 14-29, 2015.

LOUREIRO, A. P. D. M. **Caracterização e detecção de adutos entre 2'-desoxiguanosina e trans, trans-2, 4-decadienal**. 2000. Universidade de São Paulo

LOUREIRO, A. P. M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Química Nova,** v. 25, n. 5, p. 777-793, 2002.

LOVATO, F. et al. Quercetin ameliorates polychlorinated biphenyls-induced testicular DNA damage in rats. **Andrologia,** v. 48, n. 1, p. 51-58, 2016.

LU, C.-F. et al. Combined effects of repeated administration of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and polychlorinated biphenyls on kidneys of male rats. **Archives of environmental contamination and toxicology,** v. 57, n. 4, p. 767-776, 2009.

LU, C. et al. NMR-based metabonomic analysis of the hepatotoxicity induced by combined exposure to PCBs and TCDD in rats. **Toxicology and applied pharmacology,** v. 248, n. 3, p. 178-184, 2010.

LUDEWIG, G. et al. Metabolic activation of PCBs to carcinogens in vivo—a review. **Environmental toxicology and pharmacology,** v. 25, n. 2, p. 241-246, 2008.

MAJDIC, G.; SAUNDERS, P. T. Altered gene expression in the fetal rat testis following the oestrogen exposure. **Acta Chimica Slovenica,** v. 45, p. 59-68, 1998.

MARNETT, L. J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis,** v. 21, n. 3, p. 361-370, 2000.

MATEOS, R. et al. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress: Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. **Journal of Chromatography B,** v. 827, n. 1, p. 76-82, 2005.

MATHUR, P. P. et al. Environmental toxicants and testicular apoptosis. **Open Reprod Sci J,** v. 3, p. 114-24, 2011.

MAYES, B. et al. Comparative carcinogenicity in Sprague–Dawley rats of the polychlorinated biphenyl mixtures Aroclors 1016, 1242, 1254, and 1260. **Toxicological Sciences,** v. 41, n. 1, p. 62-76, 1998.

MILLS III, S. A.; THAL, D. I.; BARNEY, J. A summary of the 209 PCB congener nomenclature. **Chemosphere,** v. 68, n. 9, p. 1603-1612, 2007.

MILOVANOVIC, V. et al. Oxidative stress and renal toxicity after subacute exposure to decabrominated diphenyl ether in Wistar rats. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-8, 2015.

MIMICA-DUKIĆ, N. et al. The effect of plant secondary metabolites on lipid peroxidation and eicosanoid pathway. In: (Ed.). **Lipid Peroxidation**: InTech, 2012.

MIRBAHAI, L. et al. DNA methylation in liver tumorigenesis in fish from the environment. **Epigenetics,** v. 6, n. 11, p. 1319-1333, 2011.

MOAZAMIAN, R. et al. Oxidative stress and human spermatozoa: diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation. **MHR: Basic science of reproductive medicine,** v. 21, n. 6, p. 502-515, 2015.

MOHANTY, G. et al. **Genotoxicity Testing in Pesticide Safety Evaluation**. INTECH Open Access Publisher, 2011. ISBN 9533074574.

MURUGESAN, P. et al. Impact of polychlorinated biphenyl Aroclor 1254 on testicular antioxidant system in adult rats. **Human & experimental toxicology,** v. 24, n. 2, p. 61-66, 2005.

NAVILLE, D. et al. Low-dose food contaminants trigger sex-specific, hepatic metabolic changes in the progeny of obese mice. **The FASEB Journal,** v. 27, n. 9, p. 3860-3870, 2013.

NCBI. 2,2',3,3',4-Pentachlorobiphenyl. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=40470. 2018. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_2__3_3__4-pentachlorobiphenyl>. Acesso em: Feb. 22, 2018.

NEGRATO, E. et al. Expression of 8-OHdG in Zosterisessor ophiocephalus from the Venetian lagoon, Italy. **European journal of histochemistry: EJH,** v. 57, n. 1, 2013.

NICOLOPOULOU-STAMATI, P.; PITSOS, M. The impact of endocrine disrupters on the female reproductive system. **Human Reproduction Update,** v. 7, n. 3, p. 323-330, 2001.

NISHIHARA, Y.; UTSUMI, K. Studies on the response of isolated rat liver mitochondria to polychlorinated biphenyls (Kanechlors®). **Archives of environmental contamination and toxicology,** v. 14, n. 1, p. 65-71, 1985.

NOGUEIRA, D. P. et al. Acúmulo de policloretos de bifenila na população do Grande São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública,** v. 21, n. 4, p. 279-290, 1987.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1. **Free radical biology and medicine,** v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

NRC. **Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process**. National Research Council. National Academies Press, 1983. ISBN 9780309033497.

