

Ana Lúcia Borges Shimada

Estudo experimental da exposição ao PCB126 sobre a indução de Diabetes mellitus tipo II

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, __ de _____ de 2015.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, meus pais, Jorge e Dagmar, e irmãs, Ana Paula e Ana Flávia, pelo apoio, motivação e confiança incondicional, vocês são os meus modelos de inspiração, dedicação, superação e determinação!

Agradecimentos

À **Prof. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky**, pela confiança depositada ao me permitir implantar este novo trabalho em seu laboratório, pelas incalculáveis oportunidades oferecidas durante o período da pós-graduação e pela orientação e empenho despendido para que minha formação fosse completa;

Ao **Dr. Stephen Fernandes de Paula Rodrigues** e ao **Dr. Rodrigo Azevedo Loiola**, sou imensamente grata pelo interesse neste trabalho, pelas discussões e sugestões oferecidas, pelo auxílio constante e cooperação na parte experimental, além da revisão final da parte escrita;

Ao Wesley Soares Cruz, pelo respeito e confiança durante o período da pós-graduação ao me permitir compartilhar o conhecimento e aprendizado adquirido, e pelo constante entusiasmo em relação ao estudo da poluição ambiental;

Aos amigos oriundos da pós-graduação que não mediram esforços para me motivar na continuação desta etapa, acompanhar e torcer pelo meu sucesso, agradeço ao **Msc. André Ribeiro, Dra. Cristina Hebeda, Msc. Rodrigo Dias, Dra. Simone Bolonheis; Dra. Natália Guimarães Figueiredo e Msc. Thaísa Sandini.**

Aos atuais e antigos colegas do Laboratório de Toxicologia Experimental, Dra. Viviane Ferraz de Paula, Msc. Eric Diego Barioni, André Nakasato, Marina Spatti, Natalia Pereira e Tathiana Moreira, pelo compartilhamento de experiências durante este período;

Aos colaboradores do trabalho, ao professor Dr. Ricardo A. Fock, ao professor Dr. Ernani Pinto Junior, suas alunas Dra. Fabyana dos Anjos, Dra. Natália Guimarães e Msc. Fabiane Dörr, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, e ao professor Dr. Anderson de Sá Nunes docente do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo;

Aos alunos de pós-graduação do programa de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, aos professores e colegas da Toxicologia, professores Dra. Ana Paula de Melo Loureiro, Dra. Elizabeth de Souza Nascimento, Dr. Mauricio Yonamine, Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau e Dra. Tania Marcourakis, e aos

funcionários, Ângelo, Luzia, Samantha e Nancy, pela convivência durante este período;

Ao auxílio técnico prestado pela Msc. Renata Albuquerque com as análises de citometria de fluxo; e ao Sr. José Alexandre Pimentel com o manuseio do equipamento automatizado de análise bioquímica;

Ao financiamento concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob Processos n°. 2011/09677-8 e 2012/02994-0, referentes ao auxílio de bolsa de doutorado e de Projeto de Pesquisa, respectivamente, que foram fundamentais para a realização deste trabalho;

Ao Biotério de Criação e Experimentação Animal da FCF/IQ por fornecer os animais utilizados neste trabalho;

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas por acolher-me como aluna de pós-graduação;

A todos que diretamente ou indiretamente participaram da construção deste trabalho e desejaram que o mesmo fosse concluído com êxito, **MUITO OBRIGADA!**

Epígrafe

“Onde quer que você esteja, aonde quer que
você vá, aparecerá sempre o paraíso em sua volta
se você mantiver acesa a luz da Verdade na sua
consciência.”

Masaharu Taniguchi (1893-1985).

Resumo

SHIMADA, A.L.B. **Estudo experimental da exposição ao PCB126 sobre a indução de Diabetes mellitus tipo II.** 152 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A exposição ambiental aos poluentes orgânicos persistentes tem recebido amplo destaque na literatura recentemente devido à extensa associação entre o desenvolvimento de doenças metabólicas, obesidade e/ou diabetes mellitus, e a presença destes poluentes, principalmente os organoclorados, como as bifenilas policloradas (PCBs), no organismo. Por outro lado, os mecanismos de ação destes poluentes é controverso devido à elevada quantidade de representantes destas classes, gerando diversidade de protocolos de exposição e escassez de estudos experimentais. Por isto, foi objetivo deste trabalho elucidar os mecanismos de ação tóxica do PCB126, nas doses de 0,1; 1 ou 10 µg/kg de massa corpórea, em ratos Wistar machos, durante quinze dias, expostos por instilação intranasal. O protocolo de exposição empregado foi caracterizado e considerado suficiente para causar toxicidade, uma vez que foram observadas alterações no sistema imune, metabolismo e em parâmetros relacionados à gênese do diabetes mellitus. A caracterização da exposição foi determinada pela quantificação da concentração de PCB126 no fígado e pulmão (CG/MS) e pelo aumento da expressão do receptor aril hidrocarboneto (AhR) no rim, fígado, pulmão e tecido adiposo (Western Blot). O efeito imunossupressor do PCB126 foi evidenciado pelo comprometimento da produção de células na medula óssea e, conseqüentemente, no número de células totais no sangue circulante. Adicionalmente, foi evidenciada a interferência do poluente na via de ativação mediada por receptores acoplados à proteína G (GPCRs), principalmente em neutrófilos, alterando importantes funções destas células, como a expressão de moléculas de adesão, geração de espécies reativas de oxigênio e migração. Entre as alterações metabólicas observadas, destacamos o aumento dos níveis de triglicérides e colesterol sérico, aumento da liberação de ácidos graxos livres; aumento da atividade da enzima hepática gama glutamil transferase; aumento da resistência à insulina e aumento da geração de óxido nítrico pelas ilhotas de Langerhans, dados estes, possivelmente relacionados ao comprometimento das células beta (β) pancreáticas, confirmados pelo aumento da expressão de GLUT4 no tecido adiposo, aumento da concentração de insulina sérica e aumento do estresse oxidativo nas ilhotas de Langerhans. Em conjunto, os dados obtidos destacam importantes alterações causadas pela exposição intranasal ao PCB126, evidenciando a participação do poluente na gênese do diabetes mellitus do tipo II.

Palavras-chave: Poluentes orgânicos persistentes; bifenilas policloradas; PCB126; resistência à insulina; diabetes.

Abstract

SHIMADA, A. L. B. **Experimental study of PCB126 exposure on induction of Diabetes mellitus type II.** 152 f. Thesis (Doctorate) – School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2015.

The environmental exposure to persistent organic pollutants has been widely highlighted in recent literature due to the extensive association between the development of metabolic diseases, obesity and/or diabetes mellitus, and presence of these pollutants, especially organochlorines such as polychlorinated biphenyls (PCBs) in organism. Moreover, the mechanisms of action of these pollutants are controversial due to the high number of PCBs congeners, diversity of exposure protocols and lack of experimental studies. Therefore, the aim of this study was to elucidate the mechanisms of PCB126's toxic action at doses of 0.1; 1 or 10 µg/kg body weight in male Wistar rats exposed by intranasal instillation for 15 days. The established exposure protocol was characterized and considered sufficient to cause toxicity since changes were observed in the immune system, metabolism and in parameters related to the pathogenesis of diabetes mellitus. Characterization of exposure was determined by quantifying the concentration of PCB126 in liver and lung (GC-MS) and by the increased expression of aryl hydrocarbon receptor (AhR) in kidney, liver, lung, and adipose tissue (Western blot). The immunosuppressive effect of PCB126 was evidenced by impairment of cell production in the bone marrow and thus the total number of cells in the circulation. In addition, the interference of the pollutant in the activation pathway mediated by G-protein coupled receptors (GPCRs), in particular in neutrophils, was observed by changing important functions of these cells such as the expression of adhesion molecules, reactive oxygen species generation, and migration. Among the metabolic changes observed, we highlight the increased levels of triglycerides and serum cholesterol, increased release of free fatty acids; increased gamma glutamyl transferase hepatic enzyme activity; increased insulin resistance and increased generation of nitric oxide by the islets of Langerhans, these data possibly related to the impairment of beta cells (β) pancreatic function, suggested by the increased expression of GLUT4 in adipose tissue, increased serum insulin concentration and increased oxidative stress in the islets of Langerhans. Altogether, these results highlight important changes caused by intranasal exposure to PCB126, suggesting participation of the pollutant in the genesis of diabetes mellitus type II.

Key-words: Persistent organic pollutants; polychlorinated biphenyls; PCB126; insulin resistance; diabetes.

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura molecular das bifenilas policloradas (PCBs)	21
Figura 2: Estrutura química do PCB126	22
Figura 3: Modelo da via de sinalização da dioxina.	27
Figura 4: Representação simplificada do protocolo de exposição utilizado neste trabalho. ...	39
Figura 5: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a variação de massa corpórea de ratos Wistar machos.	55
Figura 6: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre o consumo diário de ração por ratos Wistar machos.	56
Figura 7: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre o consumo diário de água por ratos Wistar machos.	57
Figura 8: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a expressão do receptor aril hidrocarboneto em amostras de tecidos de ratos Wistar machos.	59
Figura 9: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a massa úmida e seca de tecidos de ratos Wistar machos.	61
Figura 10: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre o perfil lipídico de ratos Wistar machos.	62
Figura 11: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre parâmetros bioquímicos e enzimas hepáticas de ratos Wistar machos.	64
Figura 12: Cromatograma de íons totais (TIC).	65
Figura 13: Cromatograma de monitoramento de íon selecionado (SIM) do íon m/z 292.	66
Figura 14: Cromatograma de monitoramento de íon selecionado (SIM) do íon m/z 326.	67
Figura 15: Curva de calibração para a quantificação da concentração de PCB126 em amostras de fígado (A) e pulmão (B).	67
Figura 16: Quantificação da concentração de PCB126 em amostras biológicas de animais expostos <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo.	68
Figura 17: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre o número de células totais na medula óssea de ratos Wistar machos.	69
Figura 18: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre o número diferencial de células na medula óssea de ratos Wistar machos.	70
Figura 19: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre o número de células totais no sangue circulante de ratos Wistar machos.	71
Figura 20: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre o número diferencial de células do sangue circulante de ratos Wistar machos.	71
Figura 21: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre parâmetros hematimétricos de ratos Wistar machos.	72
Figura 22: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a avaliação de morte celular em PMN e PBMC obtidos do sangue circulante de ratos Wistar machos.	73
Figura 23: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a expressão da molécula de adesão CD62L em neutrófilos (A) e linfócitos (B) obtidos do sangue circulante de ratos Wistar machos.	74

Figura 24: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a expressão da molécula de adesão CD18 em neutrófilos (A) e linfócitos (B) obtidos do sangue circulante de ratos Wistar machos.....	75
Figura 25: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a expressão da molécula de adesão CD31 em neutrófilos (A) e linfócitos (B) obtidos do sangue circulante de ratos Wistar machos.....	76
Figura 26: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a interação leucócito-endotélio basal no mesentério de ratos Wistar machos.....	77
Figura 27: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a interação leucócito-endotélio no mesentério de ratos Wistar machos após estimulação com fMLP.	79
Figura 28: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a interação leucócito-endotélio no fígado de ratos Wistar machos.	80
Figura 29: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a interação leucócito-endotélio em condições basais no pâncreas de ratos Wistar machos.	81
Figura 30: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a interação leucócito-endotélio no pâncreas de ratos Wistar machos após estimulação com fMLP.	83
Figura 31: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a produção de espécies reativas por neutrófilos obtidos do sangue circulante de ratos Wistar machos.	84
Figura 32: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a expressão de FPR-1 em neutrófilos obtidos de ratos Wistar machos.....	85
Figura 33: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a expressão de TLR4 em neutrófilos obtidos de ratos Wistar machos.....	86
Figura 34: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a quimiotaxia de neutrófilos circulantes de ratos Wistar machos.	87
Figura 35: Efeito da exposição <i>in vitro</i> ao PCB126 sobre a viabilidade de neutrófilos peritoneais de ratos Wistar machos.....	88
Figura 36: Efeito da exposição <i>in vitro</i> ao PCB126 sobre a geração de espécies reativas por neutrófilos peritoneais de ratos Wistar machos.....	88
Figura 37: Efeito da exposição <i>in vitro</i> ao PCB126 sobre a expressão de TLR4 em neutrófilos peritoneais de ratos Wistar machos.....	89
Figura 38: Efeito da exposição <i>in vitro</i> ao PCB126 sobre a expressão de FPR-1 em neutrófilos peritoneais de ratos Wistar machos.....	90
Figura 39: Efeito da exposição <i>in vitro</i> ao PCB126 sobre a migração de neutrófilos peritoneais de ratos Wistar machos.....	90
Figura 40: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a expressão das moléculas de adesão solúveis sICAM-1 (A), sPECAM-1 (B) e sVCAM-1 (C) determinada no soro obtido de ratos Wistar machos.....	91
Figura 41: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a concentração de mediadores pró-inflamatórios no soro de ratos Wistar machos.....	92
Figura 42: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a concentração de TNF determinado no homogenato do fígado (A), pulmão (B) e tecido adiposo (C) de ratos Wistar machos.....	93
Figura 43: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a concentração de IL-6 determinado no homogenato do fígado (A), pulmão (B), pâncreas (C) e tecido adiposo (D) de ratos Wistar machos.....	94

Figura 44: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a concentração de NO ₂ ⁻ determinado no homogenato do fígado (A), pulmão (B), pâncreas (C) e tecido adiposo (D) de ratos Wistar machos.....	95
Figura 45: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre as células do baço de ratos Wistar machos.....	96
Figura 46: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a concentração de glicose sérica medida no sangue total de ratos Wistar machos.	97
Figura 47: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a concentração de insulina sérica quantificada no soro de ratos Wistar machos.	98
Figura 48: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a concentração de leptina sérica determinado no soro de ratos Wistar machos.	98
Figura 49: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a curva glicêmica após teste de tolerância à glicose realizado em ratos Wistar machos.	99
Figura 50: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a curva glicêmica após teste de tolerância à insulina realizado em ratos Wistar machos.	100
Figura 51: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a expressão de GLUT4 determinado no tecido adiposo (A) e tecido muscular (B) de ratos Wistar machos.	101
Figura 52: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a área das ilhotas de Langerhans do pâncreas de ratos Wistar machos.	102
Figura 53: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a viabilidade (A) e ciclo celular (B) de ilhotas de Langerhans isoladas de ratos Wistar machos.....	103
Figura 54: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a geração de espécies reativas de oxigênio pelas ilhotas de Langerhans obtidas do pâncreas de ratos Wistar machos.....	104
Figura 55: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a geração de ânion superóxido pelas ilhotas de Langerhans obtidas do pâncreas de ratos Wistar machos.....	105
Figura 56: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a concentração de NO ₂ ⁻ produzidas pelas ilhotas de Langerhans, obtidas do pâncreas de ratos Wistar machos, estimuladas por meio de cultura com alta concentração de glicose (16,7 mmol/L).	106
Figura 57: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a concentração de IL-6 produzida pelas ilhotas de Langerhans, obtidas do pâncreas de ratos Wistar machos, estimuladas por meio de cultura com alta concentração de glicose (16,7 mmol/L).	106
Figura 58: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PCB126 ou ao veículo sobre a concentração de insulina produzida pelas ilhotas de Langerhans, obtidas do pâncreas de ratos Wistar machos, estimuladas por meio de cultura com alta concentração de glicose (16,7 mmol/L).	107

Lista de Tabelas

Tabela 1: Consumos de ração diário e total dos animais expostos ao PCB126 ou veículo. .56

Lista de abreviações, símbolos e fórmulas

μ	Micro
μL	Microlitros
A1C	Hemoglobina glicada
ACGIH	<i>American Conference of Governmental Industrial Hygienists</i>
ACK	<i>Ammonium-chloride-potassium</i>
ADA	Associação Americana de Diabetes
AGEs	Produtos finais da glicação avançada
AhR	Receptor aril hidrocarboneto
AhRR	Repressor AhR
AIP	Proteína de interação do receptor aril hidrocarboneto
AKT	Proteína quinase B
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ARNT	Proteína nuclear transportadora de AhR
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
AUC	Área sob a curva
B	Beta
BRG1	<i>Brahma-Related Gene-1</i>
BTE	<i>Basic transcription element</i>
Ca^{+2}	Íon cálcio
CaCl_2	Cloreto de cálcio
Cath-D	<i>Cathepsin D</i>
CD	<i>Cluster differentiation</i>
CD18	<i>Cluster differentiation</i> 18 ou β 2-integrina
CD31	<i>Cluster differentiation</i> 31 ou PECAM-1
CD62L	<i>Cluster differentiation</i> 62L ou L-selectina
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CIT	Cromatograma de íons totais
c-Myc	<i>Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog</i>
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
ConA	Concanavalina A
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CYP	Citocromo P450
CYP1A1	<i>Cytochrome P450 Family-1 Subfamily-A Polypeptide-1</i>
CYP1A2	<i>Cytochrome P450 Family-1 Subfamily-A Polypeptide-2</i>
CYP1B1	<i>Cytochrome P450 Family-1 Subfamily-B Polypeptide-1</i>
D.O.	Densitometria óptica
DCFH	Diclorodihidrofluoresceína
DDT	Diclorodifeniltricloreto
DHE	Dihidroetidina
dL	Decilitros
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRE/XRE	Sequência de elementos responsivos a xenobióticos
ECL	Eletroquimioluminescência
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EJ	Eritroblasto jovem

ELISA	Reação imunoenzimática
EOC	Eritroblasto ortocromático
epm	Erro padrão da média
EPOLI	Eritroblasto policromático
ERAP140	<i>Estrogen receptor associated protein</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESR	Receptor de estrógeno
eV	Elétron volts
EVGTT	Teste de tolerância à glicose endovenosa
EVITT	Teste de tolerância à insulina endovenosa
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FCS	<i>Forward scatter</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
fMLP	N-formil Metionil-Leucil-Fenilalanina
FPR-1	Receptor de formil pepetideo 1
<i>g</i>	Força centrífuga relativa
gama GT	Gama glutamil transferase
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
GIP	Glucose-dependent insulinotropic polypeptide
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
GLUTs	Proteínas transportadoras de glicose
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
H ₂ O	Água
HBSS	Solução salina balanceada de Hanks
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
i.p.	Intraperitoneal
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IDF	Federação Internacional de Diabetes
IL-	Interleucina
IQ	Instituto de Química
IR	Receptor de insulina
IRS	Receptor de insulina intracelular
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodalton
kg	Quilogramas
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
KHCO ₃	Bicarbonato de potássio
L	Litros
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
mA	Miliampere
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos-1
MeSO ₂ -PCBs	PCBs metil sulfonados
mg	Miligramas
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
mL	Mililitros

Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaHPO ₄	Fosfato de sódio
NEDD8	<i>Neural precursor cell Expressed, Developmentally Down-regulated-8</i>
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
ng	Nanogramas
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
°C	Graus Celsius
OH-PCBs	PCBs hidroxilados
OSHA	<i>Occupational Safety and Health Administration</i>
OUPTFI	<i>Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor-1</i>
p300	<i>Histone acetyltransferase</i>
Pa	Pascal
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio-1
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução fosfato salina
PCB126	Bifenila policlorada no. 126
PCB52	Bifenila policlorada no. 52
PCBs	Bifenilas policloradas
PCDDs	Policloridrato dibenzo-p-dioxinas
PCDFs	Policloridrato dibenzofurano
pCIP	<i>p300/CBP-interacting protein</i>
PCR	Proteína C reativa
PE	Ficoeritrina
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PerCP	Proteína piridina clorofila
pg	Picogramas
PHA	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
PI	Iodeto de propídeo
PMA	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate</i>
PMNs	Células polimorfonucleares
Pol II	<i>RNA Polymerase-II</i>
POPs	Poluentes orgânicos persistentes
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
PS2	<i>Gastrointestinal Trefoil Protein-pS2</i>
Rb	<i>Retinoblastoma 1</i>
RelA	NF-KappaB <i>subunit</i>
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SHP	<i>Small Heterodimer Partner</i>
sICAM-1	<i>Soluble intercellular adhesion molecule-1</i>
SIM	Monitoramento de íon selecionado
SMRT	<i>Silencing Mediator for Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptor</i>

Sp1	<i>Transcription Factor SP1</i>
sPECAM-1	<i>Soluble platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
SPME	<i>Solid phase micro extraction</i>
SRC1	<i>Steroid Receptor Coactivator-1</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
SUMO1	<i>Small Ubiquitin Related Modifier-1</i>
sVCAM-1	<i>Soluble vascular cell adhesion molecule-1</i>
T3	Tri-iodotironina
T4	Tetraiodotironina
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	TBS-Tween
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
TEF	Fator de equivalência tóxica
TEQ	Equivalente tóxico
TIF2	<i>Transcriptional Intermediary Factor-2</i>
TLR4	<i>Toll like receptor 4</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
UI	Unidade internacional
V	Volts
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
XRE	Região responsiva à xenobióticos

Sumário

Dedicatória.....	1
Agradecimentos.....	2
Epígrafe	4
Resumo.....	5
Abstract.....	6
Lista de Figuras	7
Lista de Tabelas	10
Lista de abreviações, símbolos e fórmulas.....	11
1 Introdução.....	19
1.1 Poluentes orgânicos persistentes (POPs) e bifenilas policloradas (PCBs)	19
1.2 Diabetes mellitus	29
1.2.1 Fisiopatologia do DM2.....	31
1.3 Interação entre exposição aos PCBs e desenvolvimento de DM	35
2 Objetivos.....	38
3 Material e Métodos	38
3.1 Animais	38
3.2 Protocolo de exposição	38
3.3 Caracterização da exposição.....	39
3.3.1 Pesagem dos animais	39
3.3.2 Consumo de água e ração.....	39
3.3.3 Quantificação de PCB126 em amostras biológicas	40
3.3.4 Pesagem dos órgãos	41
3.3.5 Análise da expressão de AhR por Western Blot	41
3.4 Caracterização dos parâmetros hematológicos	42
3.4.1 Determinação do leucograma	42
3.4.2 Determinação dos parâmetros hematimétricos	42
3.4.3 Determinação do número de células na medula óssea	42
3.5 Caracterização dos parâmetros metabólicos	43
3.5.1 Determinação do perfil lipídico.....	43
3.5.1.1 Determinação do colesterol sérico, triglicerídeos e HDL colesterol.....	43
3.5.1.2 Cálculo da concentração sérica de VLDL colesterol.....	43
3.5.1.3 Cálculo da concentração sérica de LDL colesterol	43
3.5.2 Determinação do perfil bioquímico e atividade enzimática do fígado.....	43
3.6 Caracterização dos parâmetros inflamatórios	44
3.6.1 Isolamento de neutrófilos circulantes	44
3.6.2 Recrutamento de neutrófilos e tratamento <i>in vitro</i> com PCB126.....	44
3.6.3 Citometria de fluxo	44
3.6.3.1 Avaliação da viabilidade celular	45
3.6.3.2 Avaliação da expressão de moléculas de adesão	46

3.6.3.3 Avaliação da expressão de FPR-1	46
3.6.3.4 Avaliação da expressão de TLR4	46
3.6.3.5 Quantificação do <i>burst</i> oxidativo	46
3.6.4 Quimiotaxia	47
3.6.5 Análise da interação leucócito-endotélio por microscopia intravital	48
3.6.6 Avaliação da expressão de moléculas de adesão solúveis	49
3.6.7 Determinação de mediadores inflamatórios	49
3.6.7.1 Determinação da concentração de citocinas pró-inflamatórias	49
3.6.7.2 Determinação indireta da produção de NO	49
3.6.8 Proliferação de células do baço	49
3.7 Caracterização do diabetes mellitus	50
3.7.1 Determinação da concentração sérica de glicose	50
3.7.2 Determinação da concentração de insulina e leptina	50
3.7.3 Teste de tolerância à glicose endovenosa (EVGTT)	51
3.7.4 Teste de tolerância à insulina endovenosa (EVITT)	51
3.7.5 Análise da expressão de GLUT4 em tecidos insulino-dependentes	51
3.7.6 Análise morfológica das ilhotas de Langerhans	52
3.7.7 Análise funcional das ilhotas de Langerhans	52
3.7.7.1 Isolamento de ilhotas de Langerhans	52
3.7.7.2 Avaliação da viabilidade celular, ciclo celular e fragmentação do DNA das ilhotas pancreáticas isoladas	52
3.7.7.3 Geração de espécies reativas de oxigênio e ânion superóxido por ilhotas pancreáticas isoladas	53
3.7.7.4 Geração de NO ₂ ⁻ , IL-6 e insulina por ilhotas pancreáticas isoladas	53
3.8 Análise estatística	54
4 Resultados	55
4.1 Caracterização da exposição	55
4.1.1 Peso dos animais	55
4.1.2 Consumo de ração	56
4.1.3 Consumo de água	57
4.1.4 Expressão do receptor Aril hidrocarboneto (AhR)	57
4.1.5 Massa dos órgãos	59
4.1.6 Perfil lipídico	61
4.1.7 Perfil bioquímico e enzimático	63
4.1.8 Quantificação de PCB126 em amostras biológicas	64
4.2 Caracterização de parâmetros hematológicos	69
4.2.1 Células da medula óssea	69
4.2.2 Células circulantes	70
4.2.3 Parâmetros hematimétricos	72
4.3 Caracterização de parâmetros inflamatórios	72

4.3.1 Avaliação da viabilidade celular em leucócitos circulantes	72
4.3.2 Expressão de moléculas de adesão em células circulantes induzida por fMLP ...	74
4.3.2.1 Expressão de CD62L	74
4.3.2.2 Expressão de CD18	75
4.3.2.3 Expressão de CD31	76
4.3.3 Interação leucócito-endotélio	77
4.3.3.1 Mesentério em condições basais.....	77
4.3.3.2 Mesentério após estimulação com fMLP	78
4.3.3.3 Fígado.....	79
4.3.3.4 Pâncreas em condições basais	81
4.3.3.5 Pâncreas após estimulação com fMLP	82
4.3.4 Quantificação do <i>burst</i> oxidativo em neutrófilos circulantes	83
4.3.5 Expressão de FPR-1 em neutrófilos circulantes	85
4.3.6 Expressão de TLR4 em neutrófilos circulantes	85
4.3.7 Quimiotaxia de neutrófilos circulantes	86
4.3.8 Neutrófilos tratados <i>in vitro</i> com PCB126.....	87
4.3.9 Moléculas de adesão solúveis	91
4.3.10 Concentração de mediadores pró-inflamatórios no soro	92
4.3.11 Concentração de mediadores pró-inflamatórios no homogenato de órgãos.....	93
4.3.11.1 Concentração de TNF	93
4.3.11.2 Concentração de IL-6.....	94
4.3.11.3 Concentração de NO ₂ ⁻	95
4.3.12 Células do baço.....	96
4.4 Caracterização do diabetes	97
4.4.1 Concentração de glicose sérica	97
4.4.2 Concentração de insulina sérica	98
4.4.3 Concentração de leptina sérica	98
4.4.4 Teste de tolerância à glicose endovenosa	99
4.4.5 Teste de tolerância à insulina endovenosa	100
4.4.6 Expressão de GLUT4 em tecidos insulino-dependentes	100
4.4.7 Ilhotas pancreáticas	102
4.4.7.1 Análise morfológica das ilhotas de Langerhans	102
4.4.7.2 Avaliação da viabilidade e ciclo celular nas ilhotas de Langerhans	103
4.4.7.3 Avaliação do estresse oxidativo nas ilhotas de Langerhans.....	104
4.4.7.4 Quantificação de mediadores inflamatórios em sobrenadante de cultura de ilhotas de Langerhans	105
5 Discussão	108
5.1 Alterações metabólicas causadas pela exposição ao PCB126	109
5.2 Redução da resposta de leucócitos à ativação de GPCR	112
5.3 Resistência insulínica causada pela exposição ao PCB126.....	117

6 Referências bibliográficas	121
7 Anexos	134
7.1 Ficha do aluno	Erro! Indicador não definido.
7.2 Currículo lattes	Erro! Indicador não definido.
7.3 Aprovação do comitê de ética no uso de animais	Erro! Indicador não definido.

1 Introdução

1.1 Poluentes orgânicos persistentes (POPs) e bifenilas policloradas (PCBs)

Os poluentes orgânicos persistentes (POPs) são compostos liberados no ambiente por fontes antropogênicas ou naturais e, devido à sua natureza hidrofóbica e resistência à degradação proteolítica, química ou biológica permanecem intactos por períodos excepcionalmente longos de tempo no meio ambiente (EL-SHAHAWI *et al.*, 2010; EVERETT *et al.*, 2011; MREMA *et al.*, 2012; VAN DER BERG *et al.*, 1998). Assim, estes compostos têm recebido grande atenção, uma vez que se concentram na cadeia alimentar, podendo ser encontrados em alimentos, solo, água potável e em matrizes biológicas, como o leite (MALISCH; KOTZ, 2014; MREMA *et al.*, 2013; ROSNER; MARKOWITZ, 2013).

Os POPs podem ser classificados didaticamente em intencionais ou não-intencionais, de acordo com sua fonte de produção (EL-SHAHAWI *et al.*, 2010; TIEMANN, 2008). Os POPs intencionais são aqueles produzidos pela ação humana, como as substâncias químicas utilizadas na indústria ou para combater pragas, a saber: aldrin, endrin, clordano, diclorodifeniltricloreto (DDT), dieldrin, heptacloro, mirex, toxafeno, hexaclorobenzeno e bifenilas policloradas (PCBs) (EL-SHAHAWI *et al.*, 2010; TIEMANN, 2008). Por outro lado, os POPs não intencionais são subprodutos indesejáveis provenientes da atividade vulcânica, combustão ou de processos químicos, como por exemplo, as dioxinas, como o policloridrato dibenzo-p-dioxina (PCDDs) e o policloridrato dibenzofurano (PCDFs) (EL-SHAHAWI *et al.*, 2010; TIEMANN, 2008).

Dentre os exemplos de POPs citados, os PCBs são de grande relevância devido a sua ampla produção e utilização comercial entre 1929 e 1977, principalmente no setor elétrico, como fluidos dielétricos isolantes para transformadores e capacitores elétricos e para equipamentos hidráulicos, como lubrificantes (CASTRO-JIMÉNEZ; GONZALES, 2011; ERICKSON; KALEY, 2011; DE AZEVEDO E SILVA *et al.*, 2007; PENTEADO; VAZ, 2001). Além disso, foram empregados em muitos produtos utilizados diretamente pela população ou pela indústria, tais como colas, tintas, ceras, plásticos e praguicidas (CASTRO-JIMÉNEZ; GONZALES, 2011; ERICKSON; KALEY, 2011). A produção global de PCBs foi estimada em 1.324 milhões de toneladas entre 1930 e 1993 (CASTRO-JIMÉNEZ; GONZALES, 2011; ERICKSON; KALEY, 2011). Entre os principais países produtores de PCBs estão os Estados Unidos, China, Japão, Rússia, França, Itália e

Alemanha, que produziram formulações contendo uma mistura complexa com até 103 diferentes congêneres de PCBs (CASTRO-JIMÉNEZ; GONZALES, 2011; ERICKSON; KALEY, 2011). No Brasil, este produto recebeu o nome de Ascarel[®] (Monsanto, St. Louis, MO, EUA), produto importado principalmente dos Estados Unidos e da Alemanha (CASTRO-JIMÉNEZ; GONZALES, 2011; ERICKSON; KALEY, 2011).

Na década de 80, a produção e o uso de PCBs foram interrompidos em muitos países, mas infelizmente, atualmente ainda existem países onde o controle dos PCBs não é rigoroso ou o processo de destruição e remoção dos mesmos não é totalmente eficiente (DE AZEVEDO E SILVA *et al.*, 2007; HASSOUN; PERIANDRI-STEINBERG, 2010). Pensando na contaminação ambiental causada por esses poluentes, a Convenção de Basileia (1992) e a Convenção de Estocolmo (2001), discutiram e aprovaram a redução e/ou eliminação da liberação e despejo de POPs.

Adicionalmente, a contaminação de ambientes fechados vem sendo recentemente considerada uma importante e negligente fonte de contaminação pois a presença de PCBs em materiais de construção, como em calafetagem ao redor de janelas e juntas de expansão tem contribuído para as altas concentrações encontradas (BRÄUNER *et al.*, 2011; HARRAD *et al.*, 2006; JAMSHIDI *et al.*, 2007).

A legislação brasileira estabeleceu em 1981 a proibição da fabricação, comercialização, uso e descarte de PCBs ou produtos contaminados com PCBs para o ambiente em todo território nacional (BRASIL, 1981). Por outro lado, permitiu que os equipamentos já instalados no país continuassem em funcionamento até que fossem substituídos ao término de sua vida útil. Adicionalmente, a legislação brasileira estabeleceu orientações para o manuseio, embalagem, rotulação, armazenagem e transporte de PCBs e seus resíduos em território nacional (BRASIL, 1993; 2012), permitindo em 1994, a exportação de resíduos e produtos contendo PCBs para sua correta eliminação (CONAMA, 1994; DE AZEVEDO E SILVA *et al.*, 2007; PENTEADO; VAZ, 2001).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente, produtos contendo PCBs são todos os materiais que apresentam quantidades maiores que 50 mg/kg de PCBs (Brasil Projeto PNUD BRA/08/G32). A Eletrobrás estima que em 1981, o total de PCBs importado e em estoque no Brasil era de aproximadamente 100.000 toneladas (Brasil Projeto PNUD BRA/08/G32). De acordo com informações de empresas credenciadas responsáveis pelo descarte destes resíduos, 30.000 toneladas foram

processadas desde então, permanecendo um total de 70.000 toneladas de produtos contendo PCBs no país (Brasil Projeto PNUD BRA/08/G32). Desta forma, embora haja consenso sobre os cuidados na manipulação destes agentes, a legislação ainda não coibiu a possível exposição humana ocupacional e/ou ambiental a estes poluentes.