NTP. National Toxicology Program. Report on Carcinogens, Fourteenth Edition.; Research Triangle Park, NC: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. . 2016. Disponível em: < http://ntp.niehs.nih.gov/go/roc14/; https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/content/profiles/polychlorinatedbiphenyls.pdf >.

OLIVEIRA, T. F. D. **Citotoxicidade do corante dinitrofenilazo CI DB291: biotransformação, estresse oxidativo e alteração epigenética em células HepG2**. 2012. Universidade de São Paulo

PARKINSON, A.; SAFE, S. Mammalian biologic and toxic effects of PCBs. In: (Ed.). **Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Mammalian and Environmental Toxicology**: Springer, 1987. p.49-75. ISBN 3642705529.

PASSATORE, L. et al. Phytoremediation and bioremediation of polychlorinated biphenyls (PCBs): State of knowledge and research perspectives. **Journal of hazardous materials,** v. 278, p. 189-202, 2014.

PATHAK, S.; KUNDU, R. Low concentration of Aroclor 1254 affects membrane bound ion dependent ATPases in mice kidney. **Bioscan, 8 (1)**, p. 1-10, 2013.

PATTERSON JR, D. G. et al. Levels of non-ortho-substituted (coplanar), mono-and di-ortho-substituted polychlorinated biphenyls, dibenzo-p-dioxins, and dibenzofurans in human serum and adipose tissue. **Environmental health perspectives,** v. 102, n. Suppl 1, p. 195, 1994.

PENTEADO, J. C. P.; VAZ, J. M. O legado das bifenilas policloradas (PCBs). **Química Nova,** v. 24, n. 3, p. 390-398, 2001.

PEREG, D.; ROBERTSON, L. W.; GUPTA, R. C. DNA adduction by polychlorinated biphenyls: adducts derived from hepatic microsomal activation and from synthetic metabolites. **Chemico-biological interactions,** v. 139, n. 2, p. 129-144, 2002.

PETERSEN, M. et al. Spermatogenic capacity in fertile men with elevated exposure to polychlorinated biphenyls. **Environmental research,** v. 138, p. 345-351, 2015.

PFLIEGER-BRUSS, S.; SCHUPPE, H. C.; SCHILL, W. B. The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals. **Andrologia,** v. 36, n. 6, p. 337-345, 2004.

PRAVETTONI, A. et al. Ontogenetic development, sexual differentiation, and effects of Aroclor 1254 exposure on expression of the arylhydrocarbon receptor and of the arylhydrocarbon receptor nuclear translocator in the rat hypothalamus. **Reproductive toxicology,** v. 20, n. 4, p. 521-530, 2005.

QIAN, Y. et al. Polychlorinated Biphenyls (PCBs) Inhibit Hepcidin Expression through an Estrogen-Like Effect Associated with Disordered Systemic Iron Homeostasis. **Chemical research in toxicology**, 2015.

QUEIROZ, E. K. R. D.; WAISSMANN, W. Occupational exposure and effects on the male reproductive system. **Cadernos de Saúde Pública,** v. 22, n. 3, p. 485-493, 2006.

QUEROL, M. V. M.; QUEROL, E.; GOMES, N. N. A. Fator de condição gonadal, índice hepatossomático e recrutamento como indicadores do período de reprodução de Loricariichthys platymetopon (Osteichthyes, Loricariidae), bacia do rio Uruguai médio, sul do Brasil. **Iheringia, Série Zoologia,** v. 92, n. 3, p. 79-84, 2002.

REPETTO, M.; BOVERIS, A.; SEMPRINE, J. **Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination**. INTECH Open Access Publisher, 2012. ISBN 953510716X.

ROBERTS, S. M.; JAMES, R. C.; WILLIAMS, P. L. **Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications**. Wiley, 2014. ISBN 9781118982518.

ROBERTSON, L. W.; LUDEWIG, G. Polychlorinated Biphenyl (PCB) carcinogenicity with special emphasis on airborne PCBs. **Gefahrstoffe, Reinhaltung der Luft= Air quality control/Herausgeber, BIA und KRdL im VDI und DIN,** v. 71, n. 1-2, p. 25, 2011.

ROBERTSON, L. W.; SULKOWSKI, W.; HENNIG, B. **Focus on PCBs: Recent advances in environmental distribution and health effects-Preface**: ELSEVIER SCIENCE BV PO BOX 211, 1000 AE AMSTERDAM, NETHERLANDS 2008.

RUIZ-HERNANDEZ, A. et al. Environmental chemicals and DNA methylation in adults: a systematic review of the epidemiologic evidence. **Clinical epigenetics,** v. 7, n. 1, p. 55, 2015.

RUSIECKI, J. A. et al. Global DNA hypomethylation is associated with high serum-persistent organic pollutants in Greenlandic Inuit. **Environ Health Perspect,** v. 116, n. 11, p. 1547-1552, 2008.