Os PCBs constituem uma classe de 209 congêneres (AZEVEDO E SILVA *et al.*, 2007; PENTEADO; VAZ, 2001), que recebem uma nomenclatura especial adotada pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) pela posição e presença de 1 a 10 átomos de cloro em sua estrutura bifênica (Figura 1). A presença dos grupamentos clorados é relevante para sua toxicidade, uma vez que definem seu potencial para ativação metabólica ou detoxificação e afinidade para receptores celulares (AZEVEDO E SILVA *et al.*, 2007; PENTEADO; VAZ, 2001). Os PCBs podem ser encontrados em conformações espaciais diferentes, sendo que os PCBs tipo-dioxina são aqueles que possuem estrutura “coplanar” (ou seja, não apresentam átomos de cloro em posição orto) semelhante ao 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), apresentam capacidade de ligação ao receptor aril hidrocarboneto (AhR) e exibem toxicidade semelhante às dioxinas (CASTRO-JIMÉNEZ; GONZALES, 2011; CHEN, 2010; GUYOT *et al.*, 2012; HASSOUN; PERIANDRI-STEINBERG, 2010; LAI *et al.*, 2010; PENTEADO; VAZ, 2001). Os PCBs tipo-dioxina são 12, a saber, PCB77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 e 189 (CASTRO-JIMÉNEZ; GONZALES, 2011; CHEN, 2010; HASSOUN; PERIANDRI-STEINBERG, 2010; LAI *et al.*, 2010; PENTEADO; VAZ, 2001).

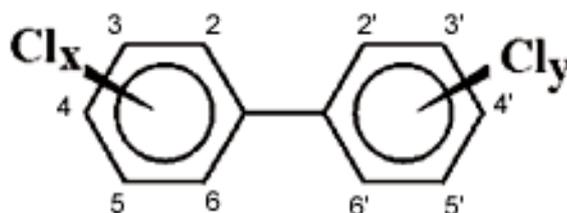


Figura 1: Estrutura molecular das bifenilas policloradas (PCBs)

O PCB126 (Figura 2) também conhecido como 1,1-N-bifenil, 3,3-N,4,4-N,5-pentacloro-(9Cl) ou 3',4,4',5-pentaclorobifenila (CAS 57465-28-8), se apresenta na forma branca sólida, com massa molecular de 326.42 g/mol e fórmula molecular $C_{12}H_5Cl_5$. Entre suas características físico-químicas podemos destacar o ponto de fusão de 160 °C a 161 °C e a temperatura de ebulição de 381 °C (*National Toxicology Program*, NTP, 2006). A 25 °C, a solubilidade do PCB126 em água é de

$1,03 \times 10^{-3}$ mg/L e sua pressão de vapor é de $2,96 \times 10^{-7}$ Pa (N/m²) (NTP, 2006;). Além disso, apresenta coeficiente de partição octanol-água (Log Kow) de 6,89, o que indica sua natureza lipofílica (NTP, 2006). Em temperaturas da ordem de 400 °C a 1000 °C em presença de oxigênio, os PCBs oxidam-se parcialmente, gerando compostos da classe dos PCDDs e PCDFs (NTP, 2006).

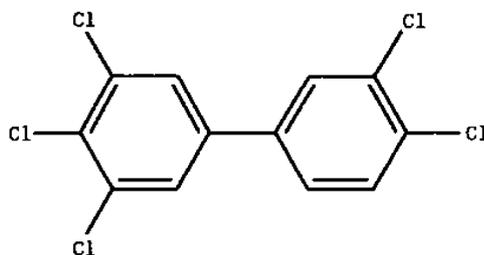


Figura 2: Estrutura química do PCB126

O PCB126 foi escolhido como objeto deste estudo, por ser considerado o PCB tipo-dioxina mais tóxico, uma vez que apresenta maior similaridade aos efeitos biológicos causados pelo TCDD, incluindo teratogênese, imunossupressão, e a promoção de tumores, afetando principalmente a pele, o fígado e o sistema nervoso (ATSDR, 2000). Além disso, o PCB126 é o responsável por 40 a 60% da potência tóxica total dos PCBs que possuem atividade tipo-dioxina (NTP, 2006).

Uma vez que grande parte das substâncias organocloradas apresenta um mecanismo comum de ação, no caso, a ligação ao receptor AhR (CONSONNI *et al.*, 2012; GUYOT *et al.*, 2012; NTP, 2006; SERDAR *et al.*, 2014), a exposição humana aos POPs é normalmente calculada levando-se em consideração a exposição global das substâncias tipo-dioxina ou, das misturas destas substâncias (CONSONNI *et al.*, 2012). Assim, a avaliação do risco pode ser um processo complexo, já que podemos estar expostos a uma mistura variável de compostos tipo-dioxina e não somente a uma única substância isoladamente (CONSONNI *et al.*, 2012). Para tanto, calculamos o equivalente tóxico (TEQ) total da exposição, onde além de, mensurar a concentração de cada substância, se deve saber o valor do fator de equivalência tóxica (TEF) equivalente, uma vez que o TEQ é definido como a soma dos produtos da concentração de cada composto do grupo em uma amostra multiplicado pelo seu TEF (CONSONNI *et al.*, 2012; NTP, 2006).

O TEF de uma substância é um cálculo de potência relativa, onde o TCDD é considerado a substância mais tóxica dentre os POPs, sendo utilizado como

substância tóxica de referência e apresenta o valor de TEF igual a 1,0 (NTP, 2006). O valor de TEF do PCB126, por sua vez, é calculado normalizando sua toxicidade em relação ao composto indicador, e apresenta valor de TEF igual a 0,1 (NTP, 2006).

Desta forma, determinar para estes poluentes a dose limite de exposição, ou seja, a dose abaixo da qual a probabilidade de um indivíduo exposto responder é zero, acaba sendo uma tarefa complexa. No Brasil, de acordo com a Instrução normativa nº 11, de 22 de maio de 2012, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os limites de referência para soma de PCBs de acordo com o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal, é de 200 µg/g de gordura em carne, 100 µg/L no leite, 15 µg/kg no peixe de cultivo e 10 µg/kg em ovos. Já para os PCBs presentes no meio ambiente, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) prevê valores máximos permitidos de 0,5 µg/L para a soma dos PCBs 28, 52, 101, 118, 138, 153 e, 180, presente na água para consumo (CONAMA, 2008).

Por outro lado, a legislação brasileira não determina os limites de exposição seguros para exposição aos PCBs no ambiente ocupacional. Como referência, podemos nos basear em limites internacionais sugeridos pela ACGIH (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*) ou pela OSHA (*Occupational Safety and Health Administration*), em que o valor do TLV-TWA (*Threshold Limit Values-Time weight average*) estabelecido é de 1 mg/m³ para a mistura de congêneres de PCBs conhecida como Aroclor 1242 (42% de cloração) e de 0,5 mg/m³ para o Aroclor 1254 (54% de cloração), determinado para uma jornada de trabalho de 40 horas semanais, cinco dias por semana, oito horas por dia, valores estes baseados na prevenção de injúrias no fígado em trabalhadores expostos aos PCBs (ATSDR, 2000). Adicionalmente, estas instituições preveem que a concentração total que não pode ser ultrapassada em nenhum momento durante a jornada de trabalho (TLV-STEL) é 2 mg/m³ e 1 mg/m³, respectivamente (ATSDR, 2000). Vale ressaltar que estes limites se referem não somente à exposição por via inalatória, mas também pela via cutânea, incluindo exposição a membranas mucosas, os olhos e o contato direto com a pele (ATSDR, 2000).

Uma vez que o transporte pelo ar é o principal mecanismo para a dispersão global destes compostos (ABB *et al.*, 2010; BRÄUNER *et al.*, 2011; DE AZEVEDO E SILVA *et al.*, 2007; HAZRATI; HARRAD, 2006; 2007; HASSOUN; PERIANDRI-STEINBERG, 2010; MREMA *et al.*, 2012), muitos autores têm destacado que são

necessários estudos aprofundados em relação aos efeitos de POPs, incluindo dos PCBs, em ambientes fechados para se compreender o estabelecimento e agravamento de doenças respiratórias. Vale ressaltar que os dados da literatura sobre exposição inalatória a estes poluentes emergentes são escassos e limitados (ANNAMALAI; NAMASIVAYAM 2015; HU *et al.*, 2010; HULIN *et al.*, 2012; ROBERTSON; LUDEWIG, 2011).

Em adultos, a via oral compreende uma importante via de exposição, representando cerca de 90% do total de contaminação, enquanto que a via inalatória e dérmica são as principais vias de exposição ocupacional a estes compostos (MREMA *et al.*, 2012; RUZZIN *et al.*, 2010; TIEMANN, 2008). Estudos no Brasil têm demonstrado que homens e mulheres da região da grande São Paulo apresentam altas concentrações de PCBs no soro (NOGUEIRA *et al.* 1987; WASSERMANN *et al.*, 1976). Adicionalmente, os autores verificaram uma diferença entre as concentrações encontradas em homens (0,7417 ppm) e em mulheres (1,0748 ppm), e sugerem uma diferença na alimentação entre eles (NOGUEIRA *et al.* 1987). Vale ressaltar que não há dados disponíveis no Brasil em relação à concentração encontrada na atmosfera ou ainda, de efeitos tóxicos decorrentes desta via de exposição.

Após a fase de exposição, os PCBs são bem absorvidos pelo trato gastrointestinal, e uma vez absorvidos, são transportados primeiramente pelo sistema linfático, pelos quilomícrons, sendo assim distribuídos por todo o organismo (ATSDR, 2000; NTP, 2006; WHO, 2000). No sangue, a distribuição está principalmente relacionada às lipoproteínas, lipídios do soro e uma menor fração à albumina e componentes celulares (ATSDR, 2000; NTP, 2006; WHO, 2000). O padrão de distribuição é determinado pela estrutura, características físico-químicas do componente e a sua ligação ao citocromo P4501A2 (NTP, 2006). Os principais sítios de distribuição da substância em ratos, nos primeiros dias de exposição são o fígado, o tecido adiposo e em uma quantidade menor, a pele e a glândula tireoide (ATSDR, 2000; NTP, 2006; WHO, 2000). Em humanos, os principais sítios de distribuição são o fígado e os músculos (ATSDR, 2000; NTP, 2006; WHO, 2000)

Assim, o primeiro sítio de metabolismo dos PCBs geralmente ocorre no fígado pela hidroxilação e conjugação com ácido glicurônico e sulfato (ATSDR, 2000; NTP, 2006; WHO, 2000). Geralmente, os PCBs com mais de cinco átomos de cloro são menos susceptíveis a hidroxilação e apresentam maior tempo de meia vida (ATSDR,

2000; NTP, 2006; WHO, 2000). A biotransformação dos PCBs começa com a oxigenação dependente de citocromo P450, onde se predomina a formação de metabólitos hidroxilados (OH-PCBs), ocorrendo hidroxilação por inserção direta em posição meta ou ainda, pode ocorrer formação de um óxido intermediário (ATSDR, 2000; NTP, 2006; WHO, 2000).

Alguns dos OH-PCBs formados são persistentes no organismo, enquanto que outros sofrem reação de conjugação com o ácido glicurônico ou sulfato, o que aumenta a sua hidrossolubilidade e facilita a excreção pela bile (ATSDR, 2000; NTP, 2006; WHO, 2000). Já os óxidos intermediários, podem formar os PCBs metil sulfonados (MeSO₂-PCBs), que tendem a se acumular no organismo (ATSDR, 2000; NTP, 2006; WHO, 2000). Tipicamente, os congêneres menos clorados são rapidamente metabolizados e excretados, enquanto os congêneres altamente clorados são metabolizados lentamente, tendendo a se depositar principalmente no tecido adiposo, mas também na pele, fígado, rim, músculos e pulmão (ATSDR, 2000; NTP, 2006; WHO, 2000;).

A excreção dos PCBs é dependente da taxa de metabolismo a produtos polares. A maioria dos PCBs apresenta um perfil de eliminação bifásico, ou seja, um acentuado declínio inicial e um declínio subsequente lento e dependente de sua estrutura (ATSDR, 2000; NTP, 2006; WHO, 2000). Os metabólitos de todos os congêneres são eliminados primeiramente pela bile e fezes (ATSDR, 2000; NTP, 2006; WHO, 2000). Entretanto, uma pequena parte (<5%) pode ser eliminada na urina, principalmente os congêneres pouco clorados (ATSDR, 2000; NTP, 2006; WHO, 2000).

Como já mencionado, dependendo da localização e quantidade de átomos de cloro na molécula, alguns POPs apresentam a habilidade de se ligar a um receptor citosólico conhecido como AhR (GUYOT *et al.*, 2012; SERDAR *et al.*, 2014). O TCDD, comumente conhecido como dioxina, é o mais bem caracterizado membro deste grupo, e exibe uma alta capacidade de ligação a este receptor (CHOPRA *et al.*, 2012; GU *et al.*, 2000; GUYOT *et al.*, 2012; LAI *et al.*, 2010; NTP, 2006; STOCKINGER *et al.*, 2011).

O AhR é uma proteína encontrada no citosol de todas as espécies de invertebrados e vertebrados como um complexo multimérico composto de chaperonas (proteína de choque térmico hsp90, p23, e proteína associada AhR), e atua como um fator de transcrição ativado por ligante, onde após a ligação inicial do

agonista, há a ativação do receptor e subsequente translocação para o núcleo, onde acontece a heterodimerização com a proteína nuclear transportadora de AhR (ARNT). No núcleo, o complexo heterodímero formado, agonista-AhR-ARNT, se liga a uma sequência específica do DNA, conhecida como DRE/XRE (sequência de elementos responsivos a xenobióticos) que ativa a transcrição de genes específicos, tais como enzimas do complexo do citocromo (CYP) P450, como CYP1A1 e CYP1A2, do repressor AhR (AhRR), a expressão de enzimas de fase I ou II do metabolismo, de enzimas envolvidas na proliferação, na regulação do ciclo celular e na apoptose, entre outras, que em conjunto, constituem um mecanismo plausível para explicar a toxicidade e a carcinogenicidade destas substâncias ligantes (CHOPRA *et al.*, 2012; GU *et al.*, 2000; GUYOT *et al.*, 2012; LAI *et al.*, 2010; NTP, 2006; STOCKINGER *et al.*, 2011). A figura 3 ilustra a via de sinalização mediada pela ativação do AhR.

Recentemente, tem sido descrito que outros compostos, como substâncias endógenas, também apresentam capacidade de ligação ao AhR. Além de xenobióticos, como os descritos até o momento, compostos como os polifenóis, quercitina, resveratrol, subprodutos do metabolismo do triptofano, ácido araquidônico, leucotrienos, e produtos da degradação do heme ativam o AhR, induzindo ativação da resposta por vias alternativas (GUYOT *et al.*, 2012; NTP, 2006). Tais vias alternativas incluem a interação do receptor AhR com fatores de transcrição envolvidos com a resposta celular, como por exemplo, o NF- κ B e o receptor de estrógeno (BEISCHLAG *et al.*, 2008; CASADO *et al.*, 2010; STOCKINGER *et al.*, 2014). Esta constatação, juntamente com estudos com animais nocaute para AhR indicam um papel fisiológico desse receptor, uma vez que a falta do receptor AhR em camundongos indica um fenótipo de resistência à toxicidade da dioxina, infertilidade, anormalidades no fígado e coração, atraso no desenvolvimento e maior sensibilidade a infecções (GUYOT *et al.*, 2012).

Desta forma, a toxicidade do PCB126 é manifestada por lesões de pele, alterações imunes, anormalidades no sistema reprodutivo, aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e do fígado, e diabetes (EVERETT; THOMPSON, 2014; LIND *et al.*, 2004). No ano de 2013, a IARC (*International Agency for Research on Cancer*) classificou o PCB126 como carcinogênico para humanos (Grupo 1), com base na extensa evidência de carcinogenicidade mediada pelo receptor AhR (LAUBY-SECRETAN *et al.*, 2013).

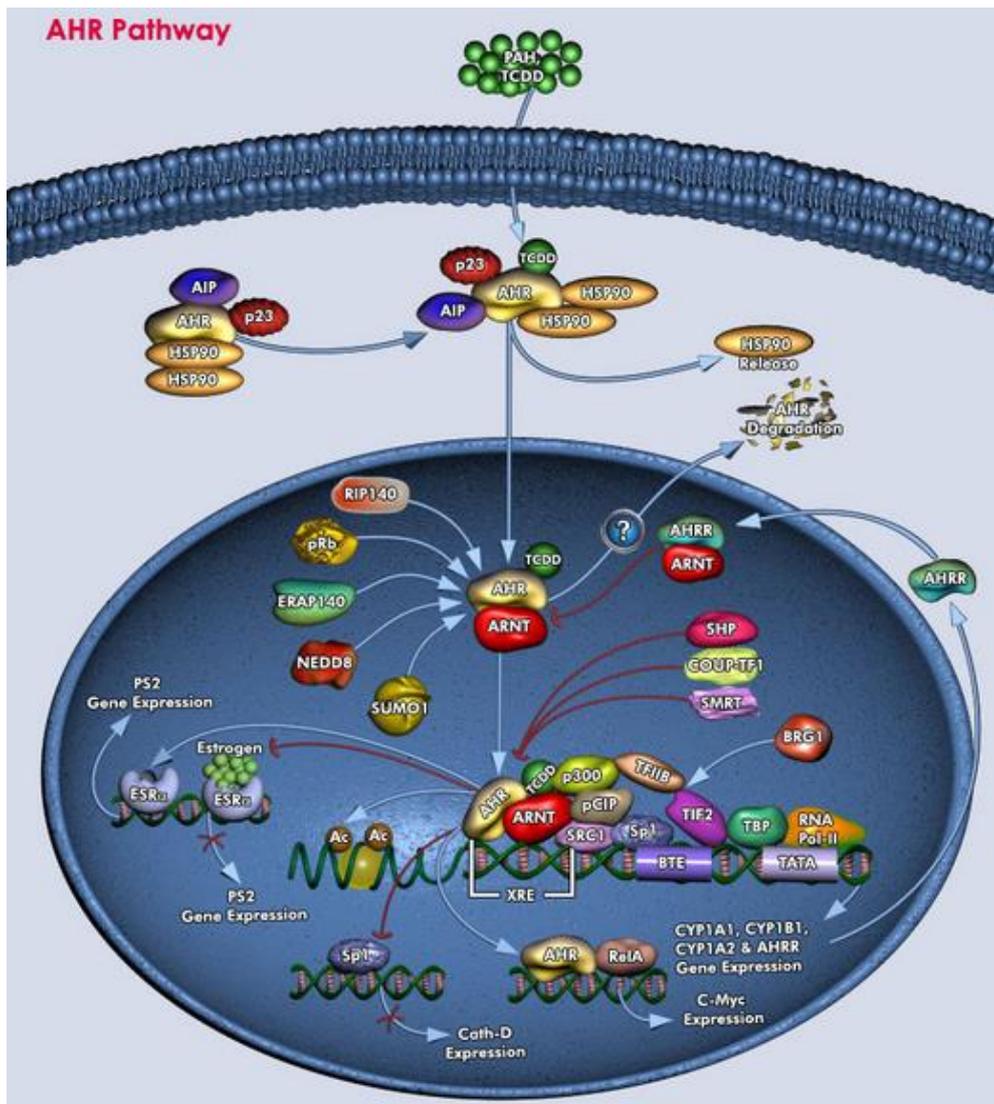


Figura 3: Modelo da via de sinalização da dioxina.

Retirado de: QIAGEN© 2009 QIAGEN, *all rights reserved*

Siglas PAH: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina; HSP90: *heat shock protein 90*; AHR: receptor aril hidrocarboneto; XRE: região responsiva à xenobióticos; AHRR: repressor do receptor aril hidrocarboneto; ARNT: fator de transcrição do receptor aril hidrocarboneto; AIP: Proteína de interação do receptor aril hidrocarboneto; SRC1: *Steroid Receptor Coactivator-1*; SHP: *Small Heterodimer Partner*; SMRT: *Silencing Mediator for Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptor*; COUPTF1: *Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor-1*; CYP1A1: *Cytochrome P450 Family-1 Subfamily-A Polypeptide-1*; CYP1A2: *Cytochrome P450 Family-1 Subfamily-A Polypeptide-2*; CYP1B1: *Cytochrome P450 Family-1 Subfamily-B Polypeptide-1*; RelA: *NF-KappaB subunit*; BRG1: *Brahma-Related Gene-1*; Sp1: *Transcription Factor SP1*; PS2: *Gastrointestinal Trefoil Protein-pS2*; SUMO1: *Small Ubiquitin Related Modifier-1*; NEDD8: *Neural precursor cell Expressed, Developmentally Down-regulated-8*; ESR: *Estrogen Receptor*; Pol II: *RNA Polymerase-II*; BTE: *basic transcription element*; TIF2: *Transcriptional Intermediary Factor-2*; Cath-D: *Cathepsin D*; Rb: *retinoblastoma 1*; c-Myc: *Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog*; pCIP: *p300/CBP-interacting protein*; p300: *a histone acetyltransferase*; TBP: *TATA-binding protein*; ERAP140: *estrogen receptor associated protein*.

A carcinogenicidade dos PCBs pode ser verificada pela exposição a congêneres individuais, mistura binária de congêneres, misturas comerciais e ainda, por misturas formadas no ambiente. Isoladamente, principalmente o PCB126 e o PCB118, em estudos realizados por dois anos em ratos, induziram desenvolvimento

de tumor benigno e maligno no fígado, pulmão e mucosa oral, indicando assim, evidência suficiente de indução de carcinogenicidade em animais de experimentação (LAUBY-SECRETAN *et al.*, 2013).

A toxicidade dos PCBs sobre o sistema imune tem sido relatada, mas é controversa na literatura, pois a depressão e a estimulação do sistema imune têm sido descritas e associadas como efeito tóxico decorrente da exposição em longo prazo aos PCBs, em estudos *in vivo* e *in vitro* (DUFFY-WHRITENOUR *et al.*, 2010; HORVÁTHOVÁ *et al.*, 2011; SERDAR *et al.*, 2014; LEVIN *et al.*, 2005; LEIJS *et al.*, 2009)

1.2 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) é conhecida como uma desordem metabólica de múltipla etiologia caracterizada por hiperglicemia crônica associada a distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, decorrentes de uma produção e/ou ação deficiente da insulina, um hormônio regulador do metabolismo energético (*World Health Organization, WHO, 1999*).

O DM é uma doença que gera enormes preocupações de saúde pública, uma vez que, impõe uma pesada carga econômica aos sistemas de saúde. Os gastos destinados ao tratamento e prevenção do diabetes e suas complicações foram orçados, nos Estados Unidos, em 612 bilhões de dólares em 2014 (IDF, 2013). No Brasil, estudo de Bahia e colaboradores (2011) mostrou que os gastos anuais do Sistema Único de Saúde (SUS) podem chegar a US\$ 3.199 dólares por paciente, incluindo custos diretos e indiretos do DM. A Federação Internacional de Diabetes (IDF) estimou a população com diabetes no Brasil em 2013 em cerca de 11,6 milhões de pessoas (IDF, 2013). Dessa forma, chega-se a valores próximos aos 25 bilhões de dólares gastos no país em 2011 com essa doença. Estimativas indicam que o DM aumentará 60% na América do Sul e América Central em 2035, a qual totalizará 592 milhões de pessoas no munto (IDF, 2013), de forma a multiplicar por dois ou três os custos com a doença. Contudo, esses valores se apequenam diante do impacto que essa doença causa aos indivíduos (cegueira, amputações, transplantes renais e morte) e conseqüentemente, a suas famílias.

Segundo a *American Diabetes Association* (ADA; 2015), o DM pode ser classificado em quatro tipos, a saber: diabetes do tipo I (DM1), diabetes do tipo II (DM2), outros tipos específicos de diabetes (induzida por medicamentos, endocrinopatias, entre outros) e diabetes gestacional.

Os critérios adotados para diagnóstico do DM são: valores de hemoglobina glicada (A1C) superior a 6,5%; glicemia de jejum (pelo menos oito horas) maior ou igual a 126 mg/dL (7,0 mmol/L); e glicemia pós-prandial de 2 horas igual ou superior a 200 mg/dL (11,1 mmol/L) durante teste oral de tolerância à glicose, com a utilização de uma carga de 75 g de glicose em água (ADA, 2015).

O DM1, ou também conhecido como diabetes mellitus insulino-dependente, é responsável por 5-10% dos casos de DM. É caracterizada pela destruição autoimune de células β do pâncreas que leva a uma deficiência absoluta na secreção de insulina. A destruição autoimune de células β é relacionada a múltiplas

predisposições genéticas e inúmeros fatores ambientais, mas que ainda são pouco definidos (ADA, 2015).

O DM2, por sua vez, acomete cerca de 90-95% dos casos de diabetes e acontece devido à combinação de resistência à ação da insulina e uma resposta compensatória inadequada de secreção da mesma. Embora não exista uma etiologia conhecida, o risco de desenvolver este tipo de DM aumenta com a idade, obesidade e sedentarismo (ADA, 2015; FONSECA, 2009). Maior destaque para o DM2 será dado adiante, enquanto os demais tipos de diabetes não serão abordados neste trabalho.

A hiperglicemia crônica (igual ou superior a 200 mg/dL) pode levar a algumas complicações, especialmente dos olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. Dessa forma, pacientes com DM ocasionalmente apresentam perda de visão, nefropatia, neuropatia periférica, com risco de amputações, e neuropatia autônoma, sendo que esta última alteração leva a sintomas nos tratos gastrointestinal, geniturinário e cardiovascular. Além disso, os pacientes podem apresentar um aumento na incidência de doença cardiovascular aterosclerótica e cerebrovascular, além de hipertensão e anormalidades no metabolismo lipoprotéico, o que pode levar a óbito (ADA, 2015; FONSECA, 2009).

Por estas razões, é de suma importância que o diagnóstico precoce e o acompanhamento do paciente sejam efetivos (ADA, 2015). Pacientes que apresentam níveis de A1C entre 5,7% e 6,4%, glicemia em jejum de 100-125 mg/dL (5,6-6,9 mmol/L) e/ou glicemia de 140-199 mg/dL (7,8-11,0 mmol/L), 2 horas após teste de tolerância à glicose, são considerados em estágio intermediário da doença, ou seja, apresentam alto risco de progressão para desenvolver DM (ADA, 2015; FONSECA, 2009). Os fatores associados com a progressão são: ganho de massa, idade avançada, altas concentrações de insulina no plasma, dislipidemia, hipertensão, diminuição da resposta da insulina à glicose, perda da função da célula β e adesão ao tratamento (FONSECA, 2009).

Além das alterações no metabolismo descritas acima, o DM tem sido descrito como uma condição pró-inflamatória, pois as concentrações dos mediadores inflamatórios, como a interleucina-6 (IL-6), o fator de necrose tumoral (TNF), a proteína C reativa (PCR) e o inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1) estão elevados no plasma destes pacientes durante o estado de resistência à insulina, podendo estar relacionados com o desenvolvimento e progressão de complicações

microvasculares do DM (DANDONA *et al.*, 2004; DONATH *et al.*, 2010; HOTAMISLIGIL 2006; KAUL *et al.*, 2010).

Uma vez que o DM é de incidência crescente no mundo e as causas da gênese desta doença ainda não estão totalmente estabelecidas, estudos que visem elucidar os mecanismos e agentes indutores do DM, bem como indicadores de estados pré-diabéticos precoces, são de grande importância para condução de políticas de saúde pública que amenizem o impacto dessa doença (POUR; DAGOGO-JACK, 2010; WEST *et al.*, 2010).

1.2.1 Fisiopatologia do DM2

Para melhor compreensão da fisiopatologia do DM2, precisamos conhecer os mecanismos envolvidos com a regulação da homeostase glicêmica. Em condições fisiológicas, as concentrações sanguíneas de glicose oscilam em uma faixa estreita. Tal fenômeno é imprescindível para garantir oferta adequada de nutrientes aos tecidos e a homeostasia, uma vez que a glicose pode regular a transcrição de genes, a atividade de enzimas, a secreção de hormônios e a atividade de neurônios, já que é a maior fonte de energia para todos os tipos celulares de mamíferos (THORENS; MUECKLER, 2010).

A captação da glicose pelos tecidos é o passo limitante da velocidade da sua utilização e/ou armazenamento (DEFRONZO, 2004; LETO; SALTIEL, 2012; THORENS; MUECKLER, 2010); assim, a glicose adquire um papel como molécula de sinalização no controle da homeostase energética. Na maioria dos tecidos, a captação de glicose é controlada pela expressão dos transportadores de glicose presentes na superfície celular, o GLUT/SLC2A (DEFRONZO, 2004; LETO; SALTIEL, 2012; THORENS; MUECKLER, 2010). GLUTs (*glucose transport proteins*) são uma família de proteínas que possuem aproximadamente 500 aminoácidos e apresentam 12 domínios alfa hélices transmembrana (DEFRONZO, 2004; LETO; SALTIEL, 2012; THORENS; MUECKLER, 2010). Cada um dos 14 GLUTs descritos em humanos tem um papel específico no controle da homeostase, seja por sua expressão tecido-restrito, suas características cinéticas, sua especificidade de substrato, ou seus mecanismos de regulação da sua expressão na superfície celular (DEFRONZO, 2004; LETO; SALTIEL, 2012; THORENS; MUECKLER, 2010).

As isoformas de GLUT1-4 são as mais bem compreendidas, formando a classe I de transportadores de glicose (DEFRONZO, 2004; LETO; SALTIEL, 2012;

MACHADO *et al.*, 2006; THORENS; MUECKLER, 2010). O GLUT2 é expresso em grandes quantidades em células β pancreáticas, hepatócitos, células epiteliais do intestino e rins (THORENS; MUECKLER, 2010). Por outro lado, o GLUT4 é predominantemente expresso em adipócitos e células musculares (DEFRONZO, 2004; LETO; SALTIEL, 2012; MACHADO *et al.*, 2006; THORENS; MUECKLER, 2010). De forma geral, a maioria dos GLUTs transferem os substratos bidirecionalmente, a favor do gradiente de concentração, atravessando-os pela membrana de uma forma independente de energia, ou seja, por difusão facilitada (LETO; SALTIEL, 2012; MACHADO *et al.*, 2006; THORENS; MUECKLER, 2010).

A glicose é o principal estímulo para a secreção e síntese de insulina. Outros hormônios como as incretinas: *glucose-dependent insulintropic polypeptide* (GIP) e *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) também possuem essa função (GIRARD, 2008). Por se tratar do único hormônio hipoglicemiante, a insulina, que é um polipeptídeo anabólico produzido pelas células β do pâncreas, dispõe de um eficiente sistema de controle de síntese e secreção.

A porção endócrina do pâncreas é composta pelas ilhotas de Langerhans (cerca de 1-2% da massa pancreática), uma complexa estrutura celular que regula a homeostase de glicose através da liberação balanceada de hormônios na corrente sanguínea. As ilhotas de Langerhans são compostas por diferentes tipos de células classificadas de acordo com sua secreção, a saber: α (alfa), β (beta), δ (delta), PP (produtoras de polipeptídeo pancreático) e ϵ (épsilon) (ELAYAT *et al.*, 1995). As células β , secretoras de insulina, compreendem 50 a 80% do total de células nas ilhotas pancreáticas (ELAYAT *et al.*, 1995). As células α representam 15 a 20% das células presentes nas ilhotas pancreáticas e são secretoras de glucagon, que é um hormônio contra-regulatório da insulina, de fundamental importância para a homeostase da glicose, pois estimula a glicogenólise e gliconeogênese (ELAYAT *et al.*, 1995; HEPPNER *et al.*, 2010). As células δ são secretoras de somatostatina, que no pâncreas, exerce um papel importante na regulação da secreção de insulina e glucagon (STROWSKI; BLAKE, 2008). As células PP são secretoras do polipeptídeo pancreático, que parece ter ação na inibição da secreção pancreática (STANLEY *et al.*, 2004). A grelina é secretada pelas células ϵ no pâncreas e por células da mucosa intestinal e gástrica. Apresenta um largo espectro de efeitos biológicos, mas no pâncreas, regula a homeostase da glicose por regular a secreção e sensibilidade da insulina (OTTO-BUCZKOWSKA; CHOBOT, 2012).

A síntese de insulina inicia-se com seu precursor, a pré-pró-insulina, no retículo endoplasmático, com sua consequente conversão em pró-insulina, que será transportada para o complexo de Golgi, onde será empacotada em grânulos secretórios imaturos localizados próximos a membrana celular (BAILYES *et al.*, 1997; HOU *et al.*, 2009). Nestes grânulos, a pró-insulina sofre uma clivagem proteolítica, formando insulina e C-peptídeo, que serão estocados em vesículas intracelulares até que estímulos apropriados causem sua exocitose e secreção (HOU *et al.*, 2009). Durante o processo de maturação dos grânulos, a insulina é cristalizada com zinco e cálcio formando grânulos maduros que podemos diferenciar em duas populações intracelulares, os de liberação rápida (RRP) e os de reserva (DEFRONZO, 2004; HOU *et al.*, 2009).