SAEEIDI, A. A New Approach to Genetic Factors of Men's Infertility: A Case Study. **International Journal of Scientific & Engineering Research,** v. 5, n. 9, 2014

SAFE, S. H. Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. **Critical reviews in toxicology,** v. 24, n. 2, p. 87-149, 1994.

SAND, S.; VICTORIN, K.; FILIPSSON, A. F. The current state of knowledge on the use of the benchmark dose concept in risk assessment. **Journal of Applied Toxicology,** v. 28, n. 4, p. 405-421, 2008.

SANTOS, F. A. D. **Adutos de DNA relacionados ao estresse oxidativo e glicação avançada em ratos diabéticos**. 2014. Universidade de São Paulo

SCHAGDARSURENGIN, U.; PARADOWSKA, A.; STEGER, K. Analysing the sperm epigenome: roles in early embryogenesis and assisted reproduction. **Nature Reviews Urology,** v. 9, n. 11, p. 609-619, 2012.

SCHILDERMAN, P. et al. Induction of DNA adducts by several polychlorinated biphenyls. **Environmental and molecular mutagenesis,** v. 36, n. 2, p. 79-86, 2000.

SCHLEZINGER, J. J. et al. Uncoupling of cytochrome P450 1A and stimulation of reactive oxygen species production by co-planar polychlorinated biphenyl congeners. **Aquatic toxicology,** v. 77, n. 4, p. 422-432, 2006.

SCHÜBELER, D. Function and information content of DNA methylation. **Nature,** v. 517, n. 7534, p. 321-326, 2015.

SELVAKUMAR, K. et al. Reactive oxygen species induced oxidative stress, neuronal apoptosis and alternative death pathways. 2013.

SERVICES, U. D. O. H. H. Agency for Toxic Substances and Disease Registry-ATSDR (2000). **Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs)**, 2001.

SHAUGHNESSY, D. T. et al. Mitochondria, energetics, epigenetics, and cellular responses to stress. **Environmental Health Perspectives (Online),** v. 122, n. 12, p. 1271, 2014.

SHEN, K. et al. PCB congeners induced mitochondrial dysfunction in Vero cells. **Journal of hazardous materials,** v. 185, n. 1, p. 24-28, 2011.

SILVA, A. A. D.; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, p. 994-1002, 2010.

SPENCER, W. A. et al. Oxidative DNA adducts after Cu 2+-mediated activation of dihydroxy PCBs: role of reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 46, n. 10, p. 1346-1352, 2009.

SPINELLI, G.; CAVALIERI, V. Environmental epigenetics in zebrafish. **Epigenetics & chromatin,** v. 10, n. 1, p. 46, 2017.

STEFANSKA, B.; VINKEN, M.; SZYF, M. Epigenetics in toxicology: the implications of epigenetic alterations driven by external exposures for human health. **ALTEX Proc. WC8,** v. 1, p. 173-185, 2012.

STOUDER, C.; PAOLONI-GIACOBINO, A. Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the methylation pattern of imprinted genes in the mouse sperm. **Reproduction,** v. 139, n. 2, p. 373-379, 2010.

_____. Specific transgenerational imprinting effects of the endocrine disruptor methoxychlor on male gametes. **Reproduction,** v. 141, n. 2, p. 207-216, 2011.

SZABÓ, C.; DAWSON, V. L. Role of poly (ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia–reperfusion. **Trends in Pharmacological Sciences,** v. 19, n. 7, p. 287-298, 1998.

TAMAE, D. et al. Mutagenesis and repair induced by the DNA advanced glycation end product N 2-1-(carboxyethyl)-2′-deoxyguanosine in human cells. **Biochemistry,** v. 50, n. 12, p. 2321-2329, 2011.

TARRANT, J. M. Blood cytokines as biomarkers of in vivo toxicity in preclinical safety assessment: considerations for their use. **Toxicological sciences,** v. 117, n. 1, p. 4-16, 2010.

TAVARES, R. et al. The non-genomic effects of endocrine-disrupting chemicals on mammalian sperm. **Reproduction,** v. 151, n. 1, p. R1-R13, 2016.

TKACZYK, J.; VIZEK, M. Oxidative stress in the lung tissue-sources of reactive oxygen species and antioxidant defence. **Prague Medical Report,** v. 108, n. 2, p. 105-114, 2007.

UNEP. Stockholm Convention. All POPs listed in the Stockholm Convention. 2018. Disponível em: < http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/AllPOPs/tabid/2509/Default.aspx >. Acesso em: 07/03/2018.

VALADARES, L.; PFEILSTICKER, A. C. Desreguladores endócrinos e desenvolvimento puberal humano. **Brasília Med,** v. 49, n. 3, p. 189-194, 2012.

VAN DEN BERG, M. et al. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. **Toxicological sciences,** v. 93, n. 2, p. 223-241, 2006.

VAN ESTERIK, J. et al. Programming of metabolic effects in C57BL/6JxFVB mice by in utero and lactational exposure to perfluorooctanoic acid. **Archives of toxicology,** v. 90, p. 701, 2016.

VEGA, A. et al. Epigenetic: a molecular link between testicular cancer and environmental exposures. **Frontiers in endocrinology,** v. 3, 2012.

VISTOLI, G. et al. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. **Free radical research,** v. 47, n. sup1, p. 3-27, 2013.

WALKER, D. M.; GORE, A. C. Transgenerational neuroendocrine disruption of reproduction. **Nature Reviews Endocrinology,** v. 7, n. 4, p. 197-207, 2011.

WATKINS, C. D. K. J. B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull (Lange)**. McGraw Hill Brasil, 2009. ISBN 9788580551327.

WEISENBERGER, D. J.; BROWN, P. J. Chapter 6 - Networks and Consortia for Epigenetic Drug Discovery. In: (Ed.). **Drug Discovery in Cancer Epigenetics**. Boston: Academic Press, 2016. p.143-166. ISBN 978-0-12-802208-5.

WHO/IPCS. **Polychlorinated biphenyls (PCBs) and terphenyls (PCTs)-health and safety guide**: International Programme on Chemical Safety (IPCS) Health and Safety Guide 1992.

WOLSKA, L. et al. Polychlorinated biphenyls (PCBs) in bottom sediments: Identification of sources. **Chemosphere,** v. 111, p. 151-156, 2014.

XIAO, W. et al. Ligand-independent activation of aryl hydrocarbon receptor signaling in PCB3-quinone treated HaCaT human keratinocytes. **Toxicology letters,** v. 233, n. 3, p. 258-266, 2015.

XU, D. et al. Polychlorinated biphenyl quinone induces endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response and calcium release. **Chemical research in toxicology**, 2015.

XU, W. et al. Kinetic and Structural Mechanisms of (5′ S)-8, 5′-Cyclo-2′-deoxyguanosine-induced DNA Replication Stalling. **Biochemistry,** v. 54, n. 3, p. 639-651, 2015.

YANG, L.; VENNETI, S.; NAGRATH, D. Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. **Annual Review of Biomedical Engineering**, n. 0, 2017.

YU, M. L. et al. Increased mortality from chronic liver disease and cirrhosis 13 years after the Taiwan "yucheng"("oil disease") incident. **American journal of industrial medicine,** v. 31, n. 2, p. 172-175, 1997.

ZHANG, M.; HARRINGTON, P. D. B. Simultaneous quantification of Aroclor mixtures in soil samples by gas chromatography/mass spectrometry with solid phase microextraction using partial least-squares regression. **Chemosphere,** v. 118, p. 187-193, 2015.

ZHANG, X.; HO, S.-M. Epigenetics meets endocrinology. **Journal of molecular endocrinology,** v. 46, n. 1, p. R11-R32, 2011.

ZHU, C. et al. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyl ethers (PBDEs) in environmental samples from Ny-Ålesund and London Island, Svalbard, the Arctic. **Chemosphere,** v. 126, p. 40-46, 2015.

ZHU, Y. Polychlorinated biphenyl (PCB)-induced oxidative stress mediates cytotoxicity in human breast and prostate epithelial cells. 2011.

ZHU, Y. et al. Polychlorinated-biphenyl-induced oxidative stress and cytotoxicity can be mitigated by antioxidants after exposure. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 47, n. 12, p. 1762-1771, 2009.

ZIECH, D. et al. Reactive Oxygen Species (ROS)—Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis,** v. 711, n. 1, p. 167-173, 2011.

ZIEGLER, P. et al. The 3-OH Derivative of the Polychlorinated Biphenyl (PCB)-28 Inhibits Telomerase Expression and Accelerates Telomere Shortening in Vitro: A Rationale for the Significantly Shortened Telomere Length Found in Peripheral Blood Lymphocytes of Workers Exposed to High Doses of Lower Chlorinated PCBs. **Blood,** v. 124, n. 21, p. 4139-4139, 2014.