Como já mencionado, nas células β pancreáticas, a entrada da glicose é garantida por um transportador de alta capacidade e baixa afinidade, o GLUT2 (MACHADO, 2006). Após sua entrada, a glicose é fosforilada em glicose-6-fosfato pela ação principalmente da enzima glicocinase, sendo a seguir direcionada à glicólise, etapa que consome 90% da glicose transportada ao interior da célula β e responsável pela geração de piruvato (GRODSKY; BENNETT, 1963). A elevação da concentração intracelular de glicose-6-fosfato promove a elevação da produção de ATP (adenosina trifosfato), o fechamento de canais de K^+ sensíveis a ATP (K_{ATP}), levando à despolarização da membrana, e a abertura de canais voltagem-dependentes para o Ca^{2+} , permitindo o influxo de Ca^{2+} e exocitose das vesículas contendo insulina (MCTAGGART *et al.*, 2010).

A liberação da insulina ocorre em duas fases. Na primeira fase, os grânulos RRP estão associados com a membrana plasmática e liberam insulina rapidamente de uma maneira cálcio-dependente (HOU *et al.*, 2009). Na segunda fase da secreção de insulina, os grânulos de reserva devem sofrer um deslocamento para a membrana plasmática, requerendo aumento do cálcio intracelular, através do fechamento dos canais K_{ATP} , como anteriormente mencionado (HOU *et al.*, 2009). Estudos recentes têm demonstrado que a liberação de óxido nítrico (NO) é importante na regulação da secreção de insulina pelas células β em resposta à elevação dos níveis de glicose (ECKERSTEN; HENNINGSSON, 2012; NUNEMAKER *et al.*, 2007).

Uma vez liberada, a insulina apresenta efeitos imediatos em diferentes tecidos periféricos. Suas ações são mediadas através da ligação ao receptor de

insulina (IR), uma proteína de membrana distribuída em praticamente todos os tecidos, principalmente no tecido adiposo, fígado, coração, pulmão e músculos (BAILYES *et al.*, 1997; DEFRONZO, 2004). Após ativação, o IR promove a fosforilação do substrato do receptor de insulina intracelular (IRS), criando sítios de reconhecimento para moléculas que possuem domínios com homologia a Src 2 (SH2) (HOU *et al.*, 2009). A enzima fosfoinosítideo-3-quinase (PI 3-quinase) é um dos principais alvos de fosforilação pelo IRS e responsável por grande parte dos efeitos metabólicos da insulina via ativação da proteína quinase B, também conhecida como AKT (proteína quinase B) e quinase-1 dependente de fosfoinosítideo (PDK1) (KASUGA, 2006).

Os tecidos sensíveis à insulina, como fígado, músculos e adipócitos, sob estímulo hormonal, são capazes de aumentar aguda e intensamente a capacidade de transportar glicose. Nestes órgãos, a insulina estimula a translocação do transportador GLUT4 para a membrana celular e a captação de glicose (MACHADO, 2006; LETO; SALTIEL, 2012). Em condições basais, 10% dos receptores GLUT4 se encontram na membrana citoplasmática, e 90% em vesículas intracelulares (LETO; SALTIEL, 2012). Como já mencionado, após ligação da insulina ao seu receptor (IR), ocorre fosforilação do IRS, ativando por sua vez a AKT (HOU *et al.*, 2009; MCTAGGART *et al.*, 2010). A AKT é a conexão central da sinalização da insulina com a regulação da mobilização de GLUT4, pois ativa pequenas GTPases (TBC1D4 e RGC) que estão envolvidas na translocação e direcionamento das vesículas de armazenamento intracelulares de GLUT4 para a membrana celular (LETO; SALTIEL, 2012). Ainda não está elucidada a participação da AKT em outras etapas da mobilização, como a endocitose, a triagem e a formação de vesículas de armazenamento (LETO; SALTIEL, 2012). Além disso, a insulina apresenta efeitos imediatos que incluem o aumento da síntese de proteínas, triglicerídeos e glicogênio, a inibição do processo de gliconeogênese, a glicogenólise, a lipólise e a proteólise (JOSHI *et al.*, 2007; LETO; SALTIEL, 2012).

A resistência insulínica é uma condição onde há incapacidade de resposta tecidual às concentrações circulantes da insulina, conseqüentemente diminuindo as ações do hormônio nos tecidos-alvo (KASUGA, 2006; MATTHAEI *et al.*, 2000). Como resposta, as células β pancreáticas passam a secretar quantidade elevada de insulina a fim de compensar a hiperglicemia (BUTLER *et al.*, 2003; KASUGA, 2006; PRENTKI; NOLAN, 2006). O aumento da capacidade secretória nesta fase pode ser

resultado do aumento do número de células β nas ilhotas e/ou aumento da habilidade das células β em sintetizar/secretar insulina (PRENTKI; NOLAN, 2006). Após este período compensatório, a sobrecarga sofrida pelas células β pode levar à sua falência, e podemos visualizar significativa redução de seu volume como resultado de exacerbação da apoptose (BUTLER *et al.*, 2003; KASUGA, 2006).

Os mecanismos envolvidos no comprometimento progressivo das células β durante a evolução do DM2 não estão bem esclarecidos, porém acredita-se que as células β durante o período de compensação são expostas a mudanças metabólicas associadas com a obesidade. Desta forma, fatores comumente associados à obesidade, como liberação de adipocinas (leptina, adiponectinas, resistina, TNF, proteína quimioatraente de monócitos-1; MCP-1), liberação de ácidos graxos livres, de espécies reativas de oxigênio, disfunção mitocondrial, e formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), podem ser possíveis indutores da falência das células β (KASUGA, 2006).

Os adipócitos e tecido adiposo exercem um papel importante na patogênese da resistência à insulina associada à obesidade. Como mencionado, nestes casos, a liberação de adipocinas e inflamação acabam por estar intimamente relacionadas entre si (KASUGA, 2006). O TNF parece contribuir indiretamente para a resistência à insulina, promovendo a lipólise dos adipócitos e/ou inibição da diferenciação. Ainda, promove a fosforilação alternativa do receptor de insulina, prejudicando o transporte de GLUT4 para a membrana em tecido adiposo e músculo (BAKER *et al.*, 2013).

Diante do exposto, fica evidente que o DM2 representa o estágio final de uma síndrome progressiva e crônica causada pela combinação de resistência insulínica e comprometimento da função pancreática (MATTHAEI *et al.*, 2000). Entre os principais fatores de risco para desenvolvimento da doença estão os fatores ambientais e genéticos. A exposição aos poluentes ambientais e a prevalência da doença está bem associada em estudos epidemiológicos, mas não totalmente elucidadas quanto aos mecanismos de ação, assim, no tópico a seguir abordarmos a relação entre o desenvolvimento do DM e a exposição aos PCBs.

1.3 Interação entre exposição aos PCBs e desenvolvimento de DM

A literatura, a partir de 2010, tem relatado estudos que demonstram uma correlação positiva entre a exposição a poluentes ambientais, obesidade e DM. Estes quadros de doenças se intensificam com o aumento da concentração

plasmática destes poluentes, em especial dos POPs, entre eles, os PCBs (FIERENS *et al.*, 2003; JONES *et al.*, 2008; SCHELL *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2011; 2014; PERSKY *et al.*, 2012; SILVERSTONE *et al.*, 2012; ROOS *et al.*, 2013; TAYLOR *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2013; TANG *et al.*, 2014; GHOSH *et al.*, 2014; JAACKS; STAIMEZ, 2015; SUAREZ-LOPEZ *et al.*, 2015). Uma explicação plausível para as associações encontradas é que o DM causa uma desregulação no metabolismo lipídico, prejudicando a distribuição e a eliminação de compostos lipofílicos, como as dioxinas e PCBs. Ademais, se após o diagnóstico de DM, os pacientes reduzirem sua massa por restrição alimentar, pode haver aumento da concentração de POPs no tecido adiposo restante (RIGNELL-HYDBOM *et al.*, 2007a, 2009b).

Lee e colaboradores, em 2011, encontraram relação entre a exposição simultânea a diferentes congêneres de PCBs e o desenvolvimento de obesidade, dislipidemia e resistência à insulina, precursores comuns do DM2 e doenças cardiovasculares. Por outro lado, Persky e colaboradores (2012) relataram que a exposição aos PCBs está positivamente relacionada à diabetes, mas não há associação da exposição com resistência à insulina ou com alterações nos níveis de outros hormônios endógenos, como T3 (tri-iodotironina), T4 (tiroxina), TSH (hormônio estimulante da tireoide) e hormônios sexuais, em homens e mulheres. Fierens e colaboradores (2003), em estudo realizado na Bélgica, encontraram altas concentrações dos PCB3, 8, 28, 52, 77, 81, 101, 118, 126, 138, 153, 169, 180, 194, 206 e 209 no soro de pacientes diabéticos (FIERENS *et al.*, 2003). Adicionalmente, Tanaka e colaboradores (2011) mostraram uma correlação positiva entre o PCB146 e 180 e a prevalência de diabetes, enquanto que com o PCB163/164 e 170 parece não haver esta associação, em pacientes japoneses.

Entre estudos experimentais em animais e estudos populacionais, a literatura apresenta alguns dados sobre a relação entre a exposição ao PCB126 e o DM. Everett e colaboradores (2007) sugerem que concentrações elevadas de PCB126, encontrados no sangue de indivíduos belgas, podem contribuir para o desenvolvimento de DM. No entanto, os autores não descartaram a possibilidade de estes indivíduos armazenarem maiores concentrações do poluente, uma vez que podem apresentar prejuízos no metabolismo e excreção do PCB126.

Da mesma forma, os dados da literatura com animais de experimentação são controversos. O tratamento em ratos, por 13 semanas com PCB126 a 100 ppb, associado à dieta, diminuiu os valores de glicose no soro (CHU *et al.*, 1994). Já em

2011, Zheng e colaboradores mostraram que a exposição por via oral, por três dias, ao PCB126, em camundongos, em concentrações de 0,3 a 30 µg/kg/dia, não alterou os valores basais de glicose no soro. Por outro lado, a maior concentração utilizada neste estudo elevou a concentração de colesterol. Corroborando os dados obtidos em 2004, por Lind e colaboradores, onde o tratamento intraperitoneal em ratas ovariectomizadas, de PCB126 na concentração total de 256 µg/kg de massa corporal, em um total de doze semanas, não alterou a concentração de glicose sanguínea, mas aumentou o colesterol total nos animais expostos.

Outro mecanismo pelo qual a exposição aos PCBs pode estar envolvida com o desenvolvimento do DM é pela alteração da adipogênese (BAKER *et al.*, 2003; GADUPUDI *et al.*, 2015). Baker e colaboradores (2013) mostraram que a exposição ao PCB77 ou PCB126 levou a alterações nas concentrações de glicose e na tolerância à insulina em camundongos e elevação na concentração de TNF no tecido adiposo, sugerindo que este tecido é alvo de ação importante destes poluentes. Em 2015, Gadupudi e colaboradores reforçam este conceito, ao mostrar que a exposição de pré-adipócitos ao PCB126 *in vitro* reduz a habilidade de diferenciação destas células, associada com a inibição do fator de transcrição PPAR γ , provavelmente causada pela ativação do receptor AhR.

Por mais que os mecanismos pelos quais as exposições ambientais levam à gênese do DM, não esteja totalmente estabelecido, a literatura é unânime em afirmar a relação aos efeitos relacionados aos POPs, em especial aos PCBs, alegando que a exposição a estes poluentes está relacionada a alterações metabólicas e da homeostasia do organismo.

Em conjunto, os dados aqui mostrados abordam dois problemas de saúde pública, a poluição e o aumento dos índices de DM na população. Uma vez que a literatura relata uma possível associação entre estes parâmetros, estudos aprofundados são necessários para a compreensão dos efeitos metabólicos e imunológicos causados pelos POPs, que poderiam contribuir para a gênese de doenças, dentre elas o DM.

2 Objetivos

Este trabalho foi delineado para investigar, experimentalmente, alterações inflamatórias e metabólicas desencadeadas pela exposição *in vivo* ao PCB126, com o intuito de identificar se estas alterações estão envolvidas na gênese do diabetes mellitus do tipo II.

3 Material e Métodos

3.1 Animais

Ratos Wistar machos, com massa entre 180 e 220 g, foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em biotério antes e durante o período de experimentos, sob as seguintes condições: temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade igual a $55 \pm 10\%$, 15-20 trocas de ar/hora), luminosidade com 12 horas luz/12 horas escuro e nutrição com ração comercial e esterilizada pelo método de irradiação gama. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com o número de protocolo CEUA/FCF/315 (Ver Anexos, item 8.3). Os animais foram anestesiados antes dos ensaios pela injeção intraperitoneal (i.p.) de cetamina (88 mg/kg; Vetbrands, Jacareí, SP) associada a xilazina (8 mg/kg; Vetbrands, Jacareí, SP) ou de pentobarbital de sódio (Hypnol[®], Cristália, São Paulo, SP), dependendo do ensaio. Para otimização e redução do uso de animais, foi realizada a coleta de maior quantidade possível de amostras em cada procedimento.

3.2 Protocolo de exposição

Os animais foram expostos ao PCB nº126 (PCB126; 3,3',4,4',5-pentaclorobifenila) por 15 dias consecutivos nas doses de 0,1; 1 ou 10 µg/kg de massa corpórea (solução a 0,0006; 0,006 e 0,06 mg/mL, respectivamente) por instilação intranasal forçada com auxílio de uma pipeta automática, em volume máximo de 50 µL. Os animais controles receberam a instilação intranasal do veículo, solução de cloreto de sódio 0,9% acrescido de 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO), este último, utilizado para solubilização do PCB126. O PCB126 foi obtido pela AccuStandard (New Haven, CT, EUA).

Para a realização do protocolo de exposição, todos os animais foram previamente anestesiados pela injeção i.p. de cetamina associada à xilazina. Os ensaios foram realizados 5 horas após as últimas exposições, uma vez que importantes parâmetros metabólicos foram avaliados. A figura 4 representa uma visão simplificada do protocolo de exposição e metodologia empregada neste trabalho.

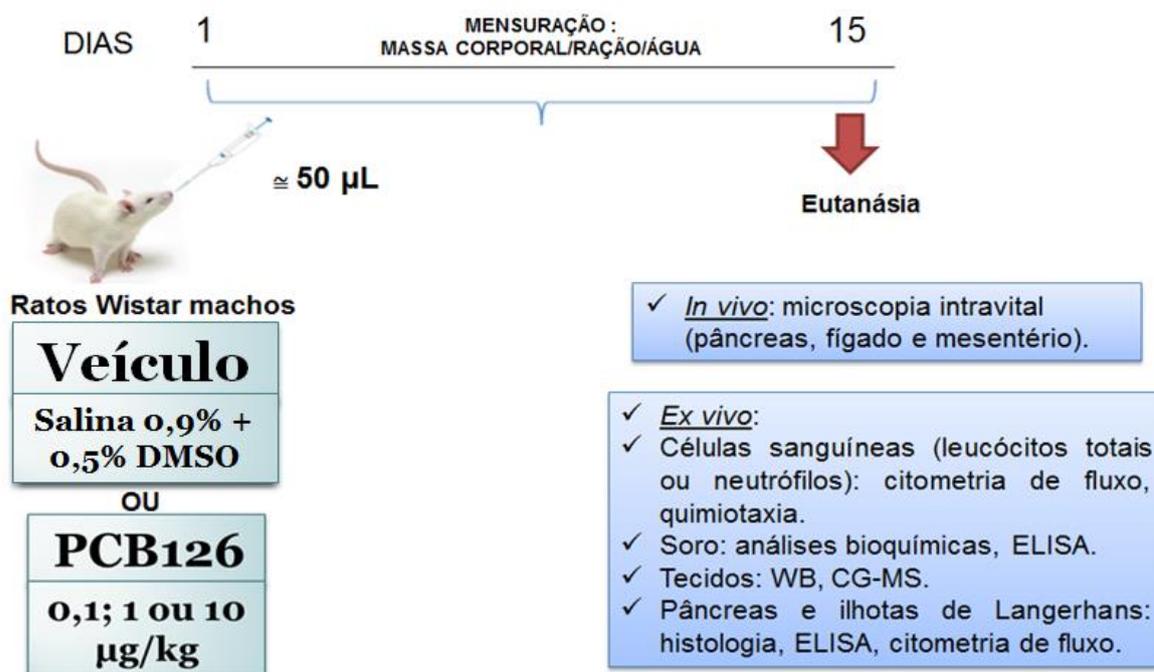


Figura 4: Representação simplificada do protocolo de exposição utilizado neste trabalho.

3.3 Caracterização da exposição

3.3.1 Pesagem dos animais

Todos os animais, após indução de anestesia conforme descrito no item anterior, foram diariamente monitorados quanto ao ganho de massa corpórea, com o auxílio de uma balança semi-analítica, previamente a cada protocolo de instilação intranasal. O dado obtido da massa de cada animal foi utilizado diariamente para cálculo do volume da solução de PCB126 a ser administrado.

3.3.2 Consumo de água e ração

Para avaliação do consumo de água e ração dos animais expostos ao PCB126 ou veículo, a quantidade de ração e a água ingeridas foram quantificadas

diariamente em balança semi-analítica e proveta, respectivamente, durante os 15 dias de tratamento.

3.3.3 Quantificação de PCB126 em amostras biológicas

Após as últimas exposições, os animais foram anestesiados com solução de cetamina e xilazina e eutanasiados para coleta das amostras de fígado e pulmão, para detecção e quantificação dos níveis de PCB126. Para tanto, seguimos a metodologia proposta por Poli *et al.* (2009), utilizando SPME (*solid phase micro extraction*). Aproximadamente 500 mg de tecido foram pesados e homogeneizados com 5 mL de solução de cloreto de potássio (KCl) 10%. As análises foram conduzidas no modo *headspace* (HS), empregando-se a técnica de microextração em fase sólida (SPME), para extração e concentração do composto-alvo (PCB126) e padrão interno (PCB52), seguida da detecção em um cromatógrafo em fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas do tipo quadropolo (GC-MS 5975C INERT XL EI/CI, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

Desta forma, utilizando um amostrador automático (GC Sampler 80, Agilent Technologies), as amostras foram incubadas a 100 °C e expostas a uma fibra de poliacrilato (PA 85 µm; Supelco, Bellefonte, PA, EUA) por 40 min. A dessorção foi realizada no injetor, a 280 °C, por 10 minutos.

A separação foi obtida pelo emprego de uma coluna HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,50 µm; Agilent Technologies), com a seguinte programação de temperatura do forno: de 100 °C a 280 °C, a 30 °C/minuto, e 280 °C mantidos por 5 minutos, com um tempo total de corrida de 11 minutos. Gás hélio foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo constante de 1 mL/minuto. As injeções foram realizadas no modo *splitless* e a temperatura do injetor e da linha de transferência mantidas em 280 °C. A ionização foi promovida por impacto de elétrons (EI) a 70 eV e temperatura da fonte de íons mantida a 280 °C.

Os PCBs 126 e 52 foram previamente analisados no modo *scan* (50-400 m/z), para que fossem definidos os tempos de retenção destes compostos. Os espectros obtidos foram comparados com a base de dados NIST (*National Institute of Standards and Technology*, Gaithersburg, EUA), para confirmação da identidade dos analitos. Posteriormente, a aquisição foi feita no modo SIM (*selected-ion monitoring*), pelo monitoramento dos íons de m/z 222, 292 e 328 para o PCB126 e de m/z 220,

290 e 326 para o PCB52, sendo os íons de m/z 326 e 292 usados como quantificadores.

Foram construídas curvas de calibração em ambas as matrizes, nas concentrações de 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 ng/g de tecido, para quantificação das amostras de pulmão, e 0,1; 1; 25; 50; 100; 150 e 250 ng/g, para amostras de fígado.

3.3.4 Pesagem dos órgãos

Após as últimas exposições, os animais foram anestesiados e eutanasiados, para coleta das amostras de fígado, baço, rim, tecido adiposo, pulmão e coração, para pesagem em balança semi-analítica, o que correspondeu à massa úmida dos órgãos. Após a pesagem, o fígado, baço, rim, pulmão e coração foram mantidos 24 horas em estufa a 60 °C e pesados novamente, obtendo-se assim a massa seca.

3.3.5 Análise da expressão de AhR por Western Blot

A expressão do receptor AhR foi quantificada em amostras de pulmão, fígado, rim, baço, gordura retroperitoneal e ilhotas pancreáticas isoladas (para isolamento de ilhotas pancreáticas, consultar o item 3.7.7.1), obtidos dos animais expostos ao veículo ou PCB126, pela técnica de Western Blot. O lisado de proteínas utilizado foi obtido a partir da coleta de amostras dos animais expostos por instilação ao veículo ou ao PCB, nas três doses utilizadas neste trabalho. Assim, após quantificação de proteínas no homogenato de tecido, por reagente de Bradford e preparo de amostra em tampão Lammelli, o lisado de proteínas foi submetido à eletroforese a 110 V por 2 horas e 30 minutos. A transferência foi realizada em membrana de nitrocelulose por 1 hora e 30 minutos a 110 V, em cuba de transferência. A confirmação da transferência foi realizada incubando-se a membrana com solução de Ponceau S. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS-Tween (TBS-T; *Tris-buffered saline*) 0,1% e bloqueada com leite 5%. O anticorpo primário monoclonal *mouse* anti-AhR (1:1.000) foi incubado a 4 °C, *overnight*. No dia seguinte, a membrana foi lavada novamente com TBS-T e incubada com anticorpo *goat* anti-*mouse* (1:30.000), por 45 minutos. A revelação foi realizada através da metodologia de eletroquimioluminescência (ECL) utilizando-se o luminol como substrato e a enzima peroxidase (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Os resultados foram analisados por densitometria óptica (Scion Image Software, Torrance, CA, EUA). A expressão

de β -actina foi utilizada como controle de quantidade protéica. Todos os anticorpos utilizados foram adquiridos da Abcam (Cambridge, MA, EUA).

3.4 Caracterização dos parâmetros hematológicos

3.4.1 Determinação do leucograma

Após as últimas exposições, os animais foram anestesiados e foi realizada a coleta do sangue circulante da artéria aorta abdominal, com auxílio de seringas de plástico contendo o anticoagulante heparina (5000 UI/mL; Hepamax-S[®], Blausiegel, Cotia, SP), para determinação da leucometria. A leitura total de células foi realizada em hemocitômetro (Herka, Berlin, Alemanha), após a diluição das amostras de sangue na proporção de 1:20 (vol:vol) com líquido de Türk. A leitura diferencial foi realizada em esfregaços de sangue corados com corante rápido Panótico[®] (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil), que se baseia no princípio de coloração hematológica estabelecida por Romanowsky (HROBIN, 2011).

3.4.2 Determinação dos parâmetros hematimétricos

O sangue total coletado com anticoagulante foi utilizado para quantificação dos parâmetros hematimétricos, tais como, hemoglobina, hematócrito e o número total de hemácias, utilizando um analisador hematológico automático de uso veterinário, o equipamento ABCVet (Horiba ABX, Irvine, CA, EUA).

3.4.3 Determinação do número de células na medula óssea

Após as últimas exposições, os animais foram anestesiados e a coleta do perfusato medular foi realizada. As células totais da medula óssea foram obtidas por meio de lavagem da cavidade femoral com 4 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Vitrocell, Campinas, São Paulo, Brasil). A suspensão celular foi centrifugada a 4 °C, 600 g por 10 minutos, e em seguida ressuspensas em 1 mL de meio de cultura. A leitura total de células foi realizada em hemocitômetro, após diluição 1:20 (vol:vol) com líquido de Türk. Para a caracterização do tipo celular encontrado, foram realizados esfregaços corados com solução de May-Grunwald e Giemsa e 300 células por amostra/animal foram analisadas.

3.5 Caracterização dos parâmetros metabólicos

3.5.1 Determinação do perfil lipídico

Após as últimas exposições, os animais foram anestesiados e foi realizada a coleta do sangue circulante proveniente da artéria abdominal, coletado com auxílio de uma seringa de plástico sem anticoagulante. Em seguida, o soro foi isolado por centrifugação (10 minutos, 3500 rpm) e armazenado a -80 °C para as determinações a seguir:

3.5.1.1 Determinação do colesterol sérico, triglicerídeos e HDL colesterol

O colesterol total, triglicerídeo sérico e o HDL (lipoproteína de alta densidade) colesterol foram determinados por método enzimático utilizando kits comerciais, de acordo com o fabricante (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) e quantificados em analisador bioquímico automatizado (Labmax240[®], Labtest Diagnóstica S.A.).

3.5.1.2 Cálculo da concentração sérica de VLDL colesterol

A partir das concentrações séricas de triglicérides, foi calculada a concentração de VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) colesterol, utilizando o seguinte cálculo (Labtest Diagnóstica S.A.):

$$\text{VLDL colesterol (mg/dL)} = \frac{\text{triglicerídeos (mg/dL)}}{5}$$

3.5.1.3 Cálculo da concentração sérica de LDL colesterol

A partir das concentrações séricas de HDL colesterol e VLDL, descritos anteriormente, foi possível calcular as concentrações de LDL (lipoproteína de baixa densidade) colesterol, utilizando o seguinte cálculo (Labtest Diagnóstica S.A.):

$$\text{LDL colesterol (mg/dL)} = \text{colesterol total} - (\text{HDL colesterol} + \text{VLDL colesterol})$$

3.5.2 Determinação do perfil bioquímico e atividade enzimática do fígado

A determinação dos níveis de creatinina, uréia, gama GT, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e proteínas totais foram realizadas no soro coletado dos animais expostos, por método enzimático, utilizando kits comerciais, de acordo com a metodologia fornecida pelo fabricante (Labtest Diagnóstica S.A.) e quantificados em analisador bioquímico automatizado (Labmax240[®], Labtest Diagnóstica S.A.).

3.6 Caracterização dos parâmetros inflamatórios

3.6.1 Isolamento de neutrófilos circulantes

A amostra de sangue circulante coletada com anticoagulante foi utilizada para o isolamento de neutrófilos. Para tanto, 3 mL de sangue total foi adicionado a 3 mL de Histopaque® 1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e centrifugado a 400 g durante 30 minutos. Após o período de centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet sofreu lise hipotônica dos eritrócitos restantes com solução de cloreto de sódio (0,2% e 1,6%). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (600 g, 10 minutos, 4 °C) e o sobrenadante descartado.

Os neutrófilos isolados do sangue circulante foram utilizados para: I) avaliação da expressão de TLR4; II) avaliação da expressão de FPR-1; III) quantificação do cálcio intracelular; IV) *burst* oxidativo, ensaios estes realizados em citômetro de fluxo (ver item 3.6.3), ou ainda para V) ensaios de quimiotaxia (item 3.6.4).

3.6.2 Recrutamento de neutrófilos e tratamento *in vitro* com PCB126

Animais não expostos ao veículo ou PCB126 foram utilizados para recrutamento de neutrófilos induzido por injeção de glicogênio de ostra 1% no peritônio dos animais (MACEDO, 2006). Após 4 horas de indução, os animais foram eutanasiados e os neutrófilos foram coletados para determinação da viabilidade celular, expressão de moléculas de membrana celular, para indução do *burst* oxidativo e quimiotaxia (ver itens 3.6.3.1 e 3.6.5). Os neutrófilos recrutados foram tratados *in vitro* com PCB126 nas concentrações de 0,1; 1, 100 ou 10.000 nM ou veículo (DMSO 0,3%), por 1 hora a 37 °C, e incubados ou não com os estímulos inflamatórios adequados.

3.6.3 Citometria de fluxo

Após coleta do sangue circulante com a presença de anticoagulante para determinação da leucometria, os leucócitos totais foram aproveitados para realização de ensaios utilizando citômetro de fluxo. Para tanto, foi realizada a lise osmótica dos eritrócitos em meio hipotônico com solução de cloreto de sódio (0,2% e 1,6%), em seguida, as amostras foram centrifugadas (600 g, 10 minutos, 4°C) e o sobrenadante descartado. Após lavagem com solução fosfato salina (PBS: NaCl 154 mmol/L; NaHPO₄ 1,9 mmol/L; Na₂HPO₄ 8,1 mmol/L; pH 7,4), 1 x 10⁶ leucócitos totais

foram estimulados com o estímulo inflamatório adequado e, em seguida, incubados com os anticorpos específicos para determinação da viabilidade celular ou expressão de moléculas de adesão celular (ver itens 3.6.3.1 e 3.6.3.2).

Após os períodos de incubação, os leucócitos totais, os neutrófilos circulantes isolados, ou ainda, os neutrófilos recrutados e tratados *in vitro* com PCB126 foram analisados em citômetro de fluxo (Becton & Dickinson, San Jose, CA, EUA, FACSCanto II). Aproximadamente 10.000 células foram obtidas e somente células morfológicamente viáveis foram consideradas aptas para a análise, que foi realizada utilizando o software FlowJo 8.7.1 (Treestar, Ashland, OR, EUA). As subpopulações celulares nas amostras de sangue total, de polimorfonucleares (PMN), que incluem os neutrófilos e eosinófilos, e de células mononucleares periféricas do sangue (PBMC), que compreendem os linfócitos e monócitos, foram reconhecidos por meio das propriedades FCS (*forward scatter*) e SSC (*side scatter*) do citômetro de fluxo, que avaliam o tamanho celular e a complexidade interna das mesmas, respectivamente.

3.6.3.1 Avaliação da viabilidade celular

Após incubação com o estímulo inflamatório fMLP (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina, Sigma-Aldrich) a 10^{-7} mol/L (DE LIMA *et al.*, 2012) ou solução PBS (basal), por 1 hora, a 37 °C, a suspensão de leucócitos totais obtida de animais expostos *in vivo* ao PCB126, ou os neutrófilos recrutados e tratados *in vitro* com o poluente, foram novamente centrifugados e ressuspensos em solução PBS para incubação com os anticorpos monoclonais anti-anexina V (1:100) conjugado com proteína piridina clorofila (PerCP), para avaliar a apoptose, e iodeto de propídeo (PI; 50 µg/mL), para avaliação da necrose, por 20 minutos, a 4 °C, na ausência de luz, seguido de análise em citômetro de fluxo. A anexina V apresenta a capacidade de ligação a fosfatidilserinas, de maneira irreversível e cálcio-dependente, que são externalizadas no processo de morte celular programada, ou seja, no processo inicial da apoptose, antes que a integridade da membrana celular seja comprometida (MELINO *et al.*, 2005). O iodeto de propídeo é um corante impermeável à membrana celular íntegra, que tem afinidade por estruturas intracelulares. Uma vez que, a necrose é caracterizada por rompimento da membrana celular e liberação do conteúdo intracelular, este marcador é amplamente utilizado (ELMORE, 2007). Os anticorpos monoclonais foram adquiridos da BD Biosciences (San Jose, CA, EUA).

3.6.3.2 Avaliação da expressão de moléculas de adesão

Após incubação com o estímulo inflamatório fMLP a 10^{-7} mol/L ou solução PBS (basal) por 1 hora a 37°C, a suspensão de leucócitos totais foi novamente centrifugada e ressuspensa em solução PBS para incubação com os anticorpos monoclonais anti-L-selectina (anti-CD62L; 1:100) e anti- β_2 -integrina (anti-CD18; 1:100) conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ou anti-PECAM-1 (anti-CD31; 1:100) conjugado com ficoeritrina (PE), por 20 minutos a 4 °C, na ausência de luz, e analisados em seguida em citômetro de fluxo. Os anticorpos monoclonais foram adquiridos da BD Biosciences.

3.6.3.3 Avaliação da expressão de FPR-1

Após incubação com o estímulo inflamatório fMLP a 10^{-7} mol/L ou solução PBS (basal) por 1 hora, a 37 °C, os neutrófilos isolados do sangue circulante de animais expostos *in vivo* ou os neutrófilos recrutados e tratados *in vitro* com PCB126 foram novamente centrifugados e ressuspensos em solução PBS para incubação com o anticorpo anti-FPR-1-FITC (1:100; Biorbyt Ltd.; Cowley Road, Cambridge, Reino Unido), por 20 minutos a 4 °C, na ausência de luz, e analisados em seguida em citômetro de fluxo.

3.6.3.4 Avaliação da expressão de TLR4

Após incubação com o estímulo inflamatório LPS 5 μ g/mL ou solução PBS (basal) por 30 minutos, a 37 °C, os neutrófilos isolados do sangue circulante de animais expostos *in vivo* ou os neutrófilos recrutados e tratados *in vitro* com PCB126 foram novamente centrifugados e ressuspensos em solução PBS para incubação com o anticorpo anti-TLR4-PE (1:50; BD Biosciences) por 20 minutos, a 4 °C, na ausência de luz, e analisados em seguida em citômetro de fluxo.

3.6.3.5 Quantificação do *burst* oxidativo

Com o objetivo de mensurar a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) em leucócitos circulantes, foi utilizado o 2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH₂-DA), um composto que ao ser oxidado por EROs intracelulares gera o DCF, um composto altamente fluorescente que pode ser detectado por citômetro de fluxo (CHEN et al., 2010).

A reação para identificação da produção de EROs intracelular baseia-se na conversão de 2',7'- diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH₂-DA) para 2',7'- diclorofluoresceína (DCF), ocorrendo da seguinte maneira: a forma diacetato do DCFH₂-DA-AM é absorvida pelas células, onde as esterases não específicas vão quebrá-los em grupos lipofílicos, resultando em um composto diferente do inicial que permanece no interior da célula. A oxidação de DCFH pelos EROs converte a molécula inicial para DCF que é um composto altamente fluorescente. A nova molécula apresenta os comprimentos de onda excitação = 485 nm e emissão = 528 nm.