7 - ANEXO 1: RESUMO DOS PARÂMETROS AVALIADOS PELA MODELAGEM DE BENCHMARK DOSE

	Efeito	CES (%)	CED (µg/kg)	CEDL (µg/kg)	CEDU (µg/kg)
Peso corporal					
variação do peso corporal	↑	0,05	136	51,86	343
Plasma - MDA	↑	0,05	62	2,524	401,4
Fígado - MDA	↑	0,05	353	0	468,2
Fígado - metabólitos intermediários					
ATP	↓	0,05	453	192,3	773,2
ADP	↓	0,05	1,36	0	296,1
NADP+/NADPH	↓	0,05	73,8	1,116	323,2
glutamato	↓	0,05	530	529,7	546,1
lactato	↓	0,05	142	5,456	inf
piruvato	↓	0,05	247	38,69	708,1
malato	↓	0,05	0,757	0	62,29
fumarato	↓	0,05	0,05	0	11,33
Fígado - marcas epigenéticas					
5-mC-nDNA	↓	0,05	974	652,8	2091
5-hmC-nDNA	↓	0,05	0,05	0	5,96
Fígado - lesões mtDNA (8-oxodG)	↑	0,05	113	13,44	373,8
Rim - MDA	↑	0,05	0,226	0	3,307
Rim - metabólitos intermediários					
ATP	↓	0,05	4,13	0	343,9
ADP	↓	0,05	0,05	0	4,304
NAD+	↓	0,05	999	0	inf
glutamina	↓	0,05	5,06	0	51,5
lactato	↑	0,05	35,1	1,374	38,31
malato	↑	0,05	115	18,93	408,3
Rim – mtDNA 5-hmC	↓	0,05	30,1	10,47	106
Testículo - MDA	↑	0,05	136	44,95	352,3
Testículo - metabólitos intermediários					
ADP	↑	0,05	419	0	inf
succinato	↓	0,05	169	0,45	inf
glutamato	↓	0,05	0,079	0	370,8
malato	↓	0,05	0,05	0	1,13
fumarato	↓	0,05	0,05	0	0,94
$NADH/NAD^+$	↓	0,05	0,05	0	7,19
Testículo – 5-hmC-mtDNA	↑	0,05	0,05	0	3,017
Espermatozóides – 5-hmC-gDNA	↓	0,05	0,05	0	3,704

↓ ↑ diminuição ou aumento significativo do parâmetro avaliado em comparação com o grupo controle. Os dados foram ajustados com o software Proast. O CES (tamanho do efeito crítico) foi definido em 5%. A dose de efeito crítico correspondente (CED) é representada pela linha pontilhada vertical. CEDL e CEDU representam o limite inferior e superior do nível de confiança de 90%.

8. ANEXOS: CERTIFICADO CEUA, CV LATTES E FICHA DO ALUNO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF **75.2015-P434**

C E R T I F I C A D O

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Efeitos genotóxicos e epigenéticos de Aroclor 1254 (PCBs) em testículo e espermatozoides de camundongos**" (Protocolo CEUA/FCF/434), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **João Manuel Lopes Moreno**, sob orientação do(a) **Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de **11 de novembro de 2013**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 30 de setembro de 2015.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo, SP
Telefone: (11) 3091 3622 - e-mail: ceuafcf@usp.br

João Manuel Lopes Moreno

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/6371314601526959
Última atualização do currículo em 11/12/2017

Possui graduação em Biomedicina pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (2004) e mestrado em Bioquímica&Biologia Molecular pela Xiamen university (2009). Tem experiência na área de Saúde e Toxicologia ambiental é a sua linha de pesquisa, atuando principalmente nos seguintes temas: disruptores endocrinos (PCBs, DDT, Chumbo), detecção e quantificação de hormonio sexuais em sistemas biologicos, Histotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	João Manuel Lopes Moreno
Nome em citações bibliográficas	Moreno, João Manuel Lopes

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Cidade Universitária
Butantã
05508900 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30911192
URL da Homepage: www.usp.br / http://www.fcf.usp.br/

Formação acadêmica/titulação

2013
Doutorado em andamento em Toxicologia e Análises Toxicológicas (Conceito CAPES 5).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Efeitos genotóxicos e epigenéticos de Aroclor 1254 (PCBs) em testículo, espermatozóides, fígado e rim de camundongos,
Orientador: Ana Paula de Melo Loureiro.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2007 - 2009
Mestrado em Bioquimica & Biologia molecular.
XIAMEN UNIVERSITY, XIADA, China.
Título: Effect of PCBs (Aroclor 1254) on Spermatogenesis in Testis of Mouse,Ano de Obtenção: 2009.
Orientador: CHONGGANG WANG.
Coorientador: Zhenghong Zuo.
Bolsista do(a): Republica Popular da China, RPC, China.
Grande área: Ciências Biológicas
Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.
Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Mutagenese.

1999 - 2004
Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, UNIRIO, Brasil.
Título: Validação da Metodologia de Dosagem do Paratormônio e sua aplicação em uma amostra populacional.
Orientador: Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos.
Bolsista do(a): Governo de Cabo Verde, CV, Cabo Verde.

1997 - 1998
Ensino Médio (2º grau).
Ano Zero / Ensino secundario, ANO ZERO, Cabo Verde.

Formação Complementar

2011 - 2011

Biologia Molecular na Investigação e Diagnóstico. (Carga horária: 40h).
Ministério do Ensino Superior, Ciência e Inovação, MESCI, Cabo Verde.

2010 - 2010 Biologia molecular. (Carga horária: 30h).
UNIVERSIDADE DE CABO VERDE, UNICV, Cabo Verde.

2007 - 2007 Aconselho em IST/VIH-SIDA e Despistagem do HIV. (Carga horária: 30h).
Direcção Geral da Saúde, DGS, Cabo Verde.

2007 - 2007 Qualidade de Serviços - Projecto CVE/056-R.S.S.N. (Carga horária: 30h).
Ministério da Saúde - Cabo Verde, MS, Cabo Verde.

Atuação Profissional

XIAMEN UNIVERSITY, XIADA, China.

Vínculo institucional

2007 - 2009 Vínculo: Mestrado, Enquadramento Funcional: Mestrado

Outras informações Laboratório de toxicologia, departamento ciências biológicas, Xiamen University-China

UNIVERSIDADE JEAN PIAGET DE CABOVERDE, UNI-PIAGET, Cabo Verde.

Vínculo institucional

2011 - Atual Vínculo: Professor Visitante, Enquadramento Funcional: Professor Assistente Graduado, Carga horária: 8, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações Professor (em contrato), UNI-PIAGET. Curso de estudo: Analises Clínica e Saúde Publica, Ciências Farmacêuticas, Fisioterapia. Disciplina: Farmacologia e Toxicologia.

UNIVERSIDADE DE CABO VERDE, UNICV, Cabo Verde.

Vínculo institucional

2010 - Atual Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Professor Assistente Graduado, Carga horária: 14, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações Professor do Departamento de Ciência e Tecnologia, Curso de estudo: Biologia, Enfermagem, Engenharia &Química Biológica, Biodiagnostico (CESP). Disciplina: Bioquímica, Química clinica, Farmacologia, Biologia molecular, Microbiologia, Microbiologia medica, e Supervisão de estagio. Lecciona tempo inteiro a partir do ano letivo 2010/2011.

Direcção Geral de Agricultura, Silvicultura e Pecuária, DGASP, Cabo Verde.

Vínculo institucional

2006 - 2007 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Colaborador

Outras informações Representante do Comité Nacional e de Coordenação de Projectos Para Elaboração do Plano Nacional de Implementação da Convenção de Estocolmo sobre os Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs). Participação na elaboração do Plano Nacional de Implementação da Convenção de Estocolmo sobre os (POPs).

Hospital Regional de Santa Catarina - Ministério da Saúde, HRSC, Cabo Verde.

Vínculo institucional

2005 - 2007 Vínculo: , Enquadramento Funcional: Chefe de laboratório de análises clínica, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações Responsável pela gestão técnica, cientifica e dos recursos Humanos do laboratório de analises clínica, envolvendo os serviços de Bioquímica Clínica, Hematologia, Microbiologia e Parasitologia.

HAN - Hospital Agostinho Neto, HAN, Cabo Verde.

Vínculo institucional

2005 - 2005 Vínculo: , Enquadramento Funcional: Técnico Superior de Saúde / Aperfeiçoamento, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações Desenvolvimento, validação e execução de técnicas de Analises Clínicas para o apoio ao Diagnóstico, para as áreas da Bioquímica Clínica, Hematologia, Microbiologia e Parasitologia.

Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil.

Vínculo institucional

2002 - 2004 Vínculo: Iniciação Científica, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 30, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações

2003 - 2005 Atividades de Participação em Projeto, Escola Nacional de Saúde Pública, Projetos de pesquisa: Validação da Metodologia de Dosagem do Paratormônio e sua aplicação em uma amostra populacional 04/2001 - 12/2004 Estágios , Fiocruz/ENSP/CESTEH, . Estágio realizado: Acompanhamento de atividades em Laboratório de Toxicologia com utilização de Espectrofotômetro e HPLC.

Projetos de pesquisa

2007 - 2009

Effect of PCBs (Aroclor 1254) on Spermatogenesis in Testis of Mouse
Descrição: Projeto de pesquisa de tese de Mestrado em Bioquimica & Biologia Molecular do laboratório de Toxicologia, Departamento de Ciências Biológicas, Xiamen University ? China..
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Doutorado: (1) .

Integrantes: João Manuel Lopes Moreno - Coordenador / Chong-Wang Gang - Integrante.

2002 - 2004

Validação da Metodologia de Dosagem do Paratormônio e sua aplicação em uma amostra populacional?
Descrição: Projeto de investigação de Monografia para obtenção da graduação; intitulado, Validação da Exposição ao chumbo em crianças de 0 a 14 anos residentes nas comunidades do complexo de Manguinhos do Rio de Janeiro. O projeto foi desenvolvido durante o estágio CESTEH/ENSP/FIOCRUZ..
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Doutorado: (1) .