Após isolamento, os neutrófilos do sangue circulante de animais expostos *in vivo*, ou os neutrófilos recrutados e tratados *in vitro* com PCB126, foram incubados *in vitro* com DCFH-DA (340 µmol/L), por 30 minutos, a 37 °C (RIBEIRO *et al.*, 2011). Após incubação, solução de EDTA (3 mmol/L; 2 mL) foi adicionada para interromper a reação. Em seguida, a suspensão de células foi incubada com solução salina balanceada de Hanks (HBSS: CaCl₂ 1,29 mmol/L; NaCl 136,9 mmol/L; KCl 5,36 mmol/L; MgSO₄ 0,65 mmol/L; Na₂HPO₄ 0,27 mmol/L; KH₂PO₄ 1,1 mmol/L; D-glicose 2 mmol/L) ou estímulos, que consistiu em solução de fMLP (10⁻⁷ mol/L, 10 minutos, 37 °C) ou *phorbol*-12-myristate-13-acetate (PMA; 100 ng/mL, 15 minutos, 37 °C) ou lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS; 5 µg/mL, 10 minutos, 37 °C), seguido de análise em citômetro de fluxo.

3.6.4 Quimiotaxia

A quimiotaxia *in vitro* foi realizada utilizando o modelo de câmara de Boyden modificado (SHIMADA *et al.*, 2012). Para tanto, 1 x 10⁵ neutrófilos circulantes isolados do sangue circulante de animais expostos *in vivo*, ou os neutrófilos recrutados e tratados *in vitro* com PCB126, foram acondicionados ao compartimento superior da câmara Neuroprobe ChemoTx®-111-8™ 96-well plate, separadas do compartimento inferior por membranas de policarbonato com poros de 8 µm e 3,2 mm de diâmetro (Neuroprobe, Leamington Spa, Reino Unido). A migração dos neutrófilos foi induzida preenchendo o compartimento inferior com 300 µL de fMLP 10⁻⁷ mol/L ou meio de cultura. A seguir, a câmara foi incubada em estufa a 37 °C e com 5% de CO₂ por 2 horas e os neutrófilos migrados foram avaliados em hemocítmetro, após diluição em líquido de Türk.

3.6.5 Análise da interação leucócito-endotélio por microscopia intravital

Os animais foram anestesiados após as últimas exposições e o mesentério, o pâncreas e o fígado foram expostos, sequencialmente, para análise da interação leucócito-endotélio, utilizando a metodologia de microscopia intravital. Para tanto, cada órgão foi posicionado sobre uma placa de acrílico com temperatura controlada, havendo-se o cuidado de evitar qualquer comprometimento do fluxo sanguíneo. O órgão foi mantido úmido durante todo o experimento pela irrigação com a solução de Ringer modificado (pH = 7,2-7,4; NaCl 154 mmol/L; KCl 5,6 mmol/L; CaCl₂.2.H₂O 2 mmol/L; NaHCO₃ 6 mmol/L e glicose 5 mmol/L).

As imagens foram obtidas em microscópio óptico (Axioplan II, Carl-Zeiss equipado com objetivas 5,0/0,30x Plan-neofluar ou 10,0/0,25x Achroplan (distância/abertura numérica) e com 1,0x; 1,25x ou 1,60x sistema adicional de ampliação de imagem (optovar). As imagens foram capturadas em câmera de vídeo (ZVS, 3C75DE, Carl-Zeiss) e transmitidas simultaneamente ao computador. Os aumentos proporcionados pelas objetivas do microscópio, pelo optovar e pela câmera de projeção de imagem conferem ampliação e nitidez suficientes para as análises quantitativas no monitor do computador. Com as imagens obtidas foram observados e quantificados os efeitos da exposição ao poluente sobre a interação leucócito-endotélio na microcirculação.

Para tanto, foram quantificados os leucócitos rolando e aderidos em vênulas pós-capilares (20-30 µm de diâmetro) do mesentério e pâncreas dos animais e leucócitos aderidos em sinusóides do fígado dos animais. Leucócitos migrados foram contados em área perivascular do mesentério. As quantificações foram realizadas em condições basais e/ou após estímulo inflamatório com fMLP 10⁻⁷ mol/L, em intervalos de 1, 2, 4, 5 ou 10 minutos. Os leucócitos em movimento na periferia do fluxo sanguíneo, em contato com o endotélio, foram considerados em comportamento de rolamento. Essas células foram observadas individualmente e contadas a partir de sua passagem por um ponto fixo selecionado na vênula, durante o período de 5 minutos. Foram considerados leucócitos aderidos aqueles que permaneceram por pelo menos 30 segundos fixos à parede vascular, em uma extensão de 100 µm de vaso sanguíneo (DAHLEN *et al.*, 1981; FARSKY *et al.*, 1999; 2004). A migração leucocitária foi avaliada em área de 2.500 µm². Adicionalmente, foi medido o diâmetro das vênulas.

3.6.6 Avaliação da expressão de moléculas de adesão solúveis

A concentração das moléculas de adesão solúveis *vascular cell adhesion molecule-1* (sVCAM-1), *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (sPECAM-1) e *intercellular adhesion molecule-1* (sICAM-1) foi determinada no soro, obtido após coleta do sangue circulante sem anticoagulante, dos animais expostos ao PCB126 ou veículo, e quantificadas por reação imunoenzimática (ELISA), utilizando kits comerciais adquiridos da empresa MyBioSource (San Diego, CA, EUA).

3.6.7 Determinação de mediadores inflamatórios

3.6.7.1 Determinação da concentração de citocinas pró-inflamatórias

A concentração de interleucina (IL)-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) foi determinada no soro ou no homogenato de fígado, pulmão, pâncreas e, gordura retroperitoneal obtidos dos animais expostos ao PCB126 ou veículo, por reação imunoenzimática (ELISA), utilizando kits comerciais provenientes das empresas BD Biosciences ou R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA).

3.6.7.2 Determinação indireta da produção de NO

A concentração de nitrito, NO₂⁻, foi determinada no homogenato de fígado e pulmão utilizando a reação de Griess (TSIKAS, 2005). Adicionalmente, o sobrenadante de cultura de ilhotas de Langerhans, que foram coletadas conforme descrito no item à frente 3.7.7.1, foi também utilizado para determinação da concentração de NO₂⁻. Em resumo, 100 μ L dos sobrenadantes foram adicionados a 100 μ L do reagente de Griess (1% de sulfanilamida com 0,1% de α -naftil etilenodiamina; Sigma-Aldrich). Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, a absorbância de cada amostra é determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550 nm. A concentração de NO₂⁻ das amostras é determinada a partir de uma curva padrão de NaNO₂.

3.6.8 Proliferação de células do baço

Após as últimas exposições, os animais foram eutanasiados e o baço foi coletado de forma asséptica e acondicionado em meio RPMI-1640. O baço coletado foi macerado com auxílio do *cell strainer*, e após lise com solução ACK (0,15 mol/L NH₄Cl; 10 mmol/L KHCO₃; 0,1 mmol/L EDTA), foi preparada uma suspensão contendo 1 x 10⁶ células/mL. Para quantificação diferencial do tipo celular, foram

preparadas lâminas com auxílio de centrífuga citológica (Cytospin, Thermo Scientific). Adicionalmente, 100 µL da suspensão celular foram adicionados aos poços em placa de cultura, que foi mantida em estufa a 37 °C e 5% CO₂, por 72 horas. As células foram estimuladas ou não com concanavalina A (ConA) ou lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS; Sorotipo 026:B6, Sigma-Aldrich) nas concentrações de 1 ou 5 µg/mL. Após 48 horas de incubação, 25 µL de resazurina 0,01% (preparada em meio RPMI-1640 + 10% soro fetal bovino; SFB) foram adicionados em todos os poços (AHMED *et al.*, 1994). A resazurina é um composto de cor azul, não tóxico, permeável e não fluorescente que utiliza as reações de redução provenientes de células metabolicamente ativas para converter a resazurina em uma molécula vermelha fluorescente chamada resofurina (O'BRIEN *et al.*, 2000). A quantidade de fluorescência e também a variação na coloração produzida durante o ensaio é proporcional ao número de células vivas. Entre 18 e 24 horas após a adição da resazurina, a densidade óptica (D.O.) de cada poço foi medida a 570 e 600 nm e a proliferação foi avaliada pela subtração dos valores obtidos entre a D.O. das leituras de 570 e 600 nm (AHMED *et al.*, 1994).

3.7 Caracterização do diabetes mellitus

3.7.1 Determinação da concentração sérica de glicose

Após as últimas exposições, a determinação da glicemia basal foi realizada por quantificação em glicosímetro (Accu-Chek Active Kit Roche, Hoffmann-La Roche Ltd., Basel Switzerland), utilizando para isso uma gota de sangue caudal.

Adicionalmente, um grupo de animais foi exposto ao veículo ou ao PCB126 na dose de 10 µg/kg por 45 dias, sendo monitorados durante todo o período de exposição, tendo a glicemia quantificada em intervalos de dois dias.

3.7.2 Determinação da concentração de insulina e leptina

Após as últimas exposições, a determinação das concentrações de insulina e leptina foram realizadas no soro ou no sobrenadante de cultura de ilhotas, obtidos dos animais expostos, por reação imunoenzimática (ELISA), utilizando kits comerciais (Millipore, Billerica, MA, EUA). Neste método, o limite de detecção de insulina é 0,2 ng/mL e de leptina é de 0,04 ng/mL.

3.7.3 Teste de tolerância à glicose endovenosa (EVGTT)

Após as últimas exposições, os animais utilizados para este ensaio foram mantidos em privação alimentar por 5 horas, e anestesiados com pentobarbital de sódio (40 mg/kg de massa corporal) por via i.p., para coleta de uma gota de sangue caudal, que correspondeu à glicemia basal (T₀). Em seguida, uma dose única de uma solução de glicose a 375 mg/mL foi administrada (0,2 mL/100 g de massa corporal) por via endovenosa, pela veia peniana, sendo então coletadas as amostras de sangue caudal nos tempos 5, 10, 20, 30 e 60 minutos, após injeção da solução de glicose. A glicemia foi determinada por glicosímetro e tiras reagentes (Roche®).

3.7.4 Teste de tolerância à insulina endovenosa (EVITT)

Após as últimas exposições, os animais utilizados neste experimento foram submetidos à restrição alimentar por 5 horas e anestesiados com pentobarbital de sódio (40 mg/kg de massa corporal), por via i.p. Após anestesia, foi realizada a coleta de uma gota de sangue caudal e determinada a glicemia basal (T₀), por fita e glicosímetro (Accu-Chek Active Kit Roche). Após a dosagem inicial foi administrada uma dose única de insulina regular (Humulin®, Lilly, Delaware St, IN, EUA), 0,75 U/kg de massa corporal, pela veia peniana. Posteriormente foram realizadas as dosagens de glicemia nos tempos 4, 8, 12 e 16 minutos após a injeção de insulina. A constante de decaimento da glicose (KITT) é calculada a partir da regressão linear do logaritmo neperiano dos valores de glicemia obtidos no teste (LUCENA *et al.*, 2015).

3.7.5 Análise da expressão de GLUT4 em tecidos insulino-dependentes

A expressão do transportador de glicose GLUT4 foi quantificada em amostras de tecido adiposo e músculo gastrocnêmico obtidos dos animais expostos ao veículo ou PCB126, pela técnica de Western Blot, conforme descrito anteriormente no item 3.3.5. O anticorpo primário monoclonal *rat* anti-GLUT4 (1:1.000) foi incubado a 4 °C, *overnight*. No dia seguinte, a membrana foi lavada novamente com TBS-T, e incubada com anticorpo *goat* anti-*rabbit* (1:20.000), por 45 minutos. Todos os anticorpos utilizados foram adquiridos da marca Abcam.

3.7.6 Análise morfológica das ilhotas de Langerhans

Após as últimas exposições, os animais utilizados neste ensaio foram eutanasiados e o pâncreas, depois de coletado, foi fixado em solução de formol 10%, por 24 horas, e processado rotineiramente para a inclusão de parafina. Após a realização de cortes histológicos em micrótomo, na espessura de 10 μm , os mesmos foram corados pela técnica da hematoxilina-eosina (HE) e fotomicrografados no microscópio Axiovert 100M (Carl Zeiss SMT, Alemanha). As imagens obtidas foram analisadas em AxioVision Release 4.8, Zeiss Inc., Alemanha. A análise morfométrica foi realizada nas ilhotas de Langerhans, medindo-se a área (μm^2).

3.7.7 Análise funcional das ilhotas de Langerhans

3.7.7.1 Isolamento de ilhotas de Langerhans

As ilhotas de Langerhans foram isoladas seguindo método previamente descrito por Li *et al.* (2009), com pequenas modificações. Em resumo, o ducto biliar comum dos animais foi dissecado e uma cânula de polietileno (PE/3, diâmetro interno 0,58mm e diâmetro externo 0,99 mm; Scientific Commodities Inc., Lake Havasu City, AZ, EUA) foi introduzida cerca de 1 cm em seu interior. Em seguida, a ampola foi ocluída com fio de sutura e o ducto comum foi perfundido com solução HBSS a pH 7,4, contendo colagenase V (0,7 mg/mL; Sigma-Aldrich), para distensão do pâncreas. O pâncreas foi removido e incubado em solução de HBSS contendo colagenase V, a 37 °C, durante 25 minutos. Após a digestão, as ilhotas pancreáticas foram purificadas utilizando gradiente de Histopaque[®] 1077, seguida por separação por pipetagem manual.

3.7.7.2 Avaliação da viabilidade celular, ciclo celular e fragmentação do DNA das ilhotas pancreáticas isoladas

As ilhotas isoladas foram lisadas com auxílio de tripsina 0,12%, por 5 minutos, sob agitação, liberando assim, as células componentes, que foram utilizadas para análise da viabilidade celular, ciclo celular e fragmentação do DNA.

A técnica da viabilidade celular já foi descrita no item 3.6.3.1. O ciclo celular e a fragmentação do DNA foram realizados adicionando às ilhotas isoladas (aproximadamente 40 ilhotas/animal), 50 μL de uma solução contendo a enzima RNase A (15 mg/mL) e 150 μL do tampão hipotônico fluorescente (solução PBS com SFB 2%; Triton-X 100 0,05%; citrato de sódio 0,1%; e iodeto de propídeo 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

(LUCENA *et al.*, 2015). Em seguida, as células foram analisadas em citômetro de fluxo.

3.7.7.3 Geração de espécies reativas de oxigênio e ânion superóxido por ilhotas pancreáticas isoladas

As ilhotas isoladas foram imediatamente utilizadas para avaliação da geração de EROs, ânion superóxido e peroxinitrito, onde foram incubadas com sondas específicas e observados por microscópio de fluorescência (Axiovert 100M). Posteriormente, as imagens obtidas foram analisadas por densitometria óptica (AxioVision Release 4.8) e expressas como unidades arbitrárias (u.a.).

Para quantificação dos níveis totais de produção de EROs, aproximadamente 10 ilhotas por grupo foram incubadas com solução HBSS contendo o marcador fluorescente DCFH-DA na dose de 30 µmol/L, por 30 minutos, a 37 °C, protegidas da exposição à luz (BATUMALAIE *et al.*, 2014). Utilizando filtro adequado (excitação: 504 nm; emissão: 529 nm), é possível observar a marcação fluorescente indicativa de estresse oxidativo (CHEN *et al.*, 2010).

A geração basal de ânion superóxido foi determinada após incubação de aproximadamente 10 ilhotas por grupo em solução HBSS contendo dihidroetidina (DHE, 10 µmol/L), durante 30 minutos, a 37 °C (WILHELM *et al.*, 2009). Na presença do ânion superóxido, o DHE é convertido no composto fluorescente brometo de etídio, o qual se intercala ao DNA da célula (WILHELM *et al.*, 2009), sendo possível a observação da marcação utilizando parâmetros adequados (excitação: 518 nm; emissão: 605 nm).

3.7.7.4 Geração de NO₂⁻, IL-6 e insulina por ilhotas pancreáticas isoladas

Após isolamento, aproximadamente 40 ilhotas foram incubadas em placas 96 poços e meio de cultura RPMI sem glicose acrescido de SFB 10% (meio RPMI) ou meio de cultura RPMI sem glicose acrescido de SFB 10% e de glicose 16,7 mmol/L (meio hiperglicêmico), por 24 horas, em estufa, a 37 °C e 5% de CO₂. Após o período de incubação, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C para posterior quantificação de mediadores, tais como: insulina, NO e IL-6; utilizando metodologia imunoenzimática (ELISA) ou reação de Griess, descritas anteriormente (ver itens 3.6.7.1 e 3.6.7.2).

3.8 Análise estatística

Os resultados obtidos estão apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e foram analisados estatisticamente pelo Teste t de Student, quando somente dois grupos foram comparados, ou pela Análise de Variância de 1-via ou de 2-vias com comparações múltiplas (ANOVA), seguida do teste de Tukey-Kramer ou Bonferroni, quando necessário. Para tanto, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.0.

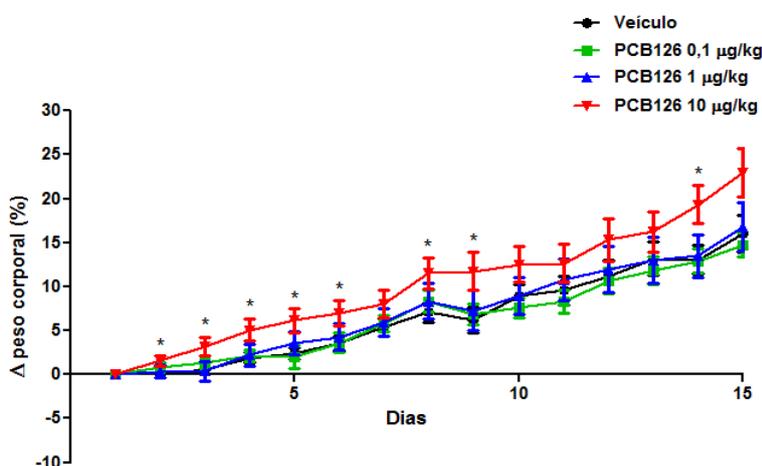
4 Resultados

4.1 Caracterização da exposição

4.1.1 Peso dos animais

Previamente a cada exposição, os animais foram anestesiados e pesados para posterior realização da instilação intranasal com o seu respectivo tratamento, veículo ou PCB126 (0,1; 1 ou 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Os dados encontrados mostram que os animais expostos ao PCB126 nas doses de 0,1 ou 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ não sofreram alteração no ganho da massa corporal no decorrer dos 15 dias de tratamento. Por outro lado, os animais que receberam a dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de PCB126 apresentaram aumento da massa corpórea em relação aos animais que receberam veículo (Figura 5A), que pode ser confirmada pela análise estatística, onde foi utilizado o cálculo da área sob a curva (AUC; Figura 5B).

A)



B)

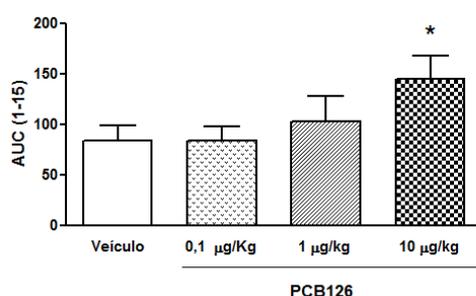


Figura 5: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a variação de massa corpórea de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 nas doses de 0,1; 1 ou 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). A variação da massa corpórea dos animais foi medida durante o período do protocolo experimental, em que os animais foram anestesiados com solução cetamina:xilazina (88 e 8 mg/kg) todos os dias, antes de cada exposição, pesados e, o respectivo tratamento foi realizado. A) Porcentagem da variação da massa corpórea dos animais durante os 15 dias de exposição. B) Área sob a curva (AUC) da variação ponderal entre os dias 1 a 15. Os resultados expressam a média \pm e.p.m. da variação da massa corpórea obtidos de 22 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo pós-teste de Tukey (* $P < 0,05$ vs. veículo).

4.1.2 Consumo de ração

Os animais foram monitorados, quanto ao consumo de ração, *ad libitum*, de forma que a mesma foi pesada todos os dias, antes de cada exposição dos animais ao veículo ou PCB126. A exposição ao PCB126, nas três doses analisadas, 0,1; 1 ou 10 µg/kg não alterou o padrão de consumo de ração dos animais no decorrer dos 15 dias de tratamento (Figura 6A), não havendo alteração no consumo diário e no consumo total de ração (Tabela 1), confirmada pela análise estatística, realizada de acordo com a avaliação da área sob a curva (Figura 6B).

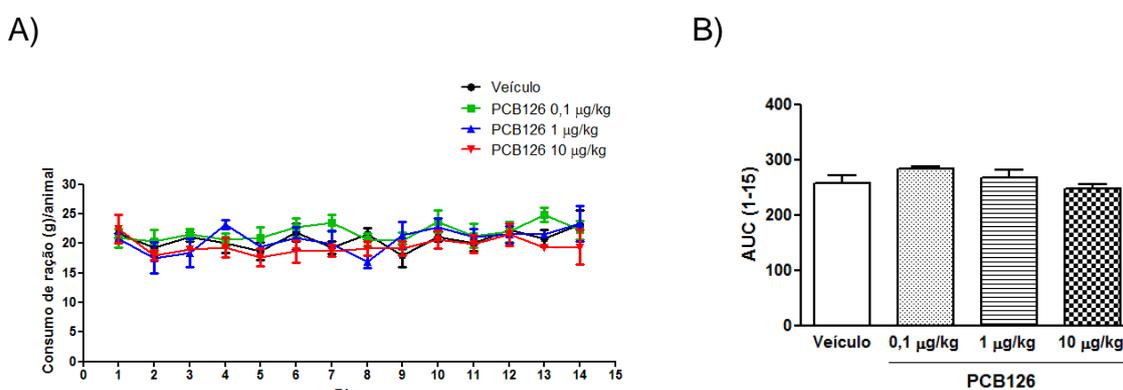


Figura 6: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre o consumo diário de ração por ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 nas doses de 0,1; 1 ou 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Para determinação do consumo diário de ração, os animais tiveram acesso liberado ao alimento e a ração foi quantificada e monitorada diariamente. A) Acompanhamento do consumo de ração (em gramas de ração – g – por animal) durante os 15 dias de exposição; B) Área sob a curva (AUC) da variação entre os dias 1 a 15. Os resultados expressam a média ± e.p.m. do consumo diário de ração por animal, obtidos em 3 experimentos independentes, com cinco animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo pós-teste de Tukey.

Tabela 1: Consumos de ração diário e total dos animais expostos ao PCB126 ou veículo. Os resultados expressam a média ± e.p.m. (em gramas; g) dos consumos de ração diários ou durante os 15 dias de exposição, obtidos em 3 experimentos independentes, com cinco animais em cada grupo.

Parâmetros/ Grupos	Veículo	PCB126		
		0,1 µg/kg	1 µg/kg	10 µg/kg
Consumo diário de ração (g)	21,21 ± 0,72	21,82 ± 0,30	20,62 ± 1,06	19,99 ± 0,17
Consumo total de ração (g)	296,9 ± 10,11	305,5 ± 4,23	288,8 ± 14,85	279,9 ± 2,38

4.1.3 Consumo de água

Os animais foram monitorados em relação ao consumo de água, diariamente, tendo a água livremente disponível, medida essa realizada todos os dias antes de cada exposição ao veículo ou PCB126. A quantidade ingerida foi determinada utilizando uma proveta. A exposição ao PCB126, na dose analisada, de 10 µg/kg não alterou o consumo de água dos animais no decorrer dos 15 dias de exposição, como pode ser visualizado na figura 7A, e confirmado pela análise estatística, após cálculo da área sob a curva (7B).

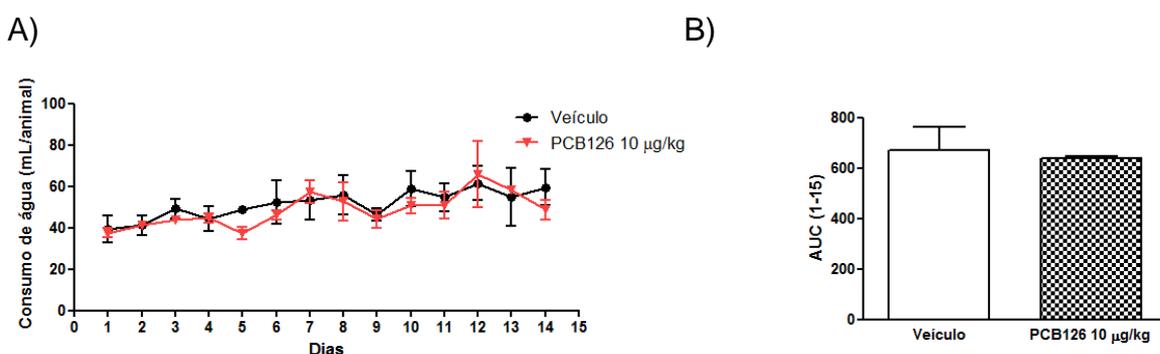


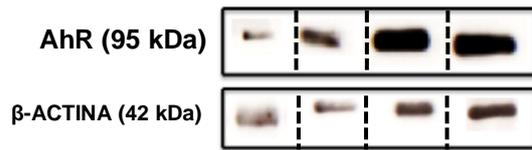
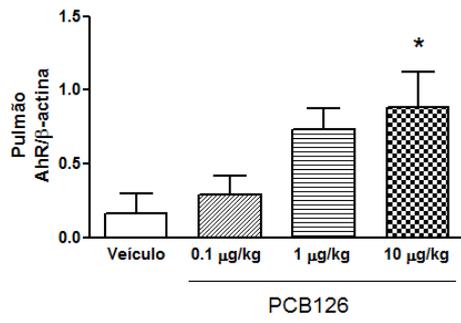
Figura 7: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre o consumo diário de água por ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Para determinação do consumo diário de água, os animais tiveram acesso liberado à água e esta foi quantificada e monitorada diariamente. A) Acompanhamento do consumo de água (mL/animal) durante os 15 dias de exposição; B) Área sob a curva (AUC) da variação entre os dias 1 a 15. Os resultados expressam a média ± e.p.m. do consumo diário de água por animal, obtidos em 3 experimentos independentes, com cinco animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com utilizando o Teste t de Student não pareado.

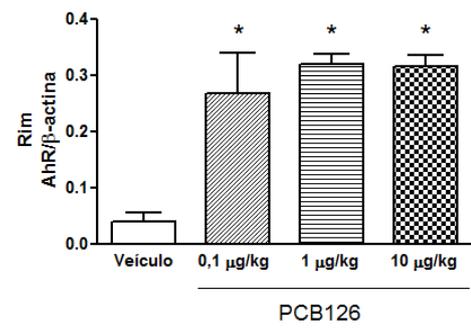
4.1.4 Expressão do receptor Aril hidrocarboneto (AhR)

Após a eutanásia dos animais, o pulmão (Figura 8A), rim (Figura 8B), fígado (Figura 8C), baço (Figura 8D), gordura retroperitoneal (Figura 8E) e ilhotas de Langerhans (Figura 8F) foram coletados para análise da expressão do receptor aril hidrocarboneto (AhR), por Western Blot. A exposição ao PCB126 por instilação intranasal, na dose de 10 µg/kg de massa corporal, aumentou a expressão do receptor AhR em todos os tecidos analisados, exceto no baço. As doses mais baixas de exposição foram capazes de aumentar a expressão deste receptor, em relação ao veículo, nas amostras de rim e fígado (Figura 8B e 8C).

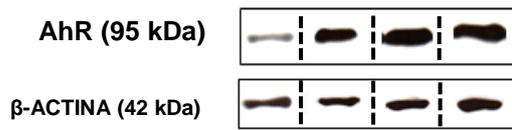
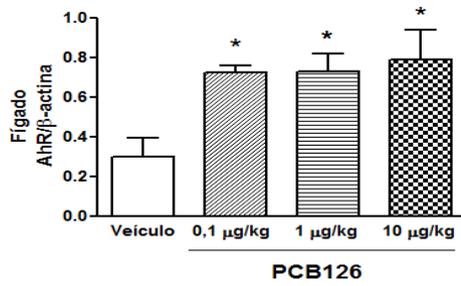
A)



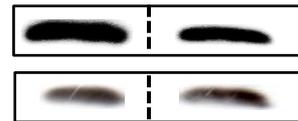
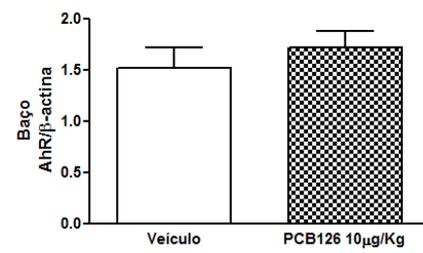
B)



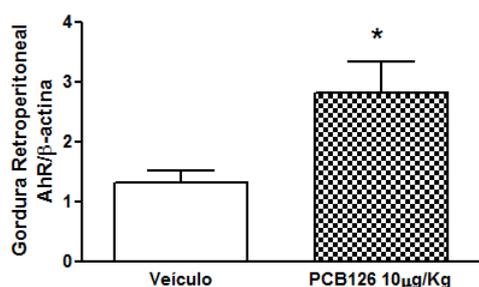
C)



D)



E)



F)

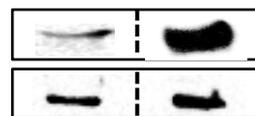
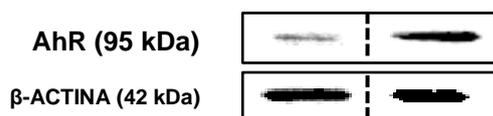
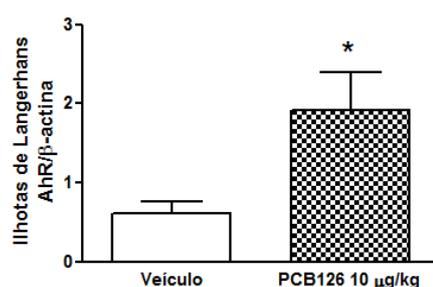


Figura 8: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a expressão do receptor aril hidrocarboneto em amostras de tecidos de ratos Wistar machos.

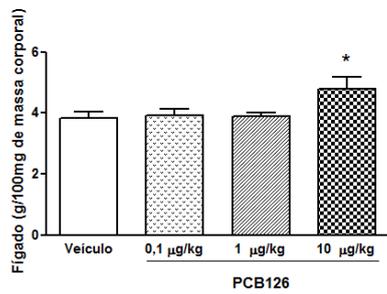
Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 nas doses de 0,1; 1 ou 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Após 5 horas das últimas exposições, os animais foram anestesiados e o pulmão (A), rim (B), fígado (C), baço (D), gordura retroperitoneal (E) e ilhotas de Langerhans (F) foram coletados para análise posterior da expressão do receptor AhR por Western Blot. Os resultados expressam a média \pm e.p.m. da expressão de AhR/ β -actina de tecidos obtidos de 6 animais em cada grupo ($n=6$). A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo pós-teste de Tukey ou pelo Teste t de Student não pareado quando comparado somente dois grupos (Veículo e PCB126 na dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$; * $P<0,05$ vs. veículo).

4.1.5 Massa dos órgãos

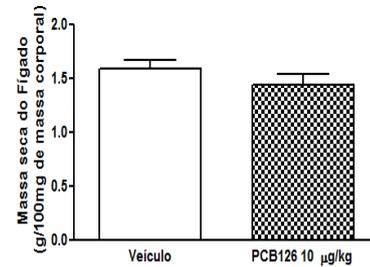
Após a eutanásia dos animais, o rim, baço, fêmur (dados não mostrados), fígado (Figura 9A e 9B), pulmão (Figura 9C e 9D), coração (Figura 9E e 9F), gorduras periepídidimal (Figura 9G) e retroperitoneal (Figura 9H) foram coletados para a pesagem em relação à massa corporal total do animal. Não houve alteração na massa úmida dos tecidos rim, baço, fêmur (dados não mostrados) e pulmão (Figura 9C). Por outro lado, houve aumento da massa úmida do fígado dos animais tratados com PCB126 na dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de massa corporal em relação ao fígado dos animais que receberam o veículo, pela mesma via (Figura 9A), e diminuição na massa úmida do coração (Figura 9E) nestes mesmos animais. Adicionalmente, verificou-se diminuição na massa das gorduras periepídidimal e retroperitoneal (Figura 9G e 9H). Após secagem em estufa a 60 $^{\circ}\text{C}$, não houve alteração na massa

do fígado (Figura 9B) e pulmão (Figura 9D). A massa do coração (Figura 9F) continuou reduzida nos animais expostos ao PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal.

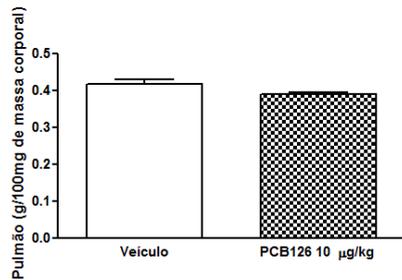
A)



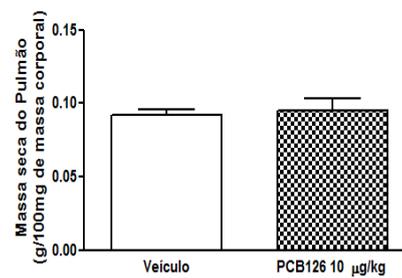
B)



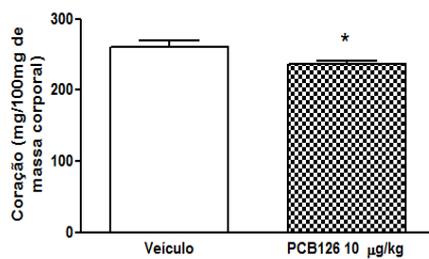
C)



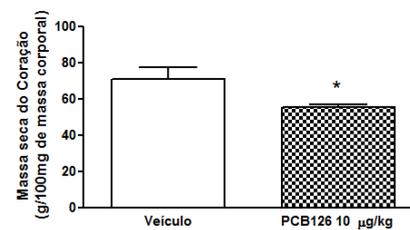
D)



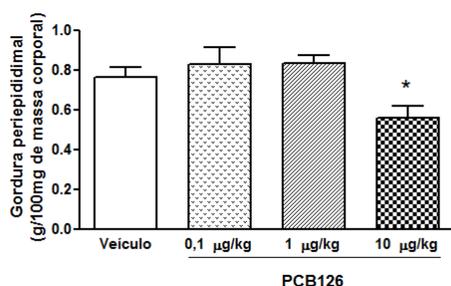
E)



F)



G)



H)

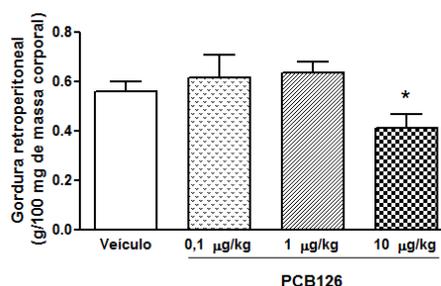


Figura 9: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a massa úmida e seca de tecidos de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 nas doses de 0,1; 1 ou 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Após 5 horas das últimas exposições, os animais foram anestesiados e eutanasiados. O fígado (A e B), pulmão (C e D), coração (E e F), gorduras periepididimal (G) e retroperitoneal (H) foram coletados e pesados em balança semi-analítica. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da massa de tecidos obtidos de 6 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo pós-teste de Tukey, ou pelo Teste t de Student não pareado, quando comparado somente dois grupos (Veículo e PCB126 na dose de 10 µg/kg; * $P < 0,05$ vs. veículo).

4.1.6 Perfil lipídico

Após as últimas exposições, os animais foram eutanasiados e o sangue circulante foi coletado para avaliação do perfil lipídico. Foram avaliados colesterol total (Figura 10A), triglicérides (Figura 10B) e frações do colesterol (Figura 10C-E). Os resultados mostraram que a exposição à dose de 10 µg/kg de PCB126 aumentou os valores da concentração de colesterol total no soro (Figura 10A), referente a um aumento da fração HDL (Figura 10C) e VLDL (Figura 10D). Não houve alteração na fração LDL do colesterol (Figura 10E). Adicionalmente, podemos perceber que a exposição à maior dose de PCB126 aumentou os valores de triglicérides no soro (Figura 10B).

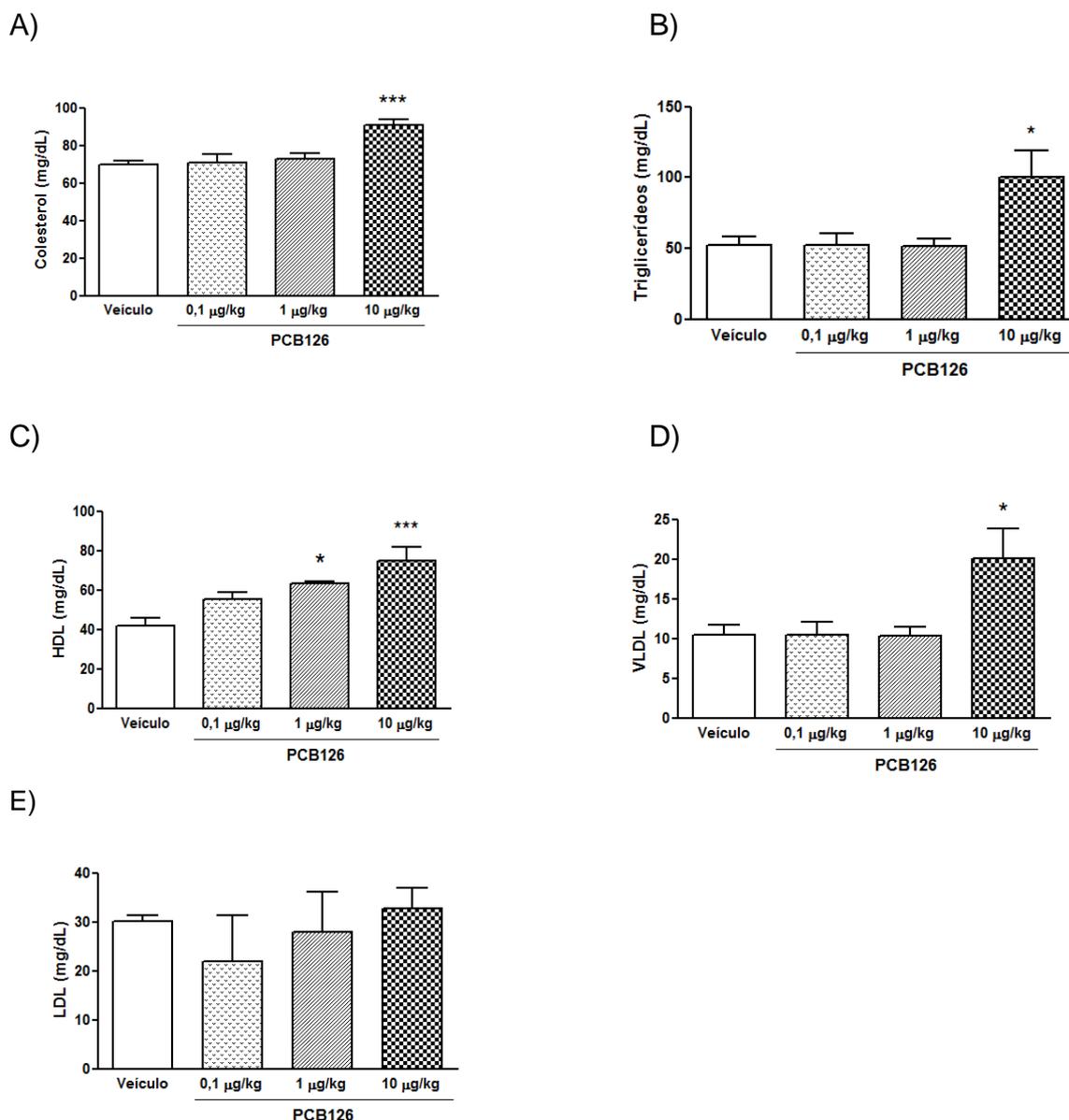
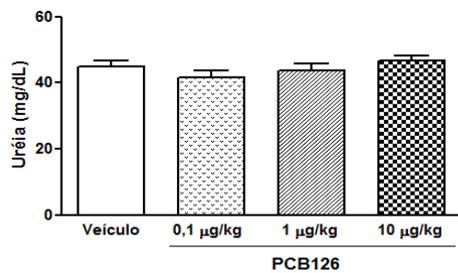


Figura 10: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre o perfil lipídico de ratos Wistar machos. Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 nas doses de 0,1; 1 ou 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Para determinação do perfil lipídico, após 5 horas das últimas exposições, os animais foram eutanasiados para coleta do soro. As análises foram realizadas em espectrofotômetro utilizando kits comerciais. Os resultados expressam a média ± e.p.m. obtidos de 10 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo pós-teste de Tukey (* $P < 0,05$ vs. veículo e *** $P < 0,001$ vs. veículo).

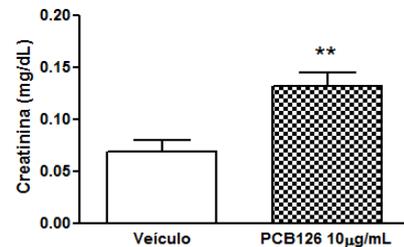
4.1.7 Perfil bioquímico e enzimático

Após as últimas exposições, os animais foram eutanasiados e o sangue circulante foi coletado para avaliação do perfil bioquímico e enzimático. Foram avaliados os valores dos marcadores de função renal, uréia (Figura 11A) e creatinina (Figura 11B). A exposição ao PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal aumentou os valores de creatinina no soro e de proteínas totais na urina, como podemos observar nas Figuras 11B e 11C, respectivamente. Adicionalmente, foram avaliadas as enzimas marcadoras de função hepática gamaGT (GGT; Figura 11D), aspartato (AST; Figura 11E) e alanina aminotransferases (ALT; Figura 11F). A maior dose utilizada neste trabalho não alterou valores de ALT e AST, mas aumentou os níveis de GGT no soro dos animais expostos ao PCB126 (Figura 11D).

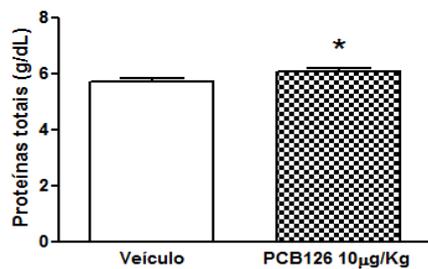
A)



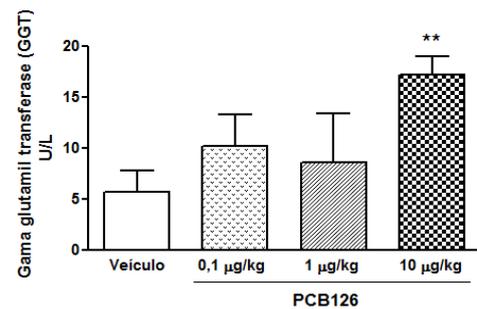
B)



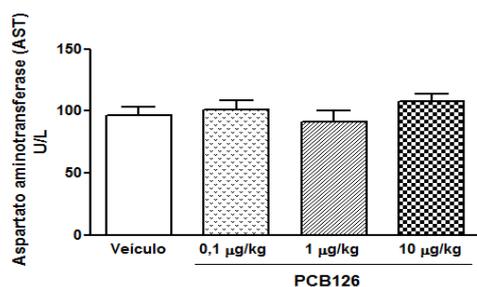
C)



D)



E)



F)

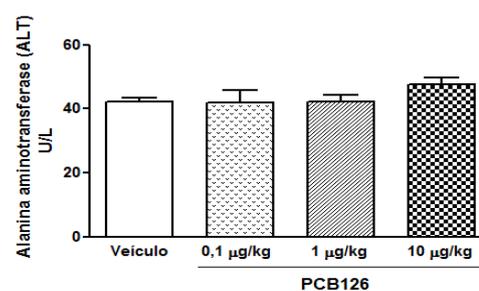


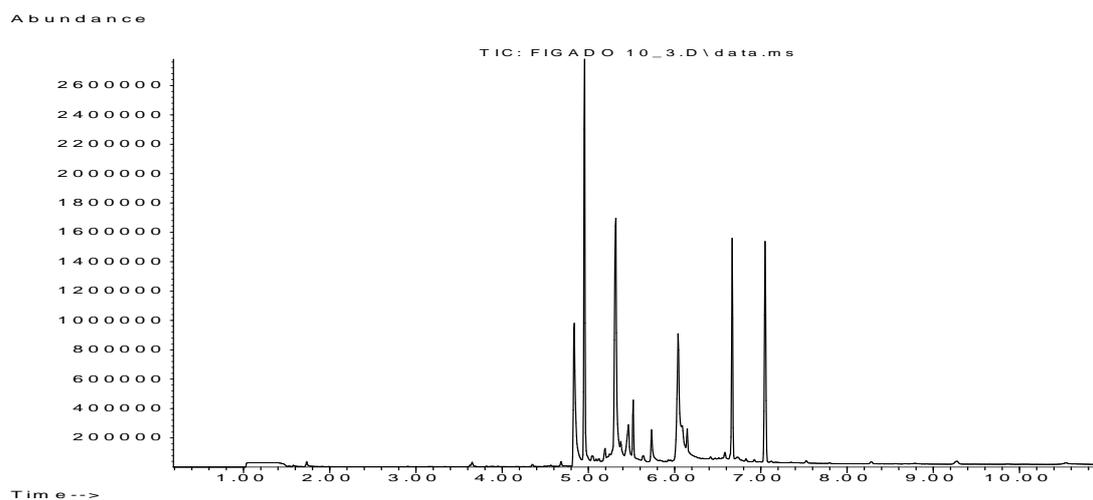
Figura 11: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre parâmetros bioquímicos e enzimas hepáticas de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 nas doses de 0,1; 1 ou 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Para determinação dos parâmetros bioquímicos e enzimas hepáticas, 5 horas após as últimas exposições, os animais foram eutanasiados para coleta do soro. As análises foram realizadas em espectrofotômetro utilizando kits comerciais. Os resultados expressam a média \pm e.p.m. obtidos de 10 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo pós-teste de Tukey ou pelo Teste t de Student não pareado quando comparado somente dois grupos (Veículo e PCB126 na dose de 10 µg/kg; * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ vs. veículo).

4.1.8 Quantificação de PCB126 em amostras biológicas

Utilizando metodologia CG-MS, primeiramente caracterizamos as moléculas de PCB126 e PCB52, adicionando os padrões em matrizes biológicas, como demonstrado no cromatograma de íons totais (TIC) na Figura 12A para o fígado e na Figura 12B para o pulmão.

A)



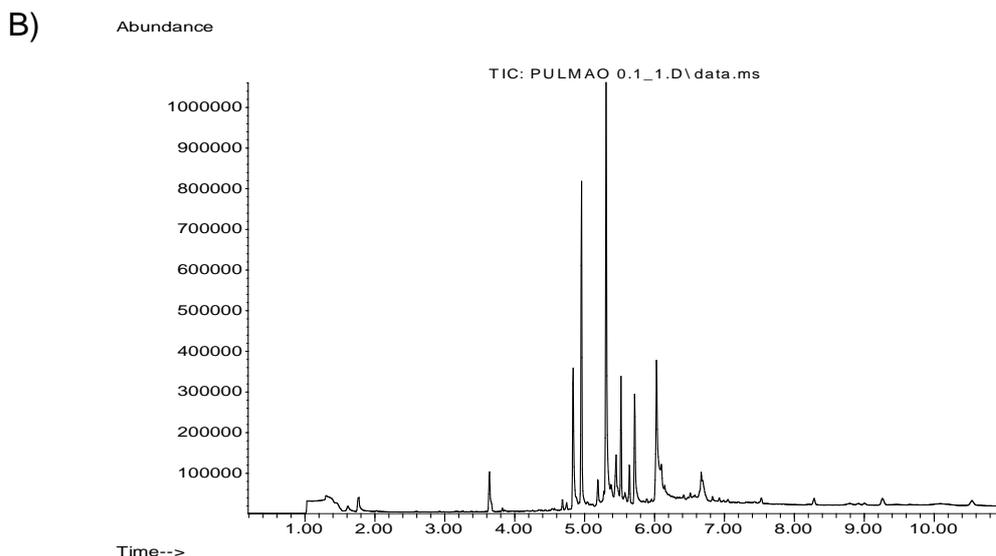
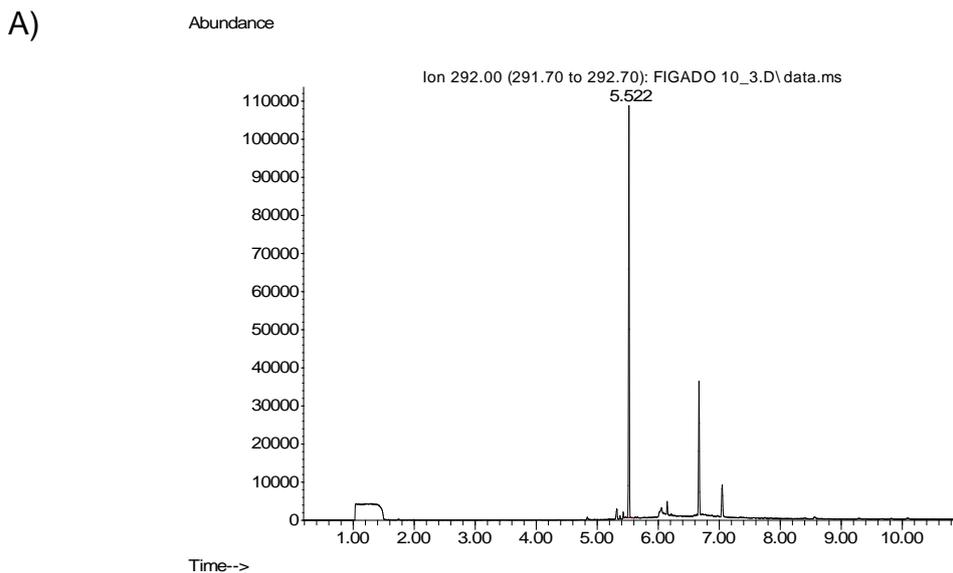


Figura 12: Cromatograma de íons totais (TIC).

O cromatograma representa o somatório da intensidade de sinais dos íons monitorados por SIM, em função do tempo de retenção cromatográfico, obtido por GC-MS, para amostras de fígado (A) e pulmão (B) de animais não expostos, onde foi adicionado o padrão interno e o analito de interesse.

No tempo de retenção de 5,52 minutos, o pico detectado, apresenta um íon de maior intensidade (292 m/z), que caracteriza o espectro e confirma a identidade da molécula. Assim, caracterizamos a presença do PCB52 em amostras de fígado (Figura 13A) e do pulmão (Figura 13B).



B)

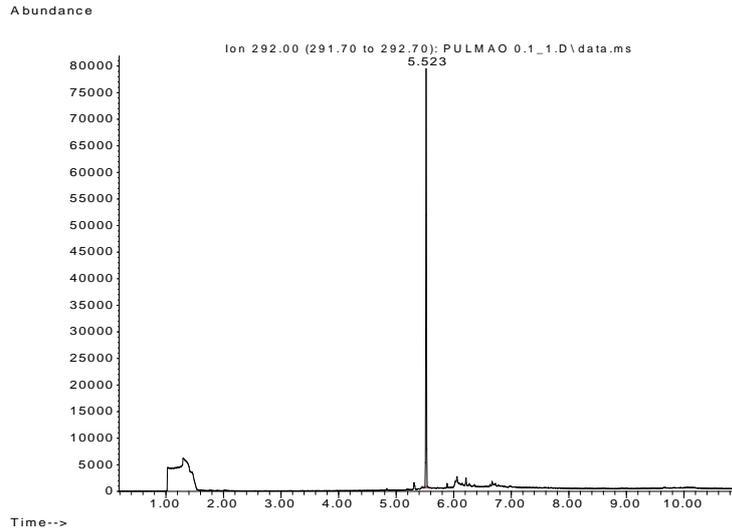
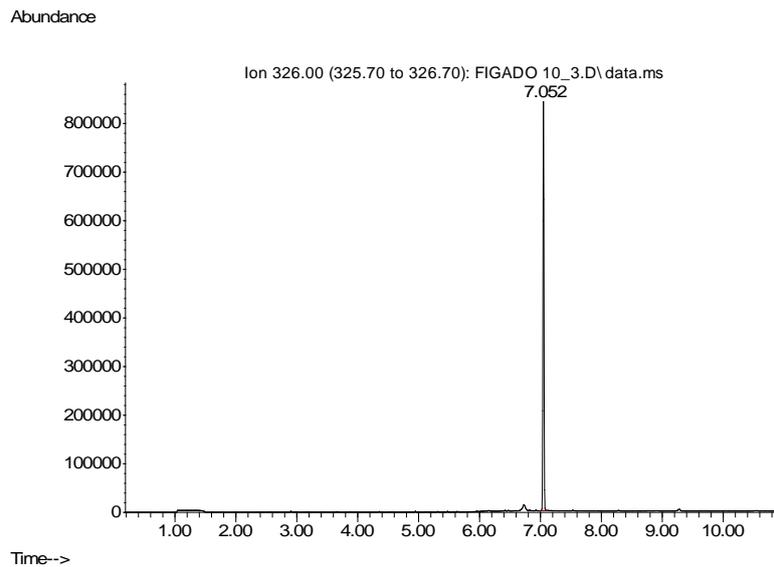


Figura 13: Cromatograma de monitoramento de íon selecionado (SIM) do íon m/z 292. No tempo de retenção de 5,52 minutos, monitorado para quantificação do padrão interno (PCB52), obtido por GC-MS, em amostra de fígado (A) e pulmão (B).

Por outro lado, no tempo de retenção de 7,05 minutos, o pico detectado, apresenta três íons de maior intensidade (326, 328 e 254 m/z), que em conjunto, caracterizam o espectro e confirmam a identidade da molécula de PCB126. Na figura 14A podemos identificar a substância em amostras de fígado e na figura 14B, em amostras de pulmão.

A)



B)

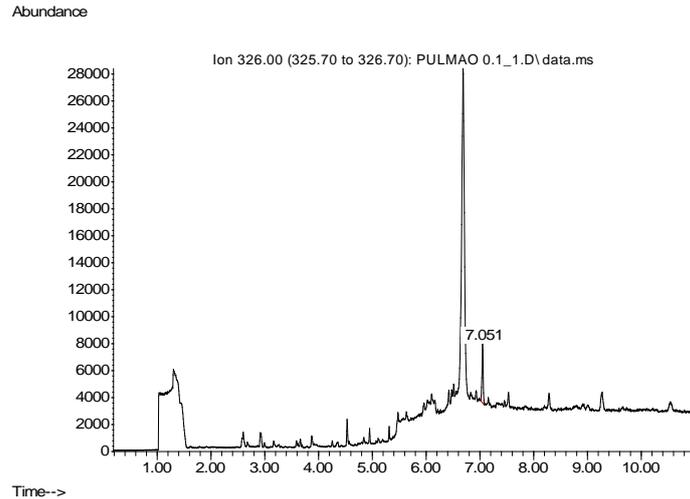
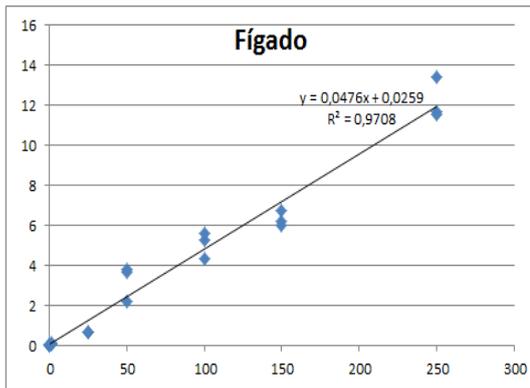


Figura 14: Cromatograma de monitoramento de íon selecionado (SIM) do íon m/z 326. Tempo de retenção de 7,05 minutos, monitorado para quantificação do PCB126, obtido por GC-MS, em amostra de fígado (A) e pulmão (B).

Uma vez caracterizado o perfil cromatográfico, foi construída uma curva de calibração para as amostras de fígado (Figura 15A) e em amostras de pulmão (Figura 15B). Foram escolhidos de cinco a seis pontos/concentrações de PCB126 para a construção da curva de calibração em fígado (1, 25, 50, 100, 150 e 250 ng/g) e em pulmão (0,1; 0,5; 1, 5 e 10), e o R^2 foi superior a 0,9.

A)



B)

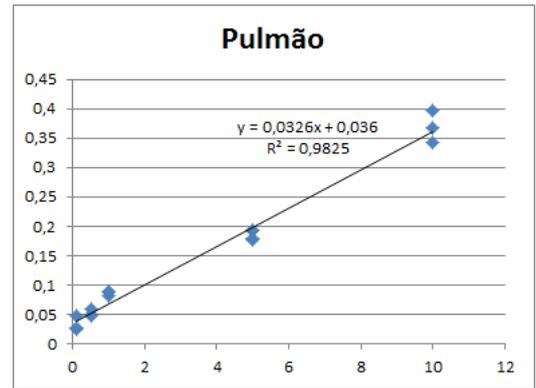
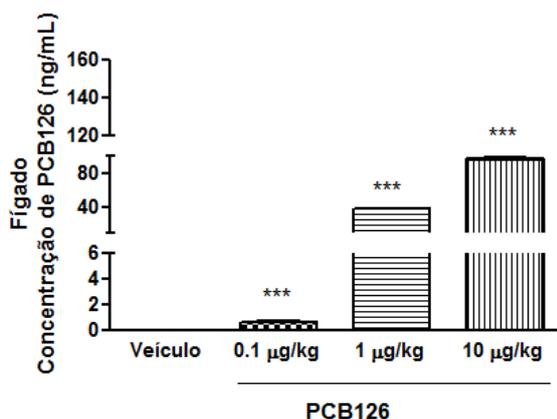


Figura 15: Curva de calibração para a quantificação da concentração de PCB126 em amostras de fígado (A) e pulmão (B).

Em seguida, quantificamos a concentração de PCB126 no fígado (Figura 16A) e pulmão (Figura 16B) dos animais submetidos ao protocolo de exposição. Não foram quantificáveis as concentrações de PCB126 encontradas no fígado ou pulmão de animais expostos ao veículo. Fígado de animais expostos ao PCB126 por instilação intranasal apresentaram concentrações crescentes do poluente em relação às doses de administração, enquanto que a concentração de PCB126 encontrada no pulmão foi equivalente em todas as doses de administração.

A)



B)

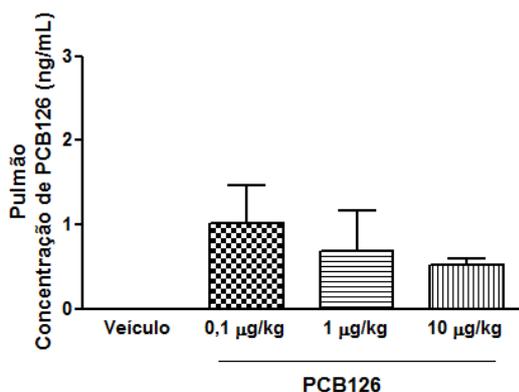


Figura 16: Quantificação da concentração de PCB126 em amostras biológicas de animais expostos *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 nas doses de 0,1; 1 ou 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Para quantificação dos níveis de PCB126 presentes no fígado (A) e no pulmão (B), 5 horas após as últimas exposições, os animais foram eutanasiados para coleta das amostras. A quantificação de PCB126 foi realizada em CG/MS. Os resultados expressam a média ± e.p.m. obtidos de 3 amostras em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo pós-teste de Tukey. *** $P < 0,001$ vs. *veículo*.

4.2 Caracterização de parâmetros hematológicos

4.2.1 Células da medula óssea

Após as últimas exposições, os animais foram eutanasiados e a medula óssea foi coletada para quantificação do número total de células. Os resultados mostraram que a exposição a 0,1 ou 1 µg/kg de PCB126 não alterou o número de células totais na medula óssea dos animais (Figura 17). Por outro lado, a exposição a 10 µg/kg de PCB126 diminuiu o número de células totais na medula óssea (Figura 17). Além disso, na figura 18 podemos verificar que esta diminuição de células totais está relacionada com a diminuição de linfócitos e neutrófilos na medula óssea. A produção de células vermelhas também é afetada após exposição ao PCB126, uma vez que o número de eritroblastos policromáticos apresenta-se diminuído neste grupo (Figura 18).

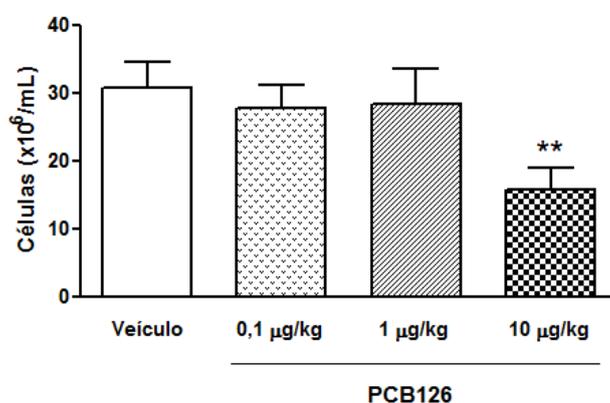


Figura 17: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre o número de células totais na medula óssea de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 nas doses de 0,1; 1 ou 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5 % DMSO). Para determinação do número total de células na medula óssea, 5 horas após as últimas exposições, os animais foram eutanasiados para coleta do perfusato medular. O número de células totais foi quantificado em hemocítmetro por microscopia óptica comum. Os resultados expressam a média ± e.p.m. do número de células totais na medula óssea obtidos de 7-10 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo pós-teste de Tukey (** $P < 0,01$ vs. veículo).

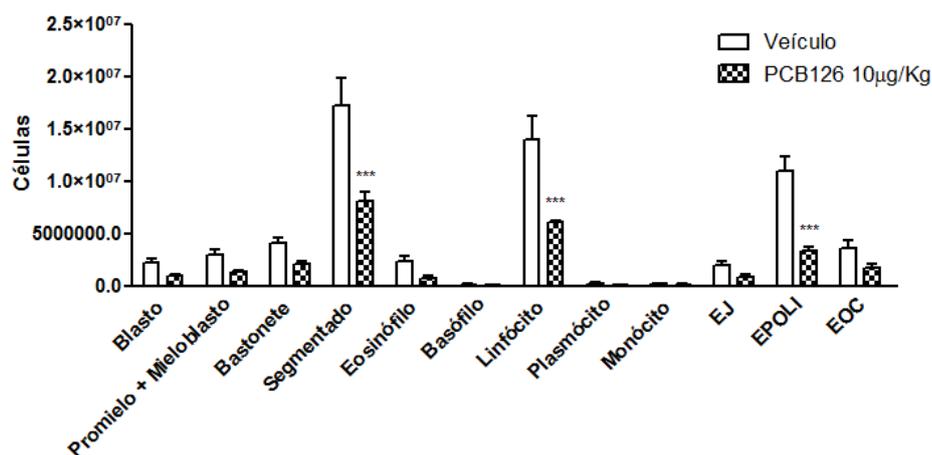


Figura 18: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre o número diferencial de células na medula óssea de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5 % DMSO). Para determinação do número diferencial de células na medula óssea, 5 horas após as últimas exposições, os animais foram eutanasiados para coleta do perfusato medular. O diferencial de células foi determinado por microscopia óptica comum. Os resultados expressam a média ± e.p.m. do diferencial de células da medula óssea obtidos de 6 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 2 vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni (***) $P < 0,001$ vs. *veículo*). Legenda: EJ: eritroblasto jovem (proeritroblasto e eritroblasto basófilo); EPOLI: Eritroblasto policromático; EOC: Eritroblasto ortocromático.

4.2.2 Células circulantes

Após as últimas exposições, os animais foram eutanasiados e o sangue total foi coletado para quantificação do número total de células circulantes. As doses de 0,1 e 1 µg/kg de PCB126 não alteraram o número de leucócitos totais no sangue circulante (Figura 19). Por outro lado, a exposição ao PCB126 na dose de 10 µg/kg reduziu o número de leucócitos totais nestes animais. Na figura 20, pela diferenciação dos leucócitos presentes no sangue, podemos atribuir esta redução a uma diminuição do número de linfócitos no sangue circulante dos animais que receberam a dose de 10 µg/kg de PCB126 por instilação intranasal. Podemos ainda afirmar que o número de neutrófilos e monócitos não estava alterado no sangue dos animais que receberam as três doses testadas neste trabalho, em relação ao animal que recebeu o veículo (Figura 20).

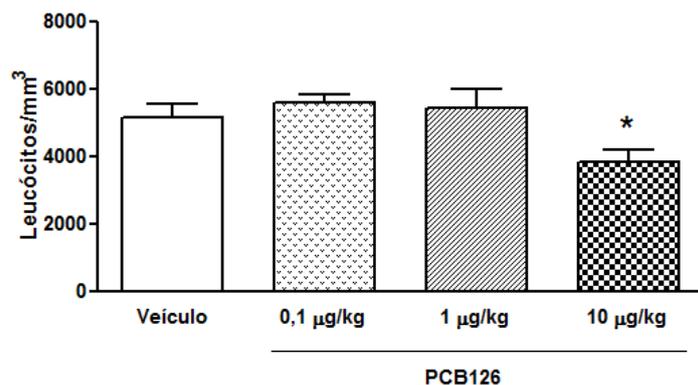


Figura 19: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre o número de células totais no sangue circulante de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 nas doses de 0,1; 1 ou 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5 % DMSO). Para determinação do número total de células no sangue circulante, 5 horas após as últimas exposições, os animais foram eutanasiados para a coleta do sangue total pela artéria aorta abdominal. O número de células totais foi quantificado em hemocítmetro por microscopia óptica comum. Os resultados expressam a média ± e.p.m. do número de leucócitos totais no sangue circulante obtidos de 9 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo pós-teste de Tukey (* $P < 0,05$ vs. *veículo*).

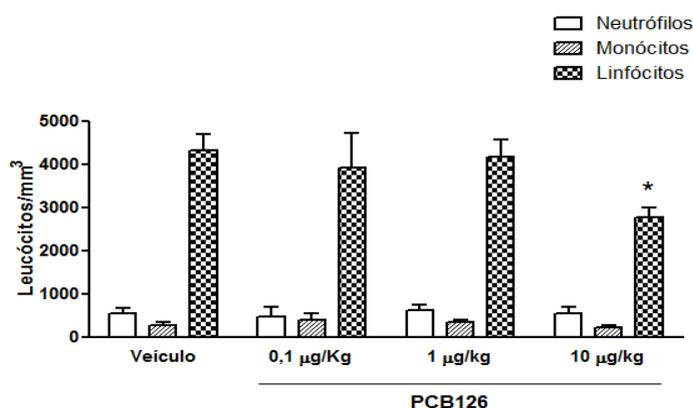


Figura 20: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre o número diferencial de células do sangue circulante de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 nas doses de 0,1; 1 ou 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5 % DMSO). Para determinação do número diferencial de células no sangue circulante, 5 horas após as últimas exposições, os animais foram eutanasiados para a coleta do sangue total pela artéria aorta abdominal. O número diferencial de leucócitos foi quantificado em esfregaços sanguíneos por microscopia óptica comum. Os resultados expressam a média ± e.p.m. do diferencial de leucócitos do sangue circulante obtidos de 9 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo pós-teste de Tukey (* $P < 0,05$ vs. *veículo*).