Integrantes: João Manuel Lopes Moreno - Coordenador / Rita de Cássia Oliveira Mattos - Integrante.

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica.
2. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Farmacologia.
3. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Biologia Molecular.

Idiomas

Português Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Francês Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.
Chinês Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Pouco, Escreve Pouco.
Crioulo Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Espanhol Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Prêmios e títulos

2007 Bolsa de estudos, China Scholarship Council - CSC..
1999 Bolsa de estudos, Governo da República de Cabo verde - GOVCV.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica ▼

1. Cai, Jiali ; Wang, Chonggang ; Wu, Tian ; **Moreno, João Manuel Lopes** ; Zhong, Yuanfu ; Huang, Xin ; Chen, Yixin ; Zuo, Zhenghong . Disruption of spermatogenesis and differential regulation of testicular estrogen receptor expression in mice after polychlorinated biphenyl exposure. Toxicology (Amsterdam) JCR, v. 287, p. 21-28, 2011.

Citações: WEB OF SCIENCE 16 | SCOPUS 18

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1. MATTOS, R. C. O. ; MOREIRA, Maria de Fátima ; MITRI, Simone ; LORENA, Simone ; ARAÚJO, Ulisses César ; TABALYBA, Marianne ; FERREIRA, Maria de Fatima Alves ; DOMINGOS, Helena Ramirez ; CARVALHO, Márcia ; BORGES, Renato ; LIMA, Selma Do Rosário ; SILVA, Marisa Villarino da ; SILVA, Alessandra da ; SANTOS, Carlucio Rocha dos ; MURATA, Marcos Massao ; **Moreno, João Manuel Lopes** . Avaliação da exposição ao chumbo em crianças de 0 a 14 anos residentes em comunidades do complexo de Manguinhos, no Município do Rio de Janaeiro.. In: III Seminário Nacional de Saúde e Ambiente, 2004, Rio de Janeiro. III Seminário Nacional de Saúde e Ambiente, 2004.

Resumos publicados em anais de congressos

1. SILVA, J O Oliveira ; MACHADO, J M H ; ALVES, S R ; MEYER, A ; IGNÁCIO, A F ; NASCIMENTO, A R ; PEREIRA, A C S ; SARCINELLI, P N ; MATTOS, R. C. O. C. ; PEREZ, F ; FERREIRA, M F A ; SOUZA, C A V ; DELLAROSA, H ; CHRISMAN, J R ; MURATA, M ; **Moreno, João Manuel Lopes** . Modelo para a avaliação de acidentes com praguicidas- o exemplo de um acidente com malation ocorrido em Serra-ES.. In: In: II Conferencia de Saúde Ocupacional e Ambiental: Integrando as Américas,, 2002, Salvador. II Conferencia de Saúde Ocupacional e Ambiental: Integrando as Américas, 2002. p. 53-53.

Apresentações de Trabalho

1. **Moreno, João Manuel Lopes**. Mecanismos da carcinogênese química. 2017. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
2. **Moreno, João Manuel Lopes**. Espécies reativas e sua interação com biomoléculas. III Escola de Inverno em Toxicologia ? EITox. 2014. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
3. **Moreno, João Manuel Lopes**. Efeito dos Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) na Saúde Publica. 2011. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

Demais tipos de produção técnica

1. **Moreno, João Manuel Lopes**. Aula prática: QUANTIFICAÇÃO DE MALONDIALDEÍDO PLASMÁTICO POR HPLC. 2017. (Aula prática Eitox).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. IV Escola de Inverno em Toxicologia ? EITox.Metabolismo Redox: Estresse Oxidativo. 2015. (Outra).
2. VI Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas ? SIMPAC/ I International Symposium on Pathophysiology and Toxicology?. 2015. (Simpósio).
3. XX Semana Farmacêutica de CIência e Tecnologia da FCF/USP. Oxidative stress and metabolic disruption induced by aroclor 1254 in kidney, liver and testis of mice. 2015. (Congresso).
4. 22º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - SIICUSP.Avaliador(a), da 1ª Etapa do 22º do SIICUSP. 2014. (Simpósio).
5. INCONTACT Information days on the new FP7 calls for proposals, 8-10 October 2012. INCONTACT Information days on the new FP7 calls for proposals, 8-10 October 2012. 2012. (Congresso).
6. Seminário de Bioecologia e Controlo Vectorial de Culicidae em Cabo Verde.Projecto de Cooperação Interuniversidade_Ajudas Preparatórias, PCI_AP, entre a Universidade das Illes Balears (Espanha) e a Universidade Jean Piaget de Cabo Verd. 2012. (Seminário).
7. Primeiras Jornadas Cabo-verdianas de Medicina Transfusional ? Mindelo, Cabo vede.. 2006. (Congresso).
8. III Semionário Nacional de Saúde e Ambiente. 2004. (Seminário).