4.2.3 Parâmetros hematimétricos

Após as últimas exposições, os animais foram eutanasiados e o sangue circulante foi coletado para avaliação de alguns parâmetros hematimétricos, como valor de hemoglobina (Figura 21A), hematócrito (Figura 21B) e número de hemácias (Figura 21C). Os resultados mostraram que a exposição a 10 µg/kg de PCB126 aumentou estes parâmetros.

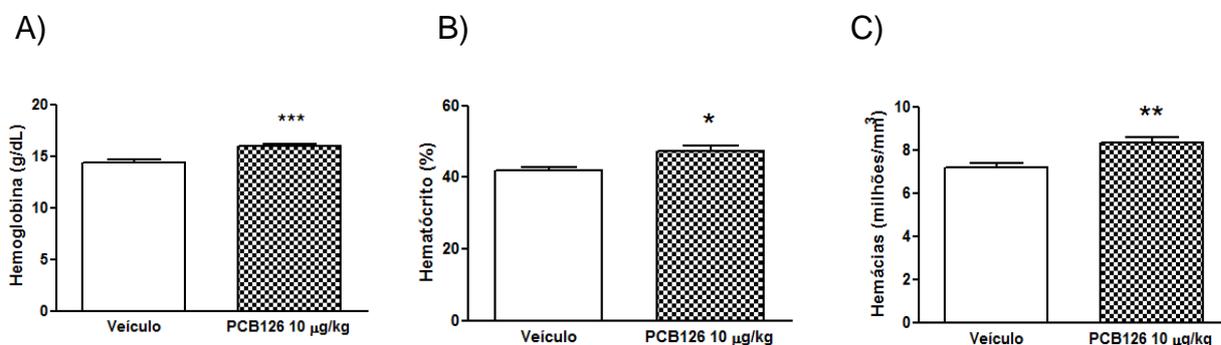


Figura 21: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre parâmetros hematimétricos de ratos Wistar machos.

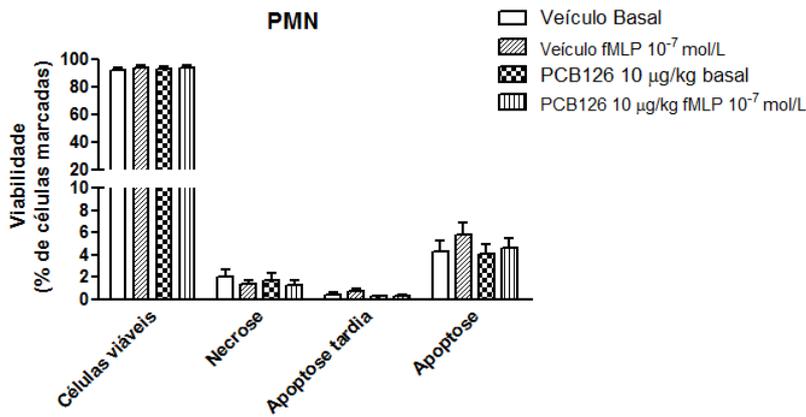
Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5 % DMSO). Para determinação dos parâmetros hematimétricos, o sangue total foi coletado da aorta abdominal com anticoagulante EDTA e avaliados pelo equipamento ABCVet. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de 6 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada pelo Teste t de Student não pareado (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs. veículo).

4.3 Caracterização de parâmetros inflamatórios

4.3.1 Avaliação da viabilidade celular em leucócitos circulantes

A avaliação de morte celular, por necrose, apoptose ou apoptose tardia foi realizada em neutrófilos e células mononucleares, obtidos do sangue circulante de animais expostos *in vivo* ao PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corpórea ou veículo. Adicionalmente, os leucócitos foram incubados com fMLP 10^{-7} mol/L (1 hora, a 37 °C) e avaliados os mesmos parâmetros. Os resultados mostram que a exposição ao PCB126 em condições basais ou estimuladas não induziu morte celular por necrose ou apoptose das células polimorfonucleares (Figura 22A) ou das células mononucleares (Figura 22B).

A)



B)

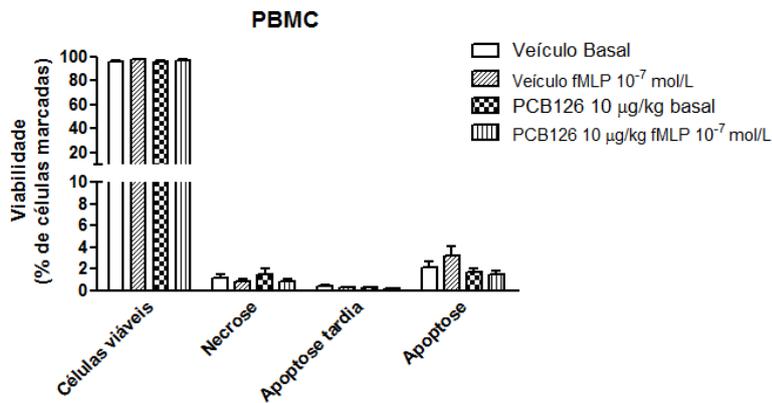


Figura 22: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a avaliação de morte celular em PMN e PBMC obtidos do sangue circulante de ratos Wistar machos. Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5 % DMSO). Após coleta do sangue circulante e lise dos eritrócitos, foi mensurada a marcação de fluorescência da anexina V e de PI em leucócitos totais do sangue circulante. A análise foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II e a quantificação das mesmas pelo aplicativo FlowJo. Os resultados representam a média ± e.p.m. da % de células marcadas com anexina V e/ou PI obtidos de 6 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 2 vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

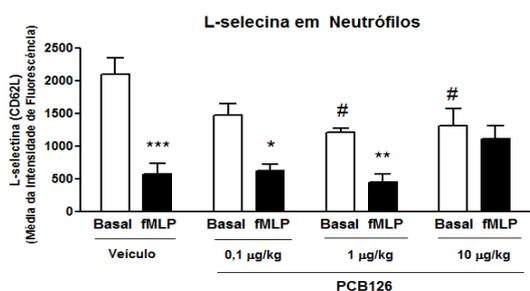
4.3.2 Expressão de moléculas de adesão em células circulantes induzida por fMLP

4.3.2.1 Expressão de CD62L

A expressão da molécula de adesão CD62L foi quantificada em neutrófilos e linfócitos sanguíneos de animais expostos ao PCB126 ou veículo, em condições basais ou estimuladas *in vitro* com fMLP. Os dados mostrados na figura 23A indicam que a expressão de CD62L em condições basais em neutrófilos é alterada pela exposição inalatória ao PCB126 nas doses de 1 e 10 µg/kg de massa corporal. Ainda, que a maior dose de PCB126 utilizada neste trabalho, 10 µg/kg de massa corporal, alterou a capacidade dos neutrófilos sanguíneos de responderem a um estímulo inflamatório, como o fMLP, uma vez que a sua clivagem não foi observada.

A figura 23B, indica a expressão de CD62L em linfócitos circulantes, que também está alterada em condições basais pela exposição ao PCB126 nas doses de 1 e 10 µg/kg de massa corporal, após instilação intranasal por 15 dias, em comparação com os linfócitos obtidos de animais que receberam o veículo.

A)



B)

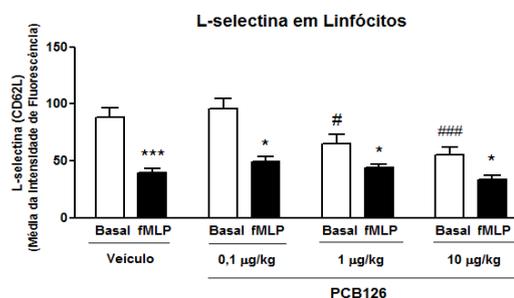


Figura 23: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a expressão da molécula de adesão CD62L em neutrófilos (A) e linfócitos (B) obtidos do sangue circulante de ratos Wistar machos.

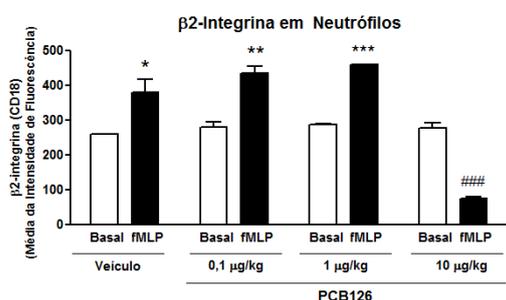
Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 nas doses de 0,1; 1 ou 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5 % DMSO). Após coleta do sangue circulante e lise dos eritrócitos, foi mensurada a média da intensidade da fluorescência de CD62L em 1×10^6 leucócitos totais em condições basais ou estimuladas com fMLP (10^{-7} mol/L, 1 hora a 37 °C) e incubadas com o anticorpo monoclonal anti-CD62L-FITC (1:100, 20 minutos a 4°C). A análise das células foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II e a quantificação das mesmas pelo aplicativo FlowJo. Os resultados representam a média \pm e.p.m. da intensidade da fluorescência (expresso em unidades arbitrárias) obtidos de 6 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo pós-teste de Tukey (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs. respectivo controle; # $P < 0,05$ e ### $P < 0,001$ vs. veículo basal).

4.3.2.2 Expressão de CD18

A expressão da molécula de adesão CD18 foi quantificada em neutrófilos e linfócitos circulantes. A figura 24A mostra que as doses de 0,1, 1 e 10 µg/kg de massa corporal não alteraram a expressão basal desta molécula em neutrófilos. Por outro lado, a dose de 10 µg/kg de massa corporal impediu o aumento da expressão de CD18 após estímulo inflamatório *in vitro* com fMLP.

Na figura 24B, podemos observar o efeito da exposição ao PCB126 sobre a expressão de CD18 em linfócitos. A exposição ao PCB126 não alterou a expressão basal desta molécula de adesão nos linfócitos circulantes. Por outro lado, após estímulo *in vitro* com fMLP, as doses de 0,1 e 1 e 10 µg/kg de massa corporal impediram o aumento da expressão da CD18.

A)



B)

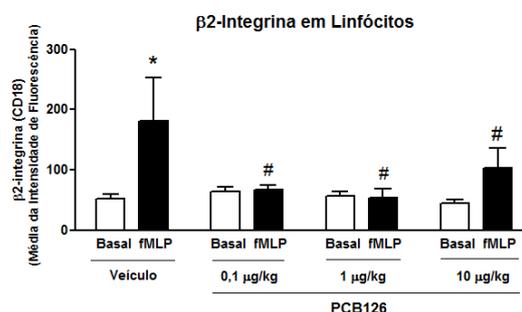


Figura 24: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a expressão da molécula de adesão CD18 em neutrófilos (A) e linfócitos (B) obtidos do sangue circulante de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 nas doses de 0,1; 1 ou 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5 % DMSO). Após coleta do sangue circulante e lise dos eritrócitos, foi mensurada a média da intensidade da fluorescência de CD18 em 1×10^6 leucócitos totais, em condições basais ou estimuladas com fMLP (10^{-7} mol/L, por 1 hora, a 37 °C), e incubadas com o anticorpo monoclonal anti-CD18-FITC (1:100, por 20 minutos, a 4 °C). A análise das células foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II e a quantificação das mesmas pelo aplicativo FlowJo. Os resultados representam a média \pm e.p.m da intensidade da fluorescência (expresso em unidades arbitrárias) obtidos de 6 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo pós-teste de Tukey (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs. respectivo controle; # $P < 0,05$ e #### $P < 0,001$ vs. veículo fMLP).

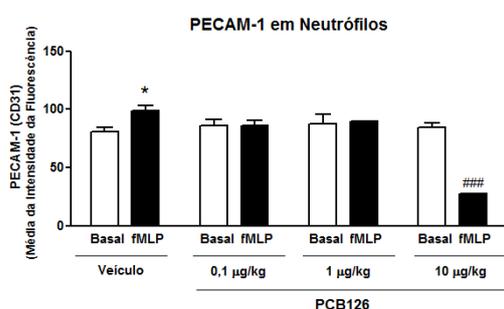
4.3.2.3 Expressão de CD31

A expressão da molécula de adesão CD31 foi quantificada nos leucócitos totais do sangue circulante dos animais expostos ao PCB126 ou veículo. Os dados obtidos na figura 25 mostram os efeitos da exposição ao PCB126 sobre a expressão desta molécula.

Na figura 25A podemos observar que a exposição ao PCB126 não altera a expressão de CD31 em neutrófilos em condições basais, mas após estímulo inflamatório *in vitro* com fMLP, as doses de 0,1 e 1 µg/kg de massa corporal impedem o aumento da expressão desta molécula, enquanto a dose de 10 µg/kg de massa corporal reduz significativamente a expressão de CD31 em neutrófilos.

A expressão de CD31 em linfócitos pode ser observada na figura 25B. A expressão basal de CD31 não é alterada pela exposição ao PCB126 nas três doses utilizadas neste trabalho. Por outro lado, as doses de 0,1, 1 e 10 µg/kg de massa corporal inibem o aumento da expressão desta molécula de adesão.

A)



B)

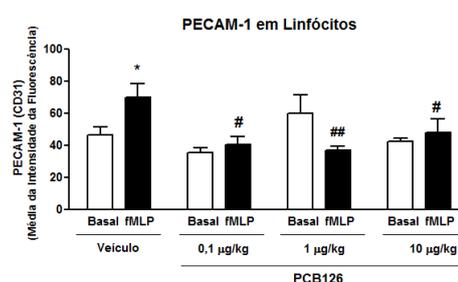


Figura 25: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a expressão da molécula de adesão CD31 em neutrófilos (A) e linfócitos (B) obtidos do sangue circulante de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 nas doses de 0,1; 1 ou 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5 % DMSO). Após coleta do sangue circulante e lise dos eritrócitos, foi mensurada a média da intensidade da fluorescência de CD31 em 1×10^6 leucócitos totais, em condições basais ou estimuladas com fMLP (10^{-7} mol/L, por 1 hora, a 37 °C), e incubadas com o anticorpo monoclonal anti-CD31-PE (1:100, 20 minutos, a 4 °C). A análise das células foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II e a quantificação das mesmas pelo aplicativo FlowJo. Os resultados representam a média \pm e.p.m. da intensidade da fluorescência (expresso em unidades arbitrárias) obtidos de 6 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo pós-teste de Tukey (* $P < 0,05$ vs. respectivo controle; # $P < 0,05$ e ### $P < 0,01$ vs. veículo fMLP).

4.3.3 Interação leucócito-endotélio

4.3.3.1 Mesentério em condições basais

A interação leucócito endotélio no mesentério foi realizada utilizando a metodologia da microscopia intravital. Após as últimas exposições, os animais foram anestesiados e o mesentério foi exposto. Desta forma, avaliamos o número de leucócitos rolando (Figura 26A), o número de leucócitos aderidos nas vênulas pós-capilares (Figura 26B), o número de leucócitos migrados (Figura 26C) e o diâmetro dos vasos analisados (Figura 26D). Não houve diferença nestes parâmetros ao observarmos animais expostos ao PCB126 na dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de massa corpórea e animais que receberam o veículo.

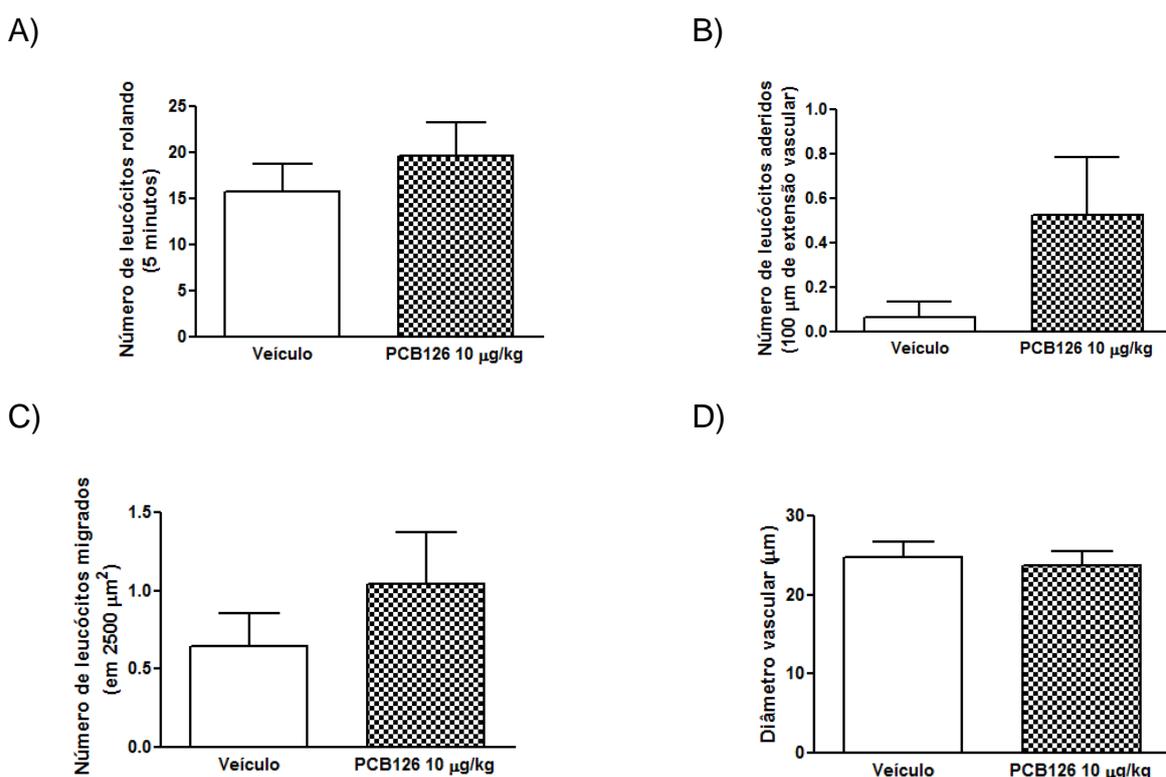


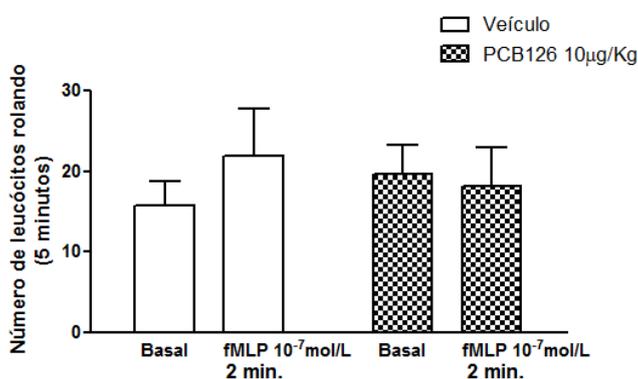
Figura 26: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a interação leucócito-endotélio basal no mesentério de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Após 5 horas das últimas exposições, os animais foram anestesiados e o mesentério foi exposto. Foram avaliados: A) número de leucócitos rolando (contados durante 5 minutos); B) o número de leucócitos aderidos em 100 μm de extensão vascular; C) o número de leucócitos migrados, em uma área de 2500 μm^2 ; e D) o diâmetro vascular (em μm). Os resultados indicam a média \pm e.p.m. obtidos em 12 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada pelo test t de Student não pareado.

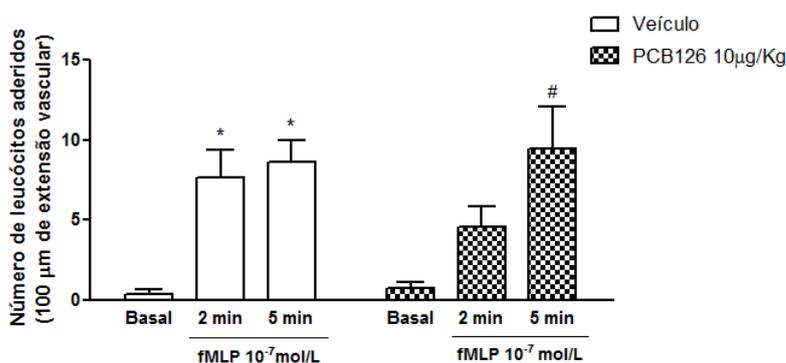
4.3.3.2 Mesentério após estimulação com fMLP

Após avaliação dos parâmetros basais no mesentério, foi utilizado uma solução de fMLP a 10^{-7} mol/L como estímulo inflamatório e avaliamos o número de leucócitos rolando (Figura 27A), o número de leucócitos aderidos nas vênulas pós-capilares (Figura 27B) e o diâmetro dos vasos analisados (Figura 27C). Após dois ou cinco minutos do estímulo inflamatório, não observamos alteração no número de leucócitos rolando durante cinco minutos de avaliação ou no diâmetro dos vasos (Figuras 27A e 27C). Por outro lado, o número de leucócitos aderidos estava aumentado após 2 minutos de incubação ao fMLP 10^{-7} mol/L no mesentério de animais controle. Este aumento no número de células aderidas só pôde ser percebido após 5 minutos do estímulo inflamatório em animais expostos ao PCB126 na dose de 10 μ g/kg de massa corpórea (Figura 27B).

A)



B)



C)

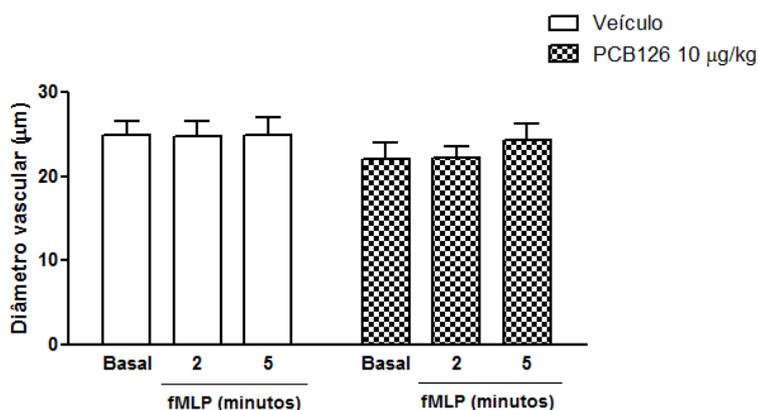


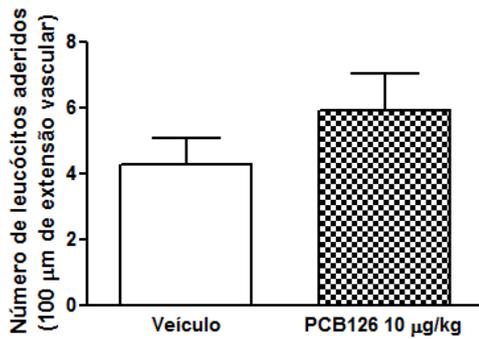
Figura 27: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a interação leucócito-endotélio no mesentério de ratos Wistar machos após estimulação com fMLP.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Após 5 horas das últimas exposições, os animais foram anestesiados e o mesentério foi exposto. Foi utilizado como estímulo inflamatório o fMLP 10^{-7} mol/L e avaliados os seguintes parâmetros, após 2 ou 5 minutos: A) número de leucócitos rolando (durante 5 minutos); B) o número de leucócitos aderidos, em 100 µm de extensão vascular; C) o diâmetro vascular (em µm). Os resultados indicam a média ± e.p.m. obtidos em 12 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo pós-teste de Tukey (* $P < 0,05$ vs. controle basal veículo; # $P < 0,05$ vs. controle basal PCB126).

4.3.3.3 Fígado

Após a análise do mesentério descrita acima, o fígado foi exposto e o número de leucócitos aderidos nos sinusóides foi avaliado (Figura 28A). Em seguida, o fMLP 10^{-7} mol/L foi utilizado como estímulo inflamatório para se avaliar o mesmo parâmetro após 1 ou 3 minutos (Figura 28B). Os resultados obtidos indicam que não há diferença no número de leucócitos aderidos na microcirculação do fígado de animais expostos ao PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corpórea quando comparado com animais expostos ao veículo, em condições basais ou após estimulação com fMLP.

A)



B)

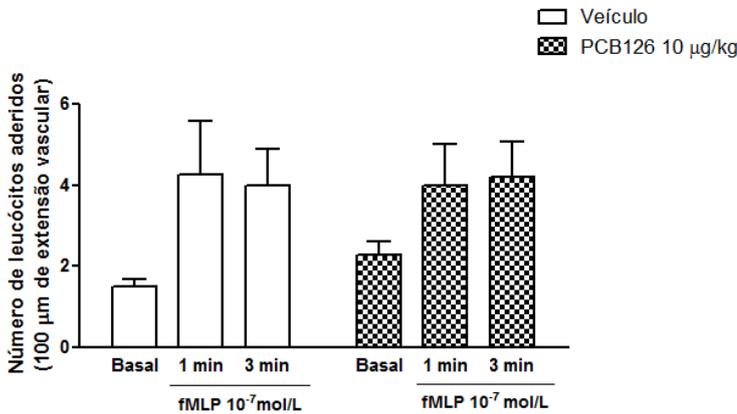


Figura 28: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a interação leucócito-endotélio no fígado de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 μg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Após 5 horas das últimas exposições, os animais foram anestesiados e o fígado foi exposto. Foi utilizado como estímulo inflamatório o fMLP 10⁻⁷ mol/L e avaliados os seguintes parâmetros, após 1 ou 3 minutos: A) número de leucócitos aderidos em condições basais; B) número de leucócitos aderidos após estimulação com fMLP 10⁻⁷ mol/L. O número de leucócitos aderidos foi contado em 100 μm de extensão vascular. Os resultados indicam a média ± e.p.m. obtidos em 12 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via ou de 2 vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

4.3.3.4 Pâncreas em condições basais

Seguindo com a avaliação da interação leucócito-endotélio, o pâncreas foi exposto e o número de leucócitos rolando (Figura 29A), leucócitos aderidos (Figura 29B) e o diâmetro vascular (Figura 29C) foram avaliados em condições basais. Os dados obtidos mostram que não houve diferença nos parâmetros analisados quando comparamos a microcirculação do pâncreas de animais expostos ao PCB126 na maior dose utilizada neste trabalho com os animais que receberam o veículo.

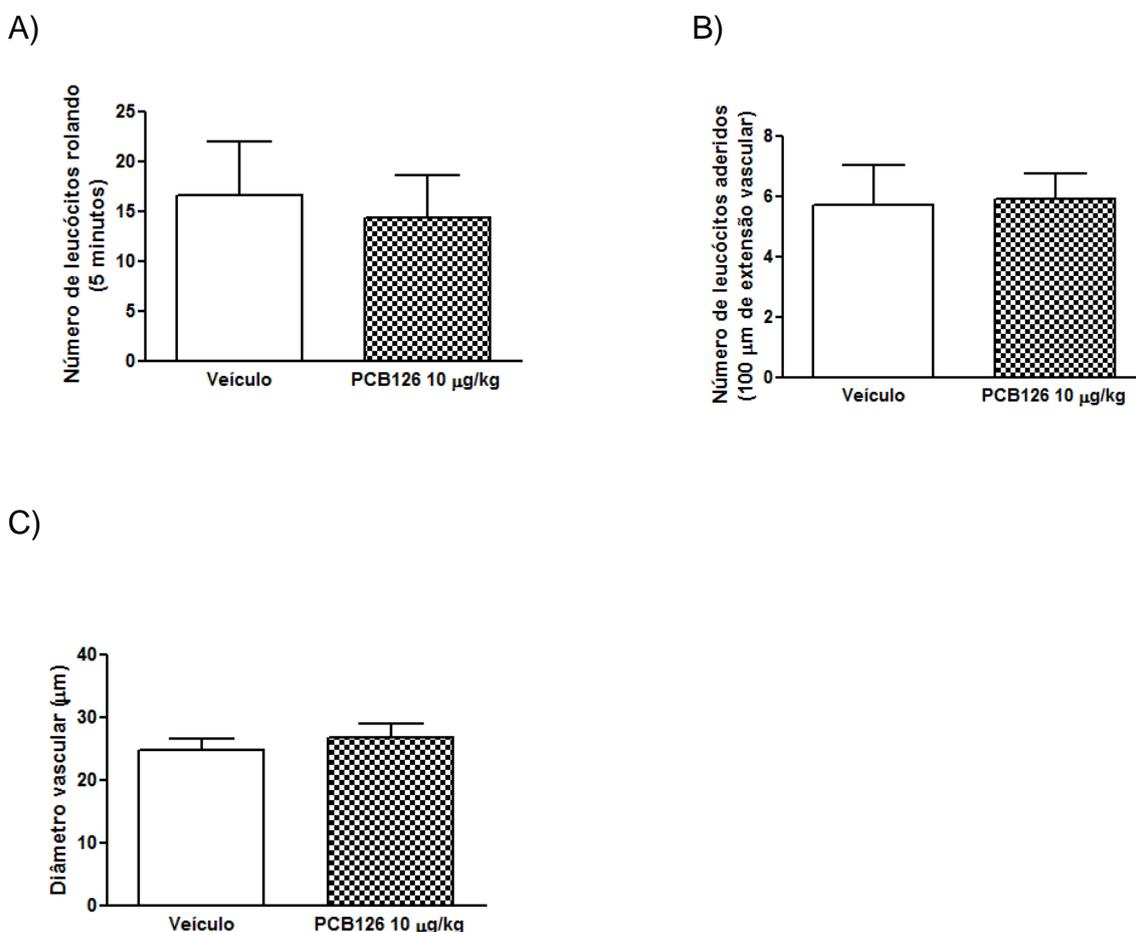


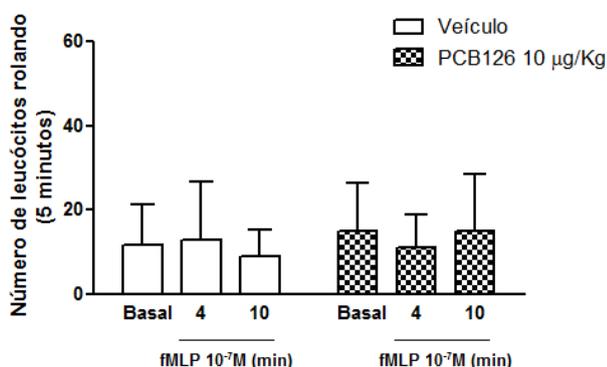
Figura 29: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a interação leucócito-endotélio em condições basais no pâncreas de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Após 5 horas das últimas exposições, os animais foram anestesiados, o pâncreas foi exposto e foi avaliado: A) número de leucócitos rolando (contados durante 5 minutos); B) o número de leucócitos aderidos em 100 µm de extensão vascular; e C) o diâmetro vascular (em µm). Os resultados indicam a média ± e.p.m. obtidos em 12 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student.

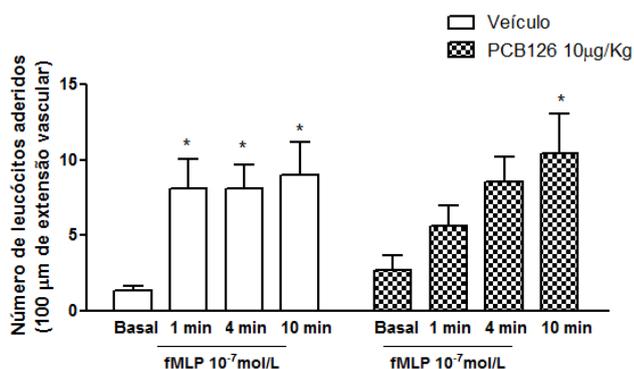
4.3.3.5 Pâncreas após estimulação com fMLP

Utilizando os animais em que a leitura do efeito basal da exposição ao PCB sobre a microcirculação do pâncreas foi obtida, fMLP 10^{-7} mol/L foi utilizado como estímulo inflamatório para se avaliar os mesmos parâmetros, após 1, 4 ou 10 minutos do estímulo, nesse mesmo leito vascular (Figura 30). Os resultados obtidos indicam que não há diferença no número de leucócitos rolando (Figura 30A) e no diâmetro vascular (Figura 30C) na microcirculação do pâncreas de animais expostos ao PCB126 na dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de massa corpórea quando comparado com animais expostos ao veículo, após estimulação com fMLP. Por outro lado, o número de leucócitos aderidos em animais expostos ao veículo aumentou após 1 minuto da estimulação com fMLP, enquanto que os leucócitos aderidos nos animais expostos ao PCB126 na maior dose utilizada neste trabalho apresentou aumento somente após 10 minutos de estimulação (Figura 30B).

A)



B)



C)

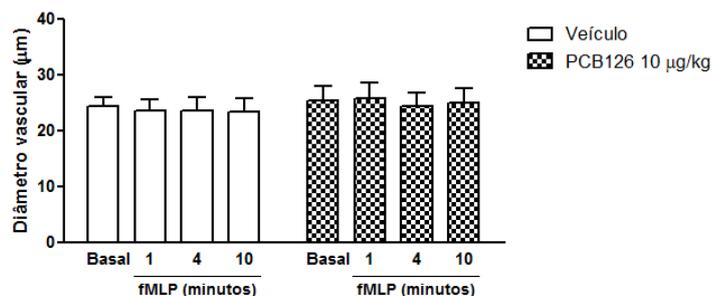


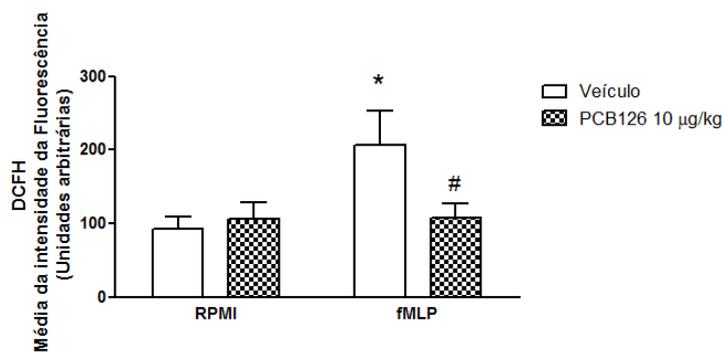
Figura 30: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a interação leucócito-endotélio no pâncreas de ratos Wistar machos após estimulação com fMLP.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Após 5 horas das últimas exposições, os animais foram anestesiados e o pâncreas foi exposto. Foi utilizado como estímulo inflamatório o fMLP 10^{-7} mol/L e avaliados os seguintes parâmetros após 1, 4 ou 10 minutos: A) número de leucócitos rolando (durante 5 minutos); B) o número de leucócitos aderidos em 100 µm de extensão vascular; e C) o diâmetro vascular (em µm). Os resultados indicam a média ± e.p.m. obtidos em 12 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via seguida pelo pós-teste de Tukey ($*P < 0,05$ vs. respectivo controle basal).

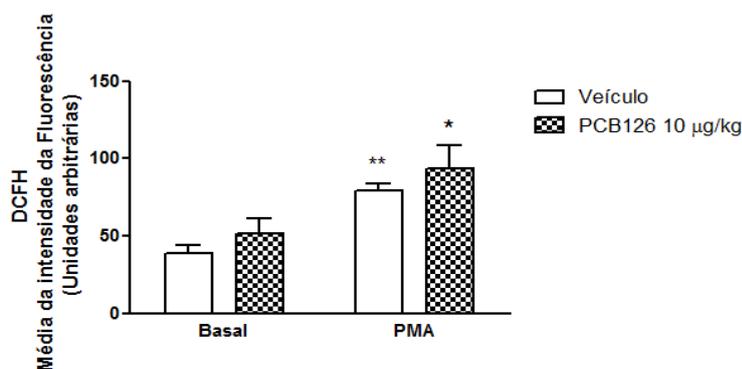
4.3.4 Quantificação do *burst* oxidativo em neutrófilos circulantes

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular por neutrófilos circulantes foi avaliada em condições basais ou após estimulação *in vitro* com fMLP (10 µM, 10 minutos, 37 °C; Figura 31A), com PMA (10 ng/mL, 15 minutos; 37 °C; Figura 31B) ou com LPS (5 µg/mL; 30 minutos; 37 °C; Figura 31C) e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados encontrados mostram os neutrófilos obtidos de animais expostos ao veículo após incubação com um estímulo inflamatório apresentam concentração de EROs aumentada. Neutrófilos isolados de animais expostos ao PCB126 não apresentam alteração da produção de EROs em condições basais, mas após indução por estímulo inflamatório com fMLP, o aumento na produção de EROs foi inibida (Figura 31A). O mesmo não ocorreu quando os estímulos (Figura 31B) ou LPS (Figura 31C) foram utilizados como indutores, onde podemos observar aumento na produção de EROs pelos neutrófilos.

A)



B)



C)

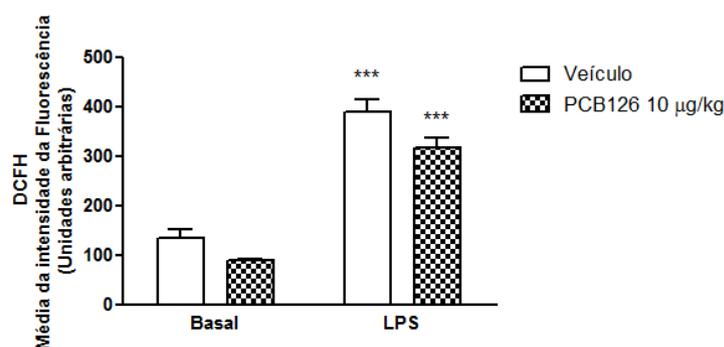


Figura 31: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a produção de espécies reativas por neutrófilos obtidos do sangue circulante de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Após coleta do sangue circulante com anticoagulante, os neutrófilos foram isolados e utilizados para incubação *in vitro* com os estímulos fMLP (10^{-7} mol/L); PMA (10 ng/mL) ou LPS (5 µg/mL). A análise foi realizada pela quantificação da oxidação do DCFH por citômetro de fluxo. Os resultados representam a média ± e.p.m. da intensidade da fluorescência (expressa em unidades arbitrárias) obtidos de 10 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via ou de 2 vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs. respectivo controle basal; # $P < 0,05$ vs. veículo sob estímulo).

4.3.5 Expressão de FPR-1 em neutrófilos circulantes

Devido à participação do receptor FPR-1 no reconhecimento do estímulo inflamatório fMLP, o mesmo foi quantificado em neutrófilos circulantes por citometria de fluxo. A Figura 32 mostra que em condições basais, a exposição ao PCB126 na dose de 10 µg/kg reduz a expressão do receptor FPR-1 em neutrófilos circulantes. Após a estimulação *in vitro* com fMLP, 10⁻⁷ mol/L a 37 °C, por 1 hora, os neutrófilos obtidos de animais expostos ao PCB126 continuaram a apresentar o mesmo perfil, menor expressão do receptor FPR-1 em comparação aos neutrófilos obtidos de animais expostos ao veículo.

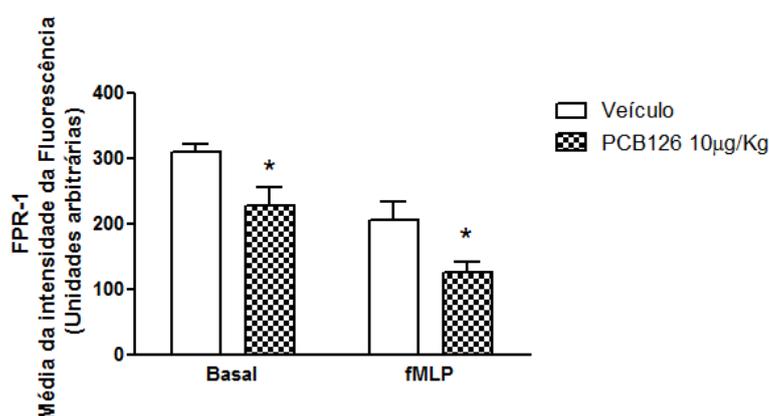


Figura 32: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a expressão de FPR-1 em neutrófilos obtidos de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Após coleta do sangue circulante com anticoagulante, os neutrófilos foram isolados e incubados ou não com fMLP (10⁻⁷ mol/L), por 1 hora, a 37 °C. Após o período de incubação, as células foram incubadas com anticorpo anti-FPR-1 e analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados representam a média ± e.p.m. da intensidade da fluorescência (expressas em unidades arbitrárias) em neutrófilos obtidos de 10 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 2 vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni (**P*<0,05 vs. respectivo controle).

4.3.6 Expressão de TLR4 em neutrófilos circulantes

Uma vez que o receptor TLR4 é o receptor de membrana que reconhece o LPS e auxilia a sua entrada nas células, a expressão deste receptor foi quantificada (Figura 33), por citometria de fluxo, em neutrófilos isolados do sangue circulante. Em condições basais, a exposição ao PCB126 na dose de 10 µg/kg não altera a expressão do receptor TLR4 em neutrófilos circulantes. Após a estimulação *in vitro* com LPS, 5 µg/mL, a 37 °C, por 30 minutos, o receptor TLR4 apresenta sua expressão aumentada em neutrófilos obtidos de animais expostos ao veículo ou ao PCB126.

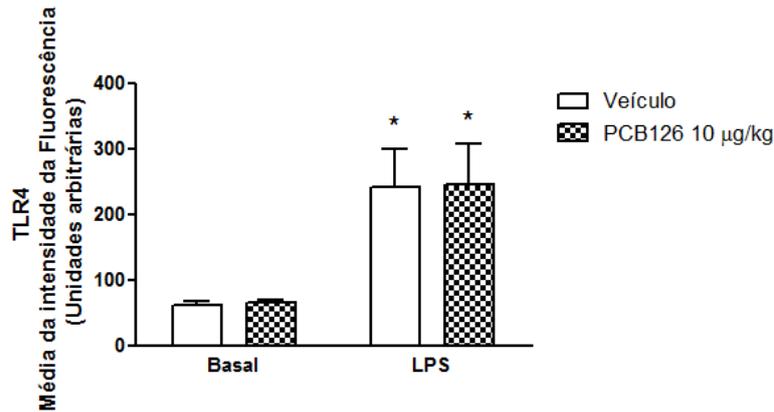


Figura 33: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a expressão de TLR4 em neutrófilos obtidos de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Após coleta do sangue circulante com anticoagulante, os neutrófilos foram isolados e incubados ou não com LPS (5 µg/mL), por 1 hora, a 37 °C. Após o período de incubação com o agente inflamatório, as células foram incubadas com anticorpo anti-TLR4 e analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados representam a média ± e.p.m. da intensidade da fluorescência (expressa em unidades arbitrárias) em neutrófilos obtidos de 10 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via seguida pelo pós-teste de Tukey (*P<0,05 vs. respectivo veículo).

4.3.7 Quimiotaxia de neutrófilos circulantes

Neutrófilos obtidos de animais expostos ao veículo ou ao PCB126 foram estimulados à migração utilizando o fMLP 10^{-7} mol/L, como agente quimioatraente. Observamos que neutrófilos obtidos de animais expostos ao PCB126 na dose de 10 µg/kg apresentavam menor atividade quimiotática comparado aos obtidos de animais controle, tanto em condição basal, quanto sob estimulação com o fMLP (Figura 34).

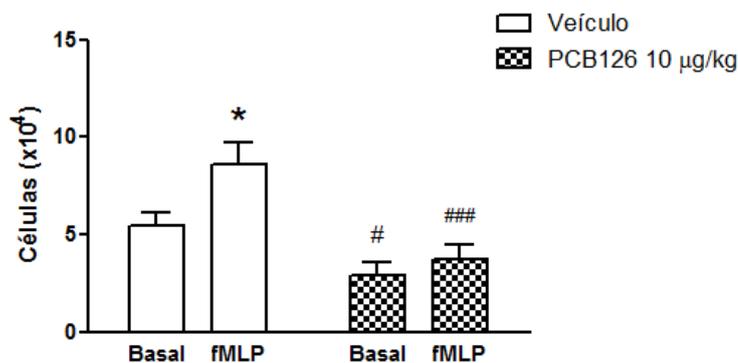


Figura 34: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a quimiotaxia de neutrófilos circulantes de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5 % DMSO). Após coleta do sangue circulante com anticoagulante, os neutrófilos foram isolados do sangue total e utilizados para o ensaio de quimiotaxia. O estímulo quimioatraente utilizado foi o fMLP (10⁻⁷ mol/L). A câmara quimiotática foi incubada por 2 horas a 37 °C e a 5 % de CO₂. A análise foi realizada pela mensuração do número de células. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via ou de 2 vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni (**P*<0,05 vs. basal; #*P*<0,05 e ###*P*<0,001 vs. respectivo veículo).

4.3.8 Neutrófilos tratados *in vitro* com PCB126

Com o intuito de se avaliar a participação direta do PCB126 sobre os efeitos observados, principalmente em neutrófilos circulantes, a análise da viabilidade celular, expressão de receptores de membrana, da produção de EROs e da quimiotaxia frente ao fMLP foram avaliados em neutrófilos peritoneais recrutados de animais não expostos e tratados *in vitro* com PCB126, em diferentes concentrações. O tratamento *in vitro* com PCB126 nas concentrações de 0,001; 0,1; 1 ou 10 µM por 1 hora, a 37°C, não causou morte celular aos neutrófilos (Figura 35).

Na figura 36 observamos que a exposição ao PCB126 *in vitro* não alterou a geração de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos em condições basais. Após estimulação *in vitro* com os estímulos fMLP ou LPS, todas as concentrações de PCB126 utilizadas aumentaram a geração de espécies reativas de oxigênio, assim como neutrófilos que receberam o meio de cultura (RPMI) ou tratados com solução veículo.

A expressão do receptor TLR4 foi avaliada na figura 37. Em condições basais o tratamento *in vitro* ao PCB126 não alterou a expressão do receptor. Por outro lado, após estimulação com LPS, 1 hora, a 37 °C, os neutrófilos tratados *in vitro* com meio de cultura, veículo ou PCB126 nas quatro concentrações utilizadas, apresentavam a expressão do receptor de membrana TLR4 aumentada.

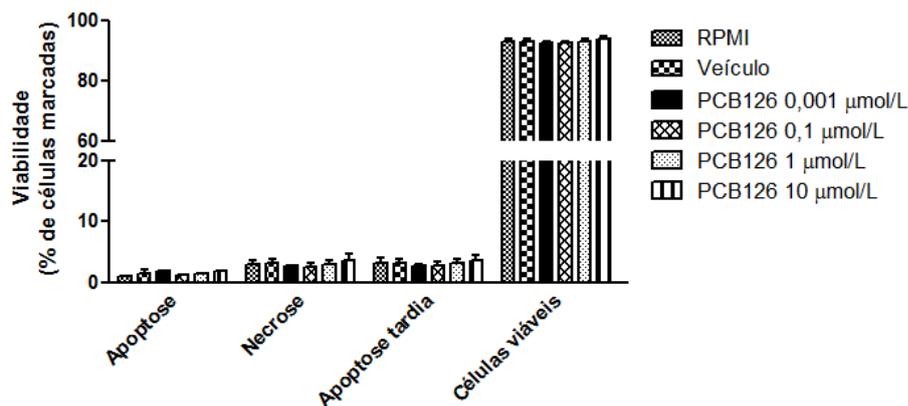


Figura 35: Efeito da exposição *in vitro* ao PCB126 sobre a viabilidade de neutrófilos peritoneais de ratos Wistar machos.

Neutrófilos foram isolados da cavidade peritoneal de ratos Wistar machos após indução de migração por glicogênio de ostra a 1%. Após 4 horas, os animais foram eutanasiados para coleta dos neutrófilos, que foram incubados a 37 °C, por 1 hora, em diferentes concentrações de PCB126. Após o período de incubação, foi mensurada a média da intensidade da fluorescência de anexina V e de PI. A análise foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II e a quantificação das mesmas pelo aplicativo FlowJo. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da intensidade da fluorescência obtidos de 6 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo pós-teste de Tukey.

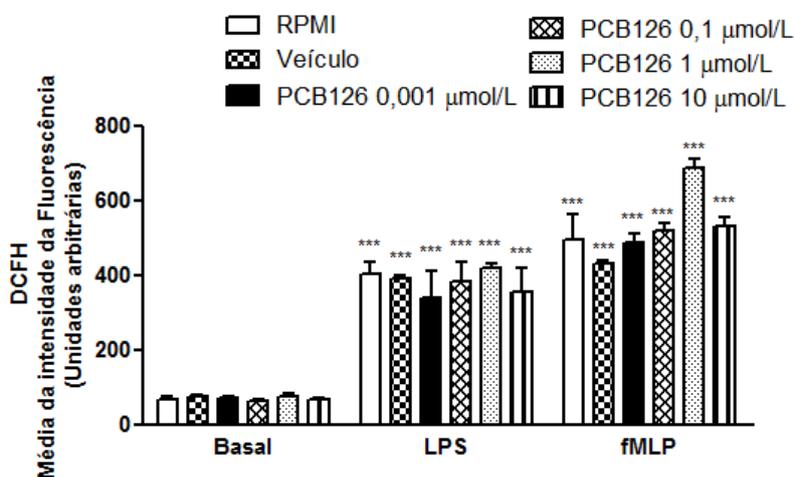


Figura 36: Efeito da exposição *in vitro* ao PCB126 sobre a geração de espécies reativas por neutrófilos peritoneais de ratos Wistar machos.

Neutrófilos foram isolados da cavidade peritoneal de ratos Wistar machos após indução de migração por glicogênio de ostra a 1%. Após 4 horas, os animais foram eutanasiados para coleta dos neutrófilos, que foram incubados a 37 °C, por 1 hora, em diferentes concentrações de PCB126. Após o período de incubação, foi realizada a análise da quantificação da oxidação do DCFH, em condições basais ou após incubação *in vitro* com os estímulos fMLP (10^{-7} mol/L) ou LPS (5 µg/mL), por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da intensidade da fluorescência (expressa em unidades arbitrárias) obtidos de 6 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo pós-teste de Tukey (***) $P < 0,001$ vs. respectivo controle basal).

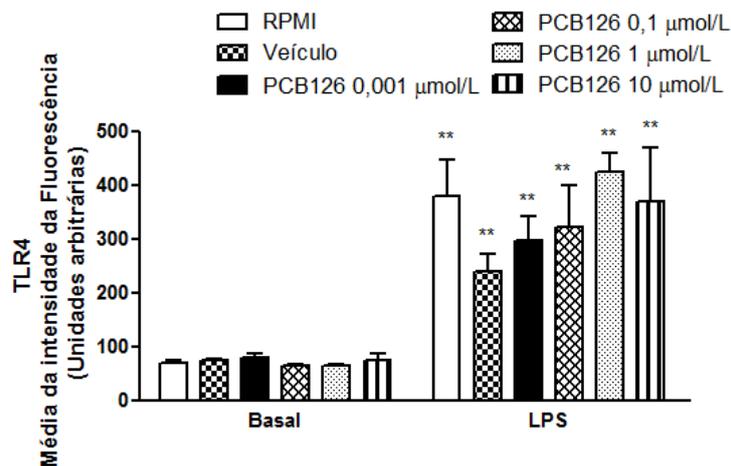


Figura 37: Efeito da exposição *in vitro* ao PCB126 sobre a expressão de TLR4 em neutrófilos peritoneais de ratos Wistar machos.

Neutrófilos foram isolados da cavidade peritoneal de ratos Wistar machos após indução de migração por glicogênio de ostra a 1%. Após 4 horas, os animais foram eutanasiados para coleta dos neutrófilos, que foram incubados a 37 °C, por 1 hora, em diferentes concentrações de PCB126. Após o período de incubação, foi mensurada a média da intensidade da fluorescência da expressão de TLR4 em condições basais e após estimulação com LPS. A análise foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II e a quantificação das mesmas pelo aplicativo FlowJo. Os resultados expressam a média \pm e.p.m. da intensidade da fluorescência (expressa em unidades arbitrárias) obtidos de 6 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo pós-teste de Tukey (** $P < 0,01$ vs. *respectivo controle basal*).

Por outro lado, o tratamento *in vitro* com PCB126, somente na concentração de 10 µmol/L, aumentou a expressão do receptor FPR-1 em neutrófilos quando comparado às células que receberam o meio de cultura ou o veículo (Figura 38). As outras concentrações de PCB126 utilizadas não causaram alteração a expressão do receptor, em condições basais ou após tratamento *in vitro* com o estímulo fMLP. Os neutrófilos tratados com PCB126 10 µmol/L apresentavam

Neutrófilos tratados com meio de cultura ou veículo apresentaram aumento da migração quando estimulados pelo agente quimioatraente fMLP (Figura 39). O mesmo não aconteceu com os neutrófilos tratados *in vitro* com PCB126 nas quatro concentrações utilizadas. Por outro lado, em condições basais, as concentrações de 0,1 e 1 µmol/L de PCB126 induziram a migração dos neutrófilos quando comparados aos neutrófilos que receberam meio de cultura ou veículo.

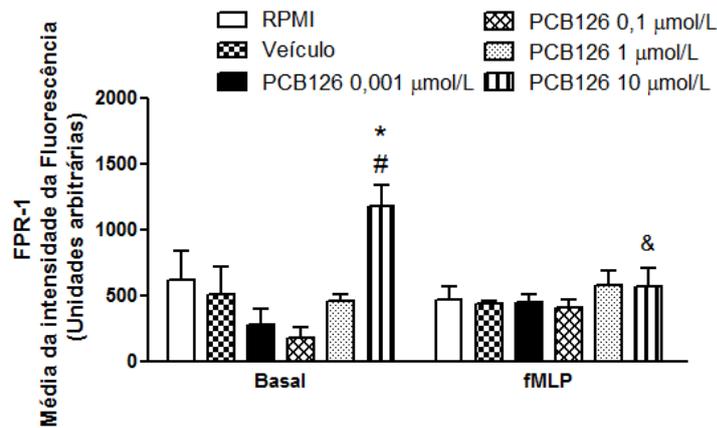


Figura 38: Efeito da exposição *in vitro* ao PCB126 sobre a expressão de FPR-1 em neutrófilos peritoneais de ratos Wistar machos.

Neutrófilos foram isolados da cavidade peritoneal de ratos Wistar machos após indução de migração por glicogênio de ostra a 1%. Após 4 horas, os animais foram eutanasiados para coleta dos neutrófilos, que foram incubados a 37 °C, por 1 hora, em diferentes concentrações de PCB126. Após o período de incubação, foi mensurada a média da intensidade da fluorescência da expressão de FPR-1 em condições basais e após estimulação com fMLP. A análise foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II e a quantificação das mesmas pelo aplicativo FlowJo. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da intensidade da fluorescência (expressa em unidades arbitrárias) obtidos de 6 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo pós-teste de Tukey (* $P < 0,05$ vs. RPMI basal; # $P < 0,05$ vs. veículo basal; & $P < 0,05$ vs. PCB126 10 µmol/L basal).

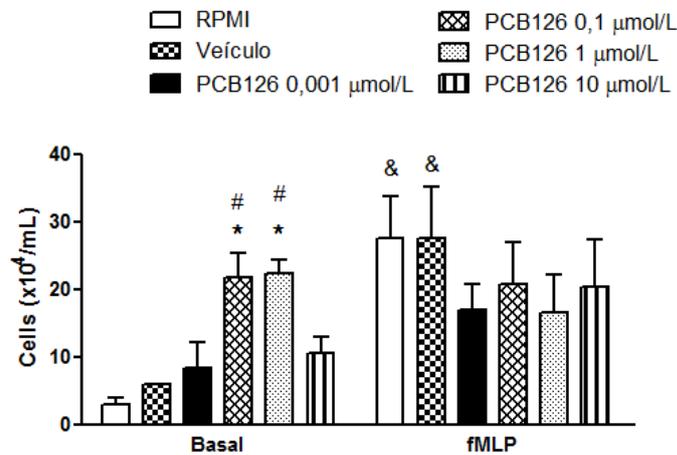


Figura 39: Efeito da exposição *in vitro* ao PCB126 sobre a migração de neutrófilos peritoneais de ratos Wistar machos.

Neutrófilos foram isolados da cavidade peritoneal de ratos Wistar machos após indução de migração por glicogênio de ostra a 1%. Após 4 horas, os animais foram eutanasiados para coleta dos neutrófilos, que foram incubados a 37 °C, por 1 hora, em diferentes concentrações de PCB126. Após o período de incubação, os neutrófilos foram utilizados para o ensaio de quimiotaxia. O estímulo quimioatraente utilizado foi o fMLP (10^{-7} mol/L). A câmara quimiotática foi incubada por 2 horas a 37 °C e a 5 % de CO₂. A análise foi realizada pela mensuração do número de células. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via seguida pelo pós-teste de Tukey (* $P < 0,05$ vs. RPMI basal; # $P < 0,05$ vs. veículo basal e & $P < 0,05$ vs. respectivo controle basal).

4.3.9 Moléculas de adesão solúveis

A concentração das moléculas de adesão solúveis sICAM-1 (Figura 40A), sPECAM-1 (Figura 40B) ou sVCAM-1 (Figura 40C) foram determinadas no soro obtido dos animais expostos ao PCB126 ou veículo. Os dados obtidos na figura 36A indicam que animais expostos ao PCB126 na dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de massa corpórea apresentaram menores concentrações nos níveis de sICAM-1 quando comparados aos níveis encontrados em animais expostos ao veículo. Por outro lado, as figuras 40B e 40C mostram que não houve diferença significativa entre os níveis de sPECAM-1 ou sVCAM-1 entre os animais que foram expostos ao PCB126 na dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de massa corpórea e veículo.

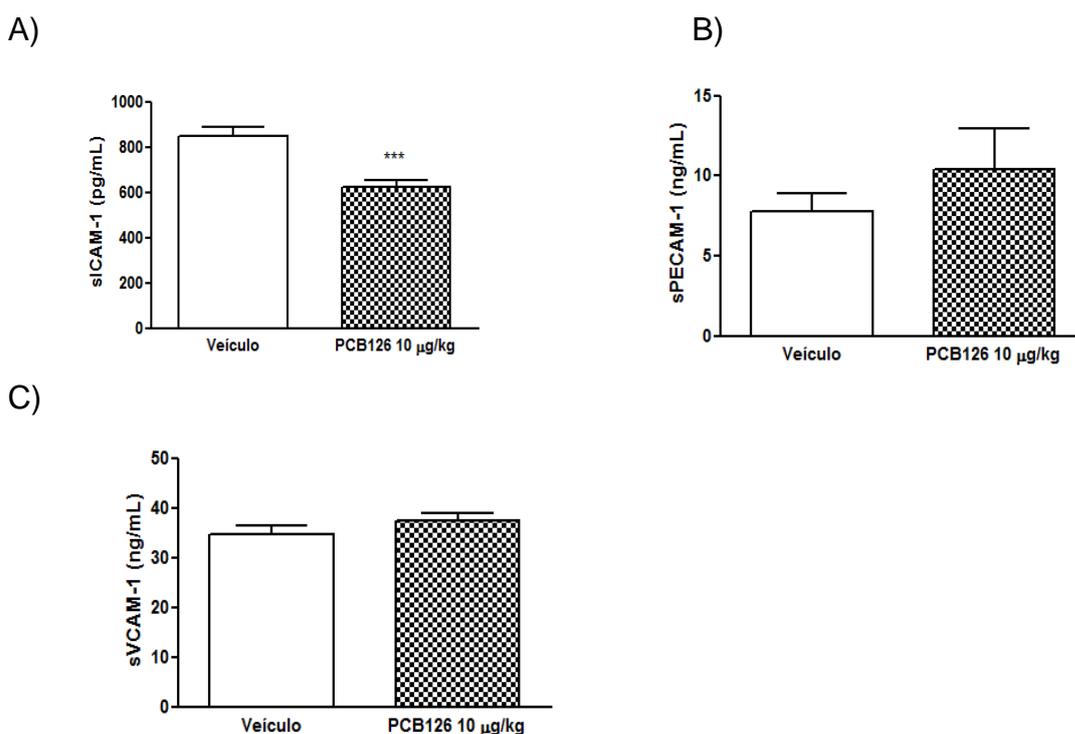


Figura 40: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a expressão das moléculas de adesão solúveis sICAM-1 (A), sPECAM-1 (B) e sVCAM-1 (C) determinada no soro obtido de ratos Wistar machos. Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5 % DMSO). Após coleta do sangue circulante sem anticoagulante, o soro foi isolado, e utilizado para determinação das moléculas de adesão solúveis sICAM-1, sPECAM-1 ou sVCAM-1 pelo método enzimático (ELISA). Os resultados expressam a média \pm e.p.m. da intensidade da fluorescência obtidos de 6 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student não pareado (***) $P < 0,001$ vs. veículo).

4.3.10 Concentração de mediadores pró-inflamatórios no soro

As concentrações de IL-1 β , TNF e IL-6 foram quantificadas no soro dos animais expostos ao PCB126 ou veículo após 15 dias de instilação intranasal. A figura 41 indica que a concentração destes mediadores pró-inflamatórios não estava alterada após exposição ao PCB126 nas três doses utilizadas neste trabalho.

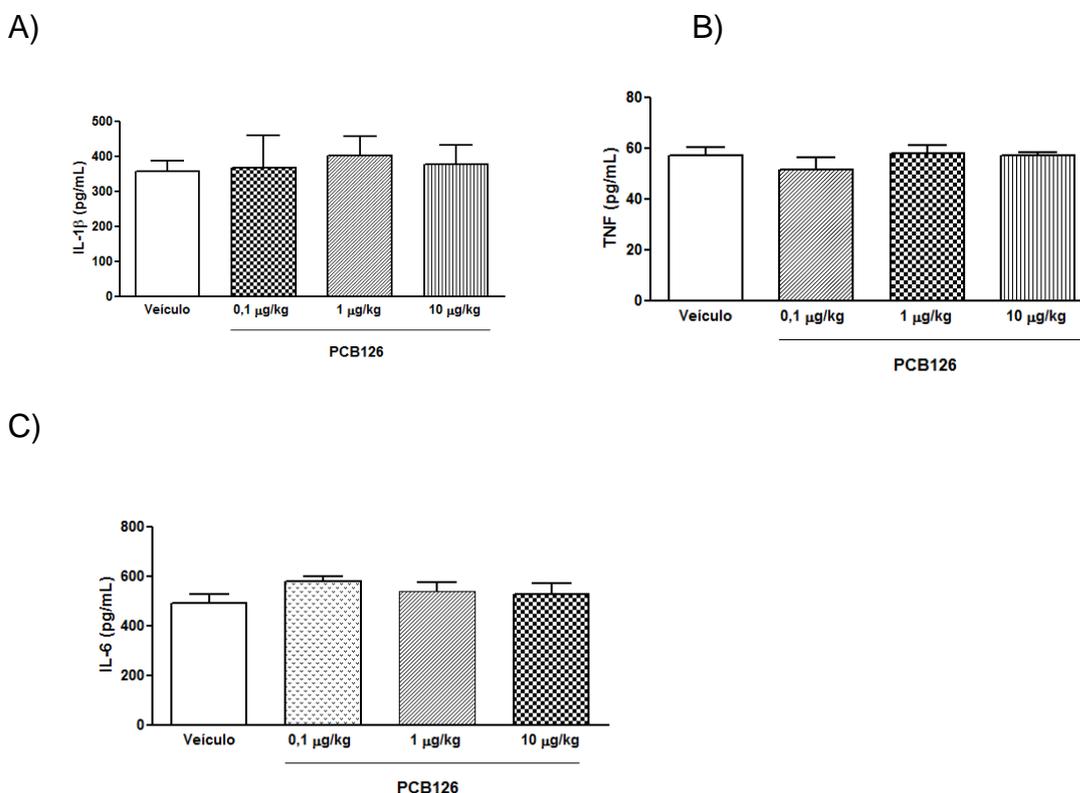


Figura 41: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a concentração de mediadores pró-inflamatórios no soro de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 nas doses de 0,1; 1 ou 10 μ g/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5 % DMSO). Para determinação da concentração de: A) IL-1 β ; B) TNF; e C) IL-6, os animais foram eutanasiados 5 horas após as últimas exposições e o soro foi coletado e armazenado a -80 °C para posterior quantificação por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados expressam a média \pm e.p.m. da concentração dos mediadores pró-inflamatórios no soro de 7-9 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 1 via seguida pelo pós-teste de Tukey.

4.3.11 Concentração de mediadores pró-inflamatórios no homogenato de órgãos

4.3.11.1 Concentração de TNF

A exposição intranasal ao PCB126 durante 15 dias consecutivos não alterou a concentração de TNF quantificada no sobrenadante do homogenato de tecido obtido do macerado do fígado (Figura 42A), pulmão (Figura 42B) e tecido adiposo (Figura 42C) dos animais expostos a doses de 0,1; 1 ou 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de massa corporal. Adicionalmente, vale ressaltar que as concentrações de TNF não foram detectáveis em amostras de homogenato do pâncreas (dados não mostrados).

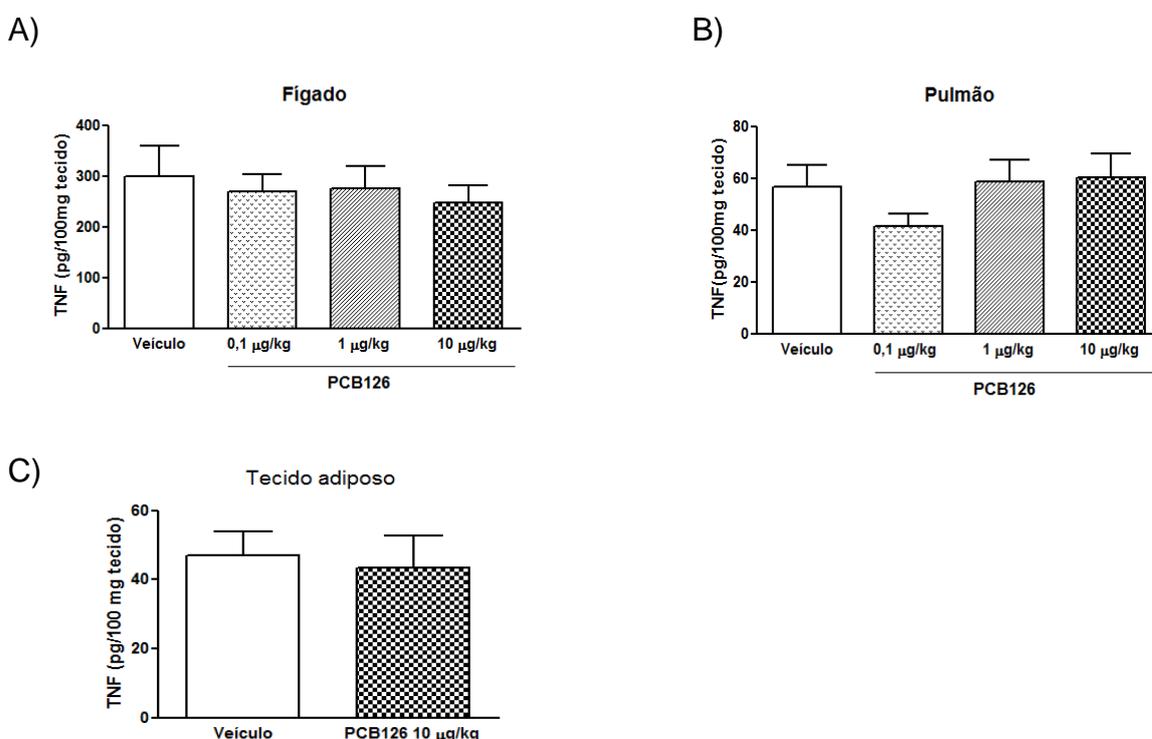


Figura 42: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a concentração de TNF determinado no homogenato do fígado (A), pulmão (B) e tecido adiposo (C) de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 nas doses de 0,1; 1 ou 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5 % DMSO). Para determinação da concentração de TNF no sobrenadante do homogenato de: A) fígado, B) pulmão e C) tecido adiposo, os animais foram eutanasiados 5 horas após as últimas exposições e os tecidos foram coletados, macerados em solução Tris 50 mmol/L (pH 7,4) e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior quantificação por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados expressam a média \pm e.p.m. da concentração de TNF no homogenato dos tecidos de 7 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com o Teste t de Student ou pela análise de variância (ANOVA) de 1 via seguida pelo pós-teste de Tukey.