Orientações

Orientações e supervisões em andamento

Trabalho de conclusão de curso de graduação

1. AGUINALDA MARIA GONÇALVES CABRAL. Estudo dos Fatores de Riscos para Diabetes Mellitus Tipo 2 nos Utentes Atendidos na Delegacia de Saúde de São Domingos. Início: 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - UNIVERSIDADE DE CABO VERDE. (Orientador).
2. Elviny Andreia de Jesus Semedo Mendes. Estudo da Prevalência de Anemia em Crianças de Jardim Infantil do Colhe Bicho ? Tarrafal/Santiago. Avaliação das Constantes Corpusculares e Pesquisa De Células Falciforme.. Início: 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - UNIVERSIDADE DE CABO VERDE. (Orientador).
3. OSVALDO DA GRAÇA MORENO GARCIA DE CARVALHO. AVALIAÇÃO DO CONHECIMENTO E COMPORTAMENTOS DOS PROFISSIONAIS DE SAÚDE SOBRE A IMPORTÂNCIA DA LAVAGEM DAS MÃOS: IDENTIFICAÇÃO DE PATOGENOS

CAUSADORES DA INFECÇÃO HOSPITALAR. Início: 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - UNIVERSIDADE DE CABO VERDE. (Orientador).

Orientações e supervisões concluídas

Trabalho de conclusão de curso de graduação

1. Lenira Silene do Rosário Centeio. A terapêutica oncológica realizada no Hospital Dr. Agostinho Neto em Cabo Verde. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Jean Piaget de Cabo Verde. Orientador: João Manuel Lopes Moreno.

Outras informações relevantes

Pessoa consciente, capacidade de trabalhar em equipa ou sozinho e de forma organizada, facilidade de adaptação a culturas e línguas diferentes, Experiência em lidar com grupo de pesquisa.

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 11/12/2017 às 1:24:08

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 8787041/1 - João Manuel Lopes Moreno

Email:	joao.moreno@usp.br
Data de Nascimento:	01/12/1975
Cédula de Identidade:	RNE - 281168H -
Local de Nascimento:	Cabo Verde
Nacionalidade:	Cabo Verdiana

Graduação: Bacharelado em ciências biológicas - Modalidade Médica - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) - Rio de Janeiro - Brasil - 2005

Mestrado: Master of Science (1) - Biochemisty & Molecular Biology - Xiamen University - China - 2009

Curso:	Doutorado
Programa:	Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula:	14/08/2013
Início da Contagem de Prazo:	14/08/2013

Data Limite para o Depósito: 12/12/2017

Orientador: Prof(a). Dr(a). Ana Paula de Melo Loureiro - 14/08/2013 até o presente. Email: apmlou@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 14/08/2013

Prorrogação(ões): 120 dias
Período de 14/08/2017 até 12/12/2017

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 29/10/2015

Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 14/08/2013
Prorrogação em 26/04/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 08/12/2017 07:25:16

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 8787041/1 - João Manuel Lopes Moreno

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5776-4/9	Tópicos Especiais de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II	07/10/2013	20/10/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5728-3/8	Aprimoramento Didático	15/10/2013	11/11/2013	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5753-1/1	Nutrigenômica e Programação das Doenças Crônicas Não-Transmissíveis	29/10/2013	04/11/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5741-6/2	Análise Toxicológica de Fármacos e Drogas que Causam Dependência	10/03/2014	13/04/2014	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5813-4/1	Aplicações de Cromatografia e Espectrometria de Massas em Análises Toxicológicas	11/03/2014	14/04/2014	60	4	100	B	N	Concluída

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5802-3/4	Tópicos Avançados em Toxicologia I	11/03/2014	23/06/2014	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5784-3/5	Tópicos Avançados em Toxicologia II	05/08/2014	17/11/2014	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5803-3/5	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	24/03/2015	06/04/2015	30	2	75	A	N	Concluída
FBC5752-3/1	Danos em Biomoléculas e o seu Papel no Monitoramento da Exposição a Agentes Tóxicos	11/06/2015	16/07/2015	45	3	90	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	23
Estágios:			
Total:	0	20	23

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Título de mestre obtido no(a) Xiamen University. Reconhecimento da equivalência do título aprovada pela Câmara Curricular do Conselho de Pós-Graduação, em Sessão de 25/02/2015..

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 08/12/2017 07:25:16

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 8787041/1 - João Manuel Lopes Moreno

Comissão julgadora da tese de doutorado:

NUSP	Nome	Vínculo	Função
329970	Ana Paula de Melo Loureiro	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 08/12/2017 07:25:16