4.3.11.2 Concentração de IL-6

Na figura 39, podemos observar que a concentração de IL-6 não foi alterada pela exposição inalatória de PCB126 nas três doses utilizadas neste trabalho, comparada ao veículo, quando mensurada no sobrenadante de homogenato de fígado (Figura 43A), pulmão (Figura 43B) ou pâncreas (Figura 43C) obtidos dos animais após 15 dias de exposição. Por outro lado, no tecido adiposo (Figura 43D), a exposição ao PCB126 causou redução na concentração de IL-6.

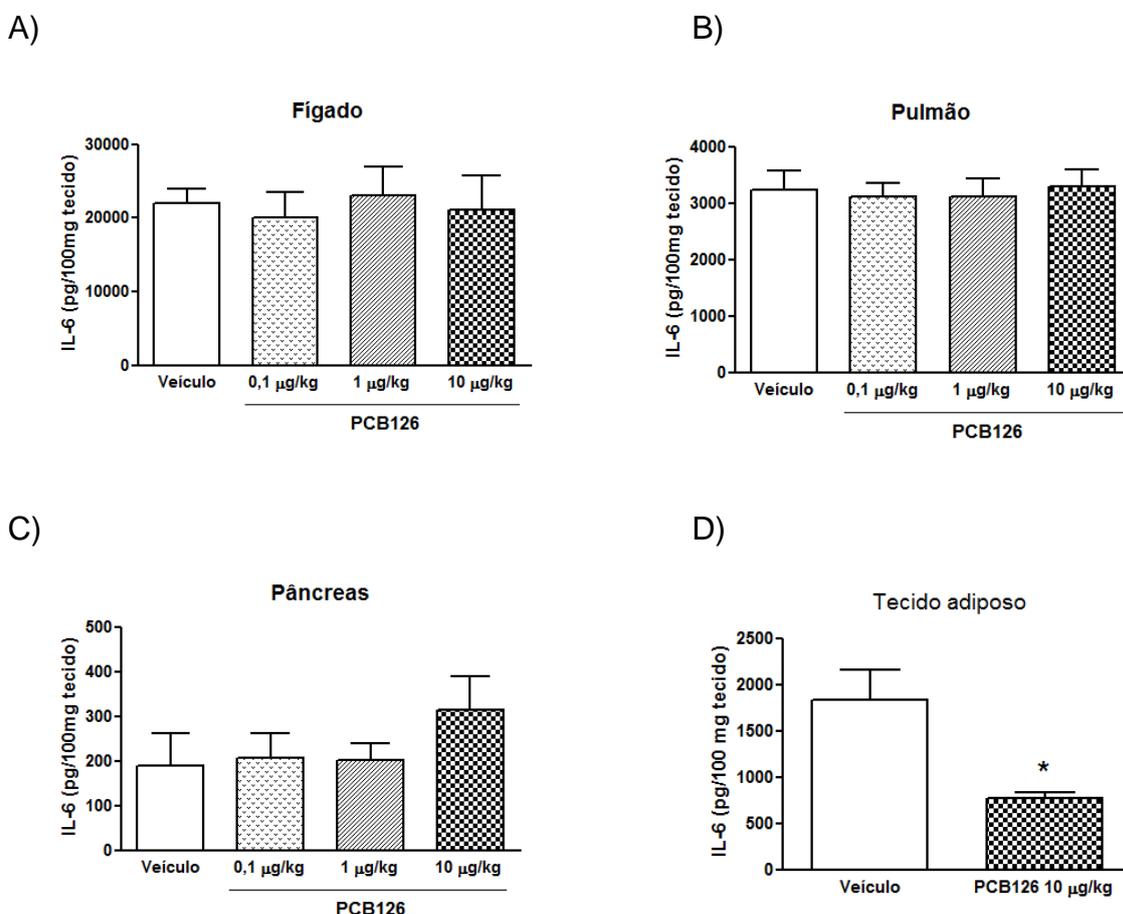


Figura 43: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a concentração de IL-6 determinado no homogenato do fígado (A), pulmão (B), pâncreas (C) e tecido adiposo (D) de ratos Wistar machos. Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 nas doses de 0,1; 1 ou 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5 % DMSO). Para determinação da concentração de IL-6 no sobrenadante do homogenato de: A) fígado, B) pulmão, C) pâncreas e D) tecido adiposo, os animais foram eutanasiados 5 horas após as últimas exposições e os tecidos foram coletados, macerados em solução Tris 50 mmol/L (pH 7,4) e armazenados a -80 °C para posterior quantificação por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração de IL-6 no homogenato de tecidos de 7 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com o Teste t de Student ou pela análise de variância (ANOVA) de 1 via seguida pelo pós-teste de Tukey (*P<0,05 vs. veículo).

4.3.11.3 Concentração de NO_2^-

A concentração de NO_2^- quantificada no sobrenadante do homogenato do fígado (Figura 44A), pulmão (Figura 44B), pâncreas (Figura 44C) e tecido adiposo (Figura 44D) mostrou que a exposição ao PCB126 nas doses de 0,1; 1 ou 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de massa corporal não alterou a concentração do ânion em amostras de fígado, pulmão ou pâncreas. Por outro lado, a concentração de nitrito está diminuída no tecido adiposo dos animais que receberam PCB126 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de massa corporal por instilação intranasal, em relação aos animais que receberam o veículo (Figura 44D).

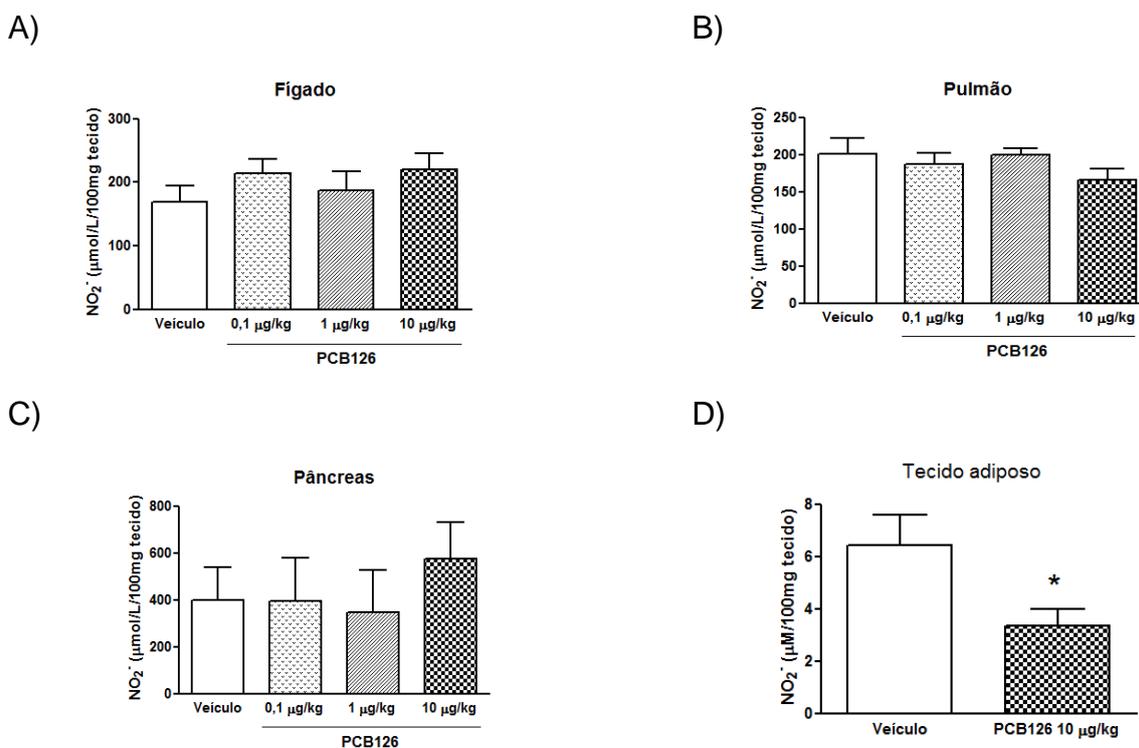
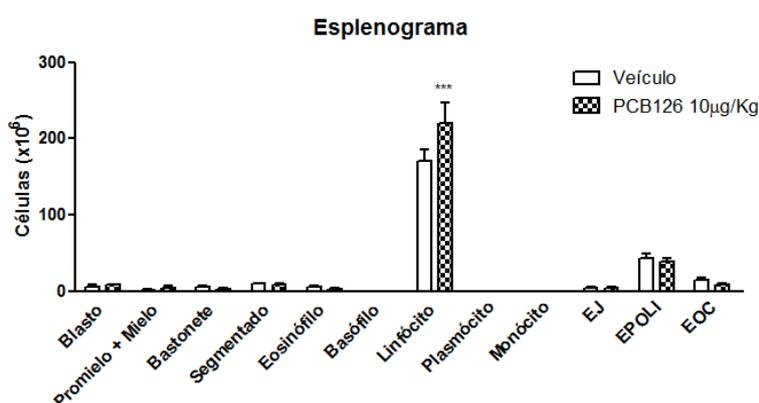


Figura 44: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a concentração de NO_2^- determinado no homogenato do fígado (A), pulmão (B), pâncreas (C) e tecido adiposo (D) de ratos Wistar machos. Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 nas doses de 0,1; 1 ou 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Para determinação da concentração de NO_2^- no sobrenadante do homogenato de: A) fígado, B) pulmão, C) pâncreas e D) tecido adiposo, os animais foram eutanasiados 5 horas após as últimas exposições e os tecidos foram coletados, macerados em solução Tris 50 mmol/L (pH 7,4) e armazenados a -80°C para posterior quantificação por Reação de Griess. Os resultados expressam a média \pm e.p.m. da concentração de NO_2^- no homogenato de tecidos de 7 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com o Teste t de Student ou pela análise de variância (ANOVA) de 1 via seguida pelo pós-teste de Tukey (* $P < 0,05$ vs. veículo).

4.3.12 Células do baço

Após a eutanásia dos animais, o baço foi removido e o número diferencial a quantificação do tipo celular, em esfregaços de células obtidas utilizando centrífuga citológica (Figura 45A). Ainda, 1×10^5 células foram incubadas *in vitro* com os estímulos concanavalina A ou LPS e a capacidade de proliferação destas células foi avaliada em espectrofotômetro. Os dois estímulos utilizados aumentaram a proliferação das células do baço *in vitro*. Por outro lado, a exposição ao PCB126 *in vivo* não alterou a capacidade proliferativa destas células em condições basais ou frente a ConA ou LPS, *in vitro* (Figura 45B).

A)



B)

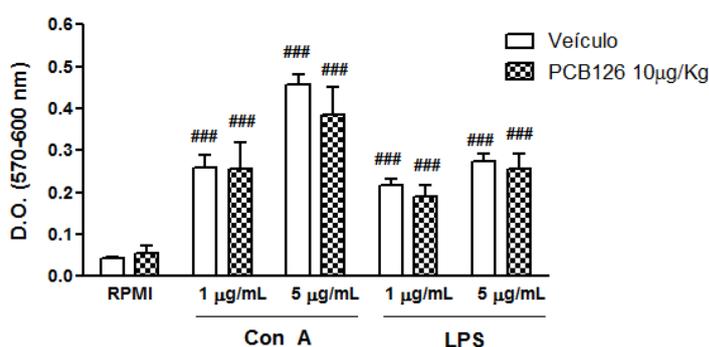


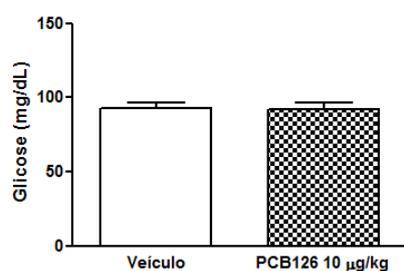
Figura 45: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre as células do baço de ratos Wistar machos. Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5 % DMSO). Para determinação da proliferação das células do baço, 5 horas após as últimas exposições, os animais foram eutanasiados para coleta do baço. A) Contagem diferencial das células do baço; B) Após isolamento, as células obtidas foram incubadas *in vitro* com con A ou LPS, para se avaliar a capacidade proliferativa. Os resultados expressam a média ± e.p.m. obtidos de 6 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 2 vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni (***) $P < 0,001$ vs. veículo; ### $P < 0,001$ vs. #respectivo controle RPMI).

4.4 Caracterização do diabetes

4.4.1 Concentração de glicose sérica

A glicemia basal após privação alimentar de 5 horas foi quantificada no soro dos animais expostos ao PCB126 ou veículo. A exposição ao PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal não alterou a concentração de glicose sanguínea dos animais após 15 dias de exposição por instilação intranasal, em relação aos animais que foram expostos ao veículo pela mesma via (Figura 46A). Adicionalmente, um grupo de animais exposto ao PCB126 ou veículo por 45 dias também não apresentou alteração nos níveis de glicose sanguínea, monitorado a cada dois dias (Figura 46B).

A)



B)

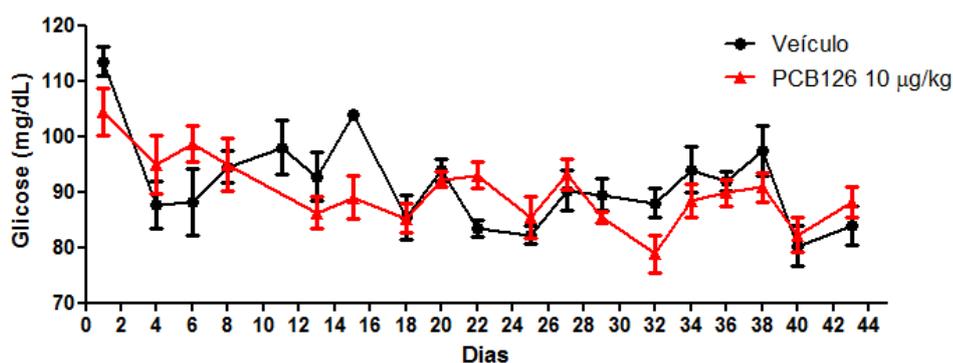


Figura 46: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a concentração de glicose sérica medida no sangue total de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias (A) ou 45 dias (B) por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Antes de cada exposição, os animais tiveram uma gota de sangue retirada da cauda e a glicemia foi quantificada em glicosímetro. Os animais expostos por 45 dias foram monitorados a cada dois dias de exposição. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração de glicose no sangue obtido de 7-10 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student não pareado.

4.4.2 Concentração de insulina sérica

A concentração de insulina encontrada no soro de animais expostos ao PCB126 foi maior que a insulina encontrada nos animais que receberam o veículo, decorridos 15 dias de exposição (Figura 47).

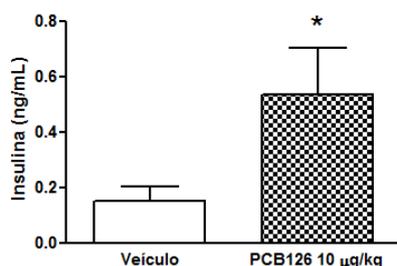


Figura 47: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a concentração de insulina sérica quantificada no soro de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Para a determinação da concentração de insulina, o soro dos animais foi obtido pela coleta do sangue circulante dos animais expostos sem anticoagulante e armazenado a -80 °C para posterior quantificação por técnica imunoenzimática. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração de insulina no soro obtidos de 7-10 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student não pareado (* $P < 0,05$ vs. *veículo*).

4.4.3 Concentração de leptina sérica

A concentração de leptina foi determinada no soro dos animais expostos ao PCB126 ou veículo (Figura 48). Os dados obtidos mostram que não houve diferença na concentração de leptina encontrada nos animais expostos ao PCB126 em comparação aos animais que receberam o veículo.

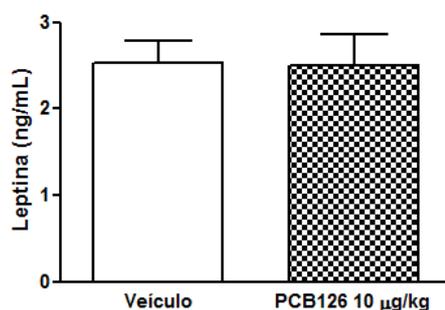


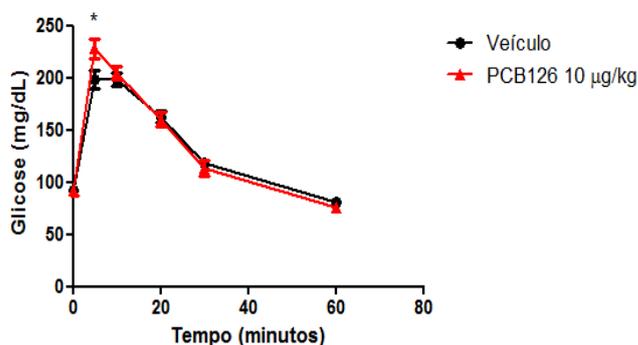
Figura 48: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a concentração de leptina sérica determinado no soro de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração de leptina no soro obtidos de 7-10 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student não pareado.

4.4.4 Teste de tolerância à glicose endovenosa

No teste de tolerância à glicose endovenosa, os animais sofreram privação alimentar por 5 horas e tiveram a glicemia basal (T0) quantificada por meio de glicosímetro. Após a sobrecarga de glicose (375 mg/mL, via endovenosa), o pico máximo de glicemia ocorreu após 5 minutos (T5), com um declínio nas concentrações sanguíneas após este tempo. Não houve alteração entre a glicemia dos animais expostos ao PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal e o veículo quando observamos a análise estatística da área sob a curva (Figura 49B). Por outro lado, na figura 49A, podemos perceber que após 5 minutos da injeção de glicose (T5), o aumento da concentração de glicose dos animais expostos ao PCB126 é maior que dos animais expostos ao veículo.

A)



B)

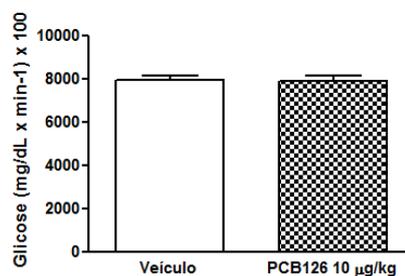


Figura 49: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a curva glicêmica após teste de tolerância à glicose realizado em ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Para quantificação da curva glicêmica, após 5 horas de privação alimentar, os animais tiveram a glicemia basal (T0) quantificada, utilizando glicosímetro. Após sobrecarga de glicose pela injeção intravenosa de glicose 375 mg/mL, a glicemia do animal foi acompanhada nos tempos 5, 10, 20, 30 e 60 minutos. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da glicemia em cada ponto obtidos de 7-10 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student não pareado (* $P < 0,05$ vs. veículo).

4.4.5 Teste de tolerância à insulina endovenosa

No teste de tolerância à insulina endovenosa, os animais sofreram privação alimentar por 5 horas e tiveram a glicemia basal (T0) quantificada por meio de glicosímetro. Após receber a dose de insulina, quantificamos o declínio da concentração de glicose sanguínea nos tempos 4, 8, 12 e 16 minutos (Figura 50A). A exposição ao PCB126 diminuiu a constante de decaimento da concentração de glicose sanguínea (KITT), como podemos observar na análise estatística na figura 50B.

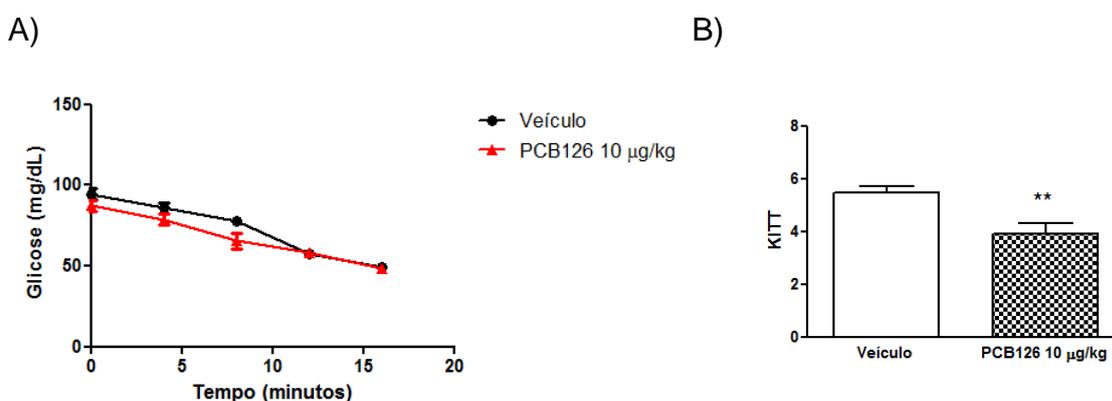


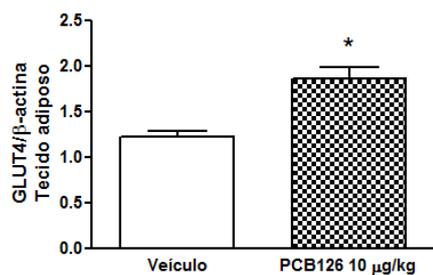
Figura 50: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a curva glicêmica após teste de tolerância à insulina realizado em ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Para quantificação da curva glicêmica, após 5 horas de privação alimentar, os animais tiveram a glicemia basal (T0) quantificada utilizando glicosímetro. Após dose de insulina pela injeção intravenosa de insulina regular (0,75 U/kg de massa corporal), a glicemia do animal foi acompanhada nos tempos 4, 8, 12 e 16 minutos. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da glicemia em cada ponto obtidos de 7-10 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student não pareado (** $P < 0,01$ vs. veículo).

4.4.6 Expressão de GLUT4 em tecidos insulino-dependentes

A expressão do receptor de glicose foi quantificada por Western Blot em amostras de tecido adiposo e tecido muscular de animais expostos ao veículo ou ao PCB126. A figura 51A representa a expressão do receptor em tecido adiposo, onde o GLUT4 apresenta-se aumentado em amostras de animais expostos ao PCB126. Por outro lado, não houve diferença na expressão do GLUT4 em amostras de músculo gastrocnêmico (Figura 51B) de animais expostos ao poluente ou ao veículo.

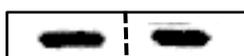
A)



GLUT4 (54 kDa)



β-ACTINA (42 kDa)



B)

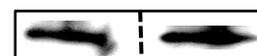
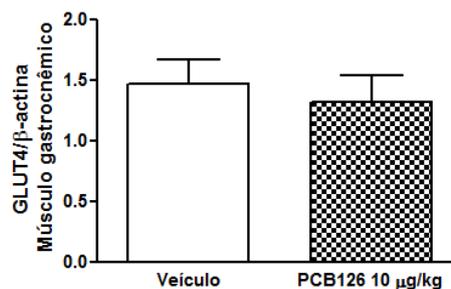


Figura 51: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a expressão de GLUT4 determinado no tecido adiposo (A) e tecido muscular (B) de ratos Wistar machos.

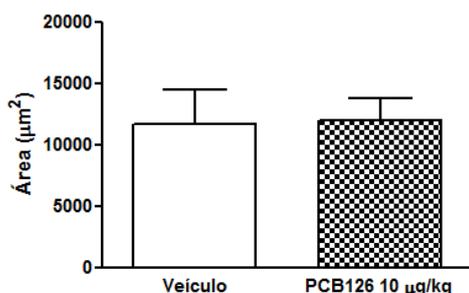
Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Após 5 horas das últimas exposições, os animais foram anestesiados e o tecido adiposo (A) ou o músculo gastrocnêmico (B) foram coletados para análise posterior da expressão do transportador GLUT4 por Western Blot. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da expressão de GLUT4/β-actina de tecidos obtidos de 6 animais em cada grupo (n=6). A análise estatística foi realizada de acordo com o Teste t de Student não pareado (** $P < 0,01$ vs. *veículo*).

4.4.7 Ilhotas pancreáticas

4.4.7.1 Análise morfológica das ilhotas de Langerhans

No pâncreas dos animais expostos ao veículo ou PCB126 foi avaliada a área das ilhotas de Langerhans (Figura 52A). Não houve diferença significativa na área total ocupada pelas ilhotas pancreáticas dos animais expostos ao PCB126 em relação a área das ilhotas no pâncreas dos animais expostos ao veículo. Na figura 52B, podemos observar uma foto representativa do resultado encontrado, de uma lâmina de pâncreas corada por HE.

A)



B)

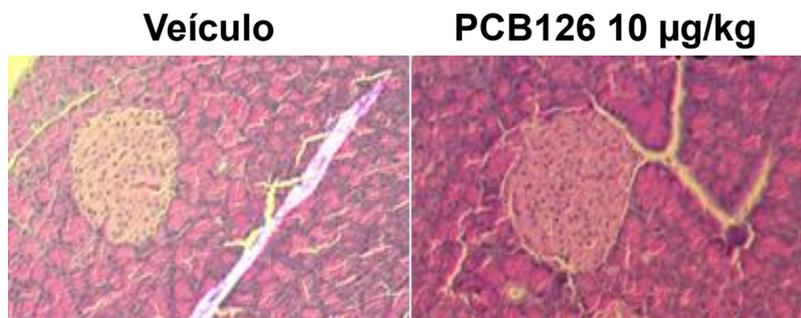


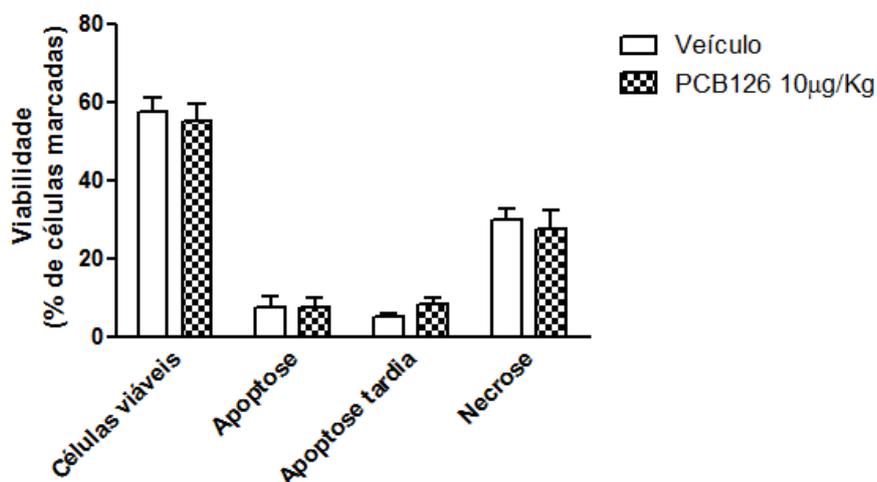
Figura 52: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a área das ilhotas de Langerhans do pâncreas de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). A) Para quantificação da área ocupada pelas ilhotas de Langerhans no pâncreas dos animais, após 5 horas da última exposição, o pâncreas foi removido e mantido em solução de formol a 10% por 24 horas. Após este período, o tecido foi mantido em etanol a 70% até a confecção de lâminas histológicas, coradas por HE e analisadas por microscopia óptica. B) Figura representativa de uma ilhota de Langerhans de animais expostos ao veículo ou PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal, em aumento de 10 vezes. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da área ocupada pelas ilhotas de Langerhans, analisadas em lâminas histológicas de pâncreas, obtidos de 6 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com o Teste t de Student não pareado.

4.4.7.2 Avaliação da viabilidade e ciclo celular nas ilhotas de Langerhans

A exposição ao PCB126 não causou alterações na viabilidade das células isoladas das ilhotas de Langerhans (Figura 53A), no ciclo celular (Figura 53B), ou ainda, na fragmentação do DNA (resultados não mostrados).

A)



B)

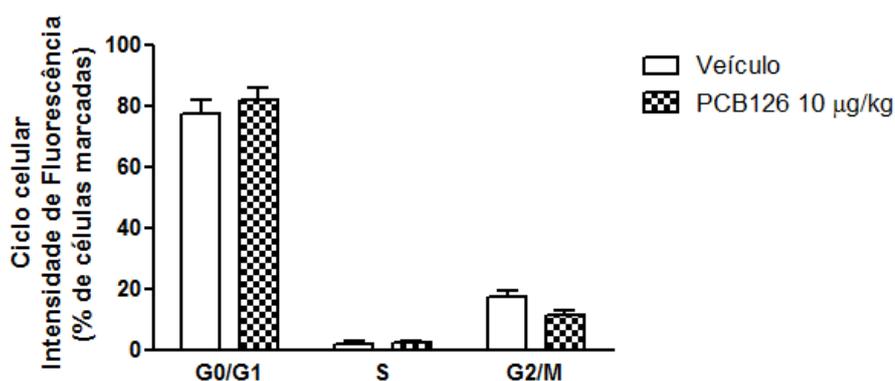


Figura 53: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a viabilidade (A) e ciclo celular (B) de ilhotas de Langerhans isoladas de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Após 5 horas das últimas exposições, as ilhotas de Langerhans foram isoladas e lisadas para avaliação da viabilidade celular (A) e ciclo celular (B) por citometria de fluxo, mensurando a % de células marcadas com anexina V e PI. A análise foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II e a quantificação das mesmas pelo aplicativo FlowJo. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da média da intensidade da fluorescência obtidos de 6 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de 2 vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

4.4.7.3 Avaliação do estresse oxidativo nas ilhotas de Langerhans

Após o período de exposição ao PCB126 ou veículo, as ilhotas de Langerhans foram isoladas e incubadas *in vitro* com DCFH-DA (Figura 50) ou DHE (Figura 54), para avaliar o estresse oxidativo gerado pela exposição. A dose de 10 µg/kg de massa corporal de PCB126 aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio (Figura 54A), mas não a geração do ânion superóxido nas ilhotas, demonstrada na Figura 55A. As figuras 54B e 55B indicam imagens representativas das ilhotas de animais expostos ao veículo ou PCB126, obtidas por microscopia de fluorescência.

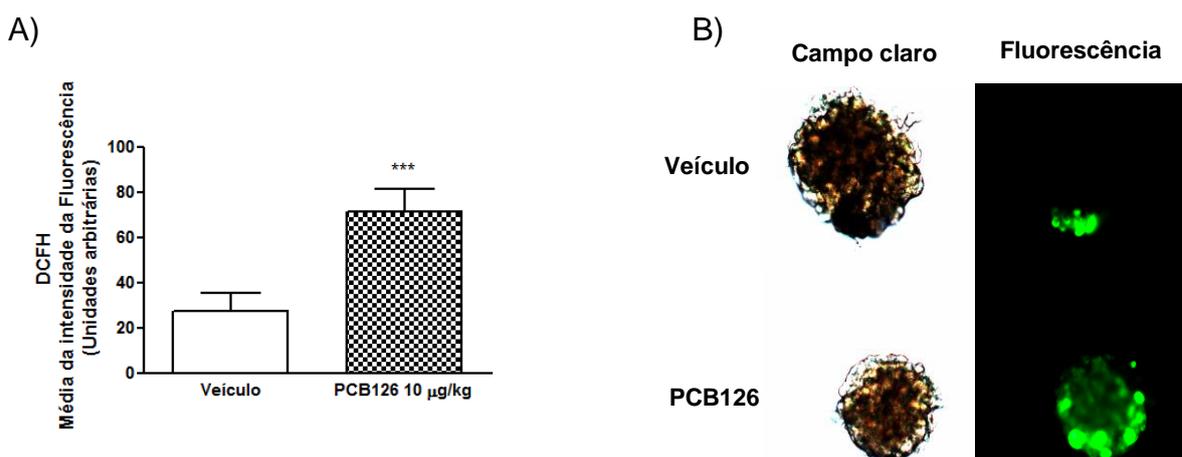


Figura 54: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a geração de espécies reativas de oxigênio pelas ilhotas de Langerhans obtidas do pâncreas de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). A) Para quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio pelas ilhotas de Langerhans, após 5 horas da última exposição, as ilhotas foram isoladas e incubadas *in vitro* com DCFH-DA 30 µmol/L por 30 minutos, a 37 °C. Após o período de incubação, a intensidade de fluorescência foi visualizada em microscópio de fluorescência; B) Imagem representativa de uma ilhota pancreática visualizada em microscópio de fluorescência. Os resultados representam a média ± e.p.m. da intensidade de fluorescência (expresso em unidades arbitrárias) das ilhotas de animais isoladas do pâncreas obtidos de 4 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com o Teste t de Student não pareado (***) $P < 0,001$ vs. veículo).

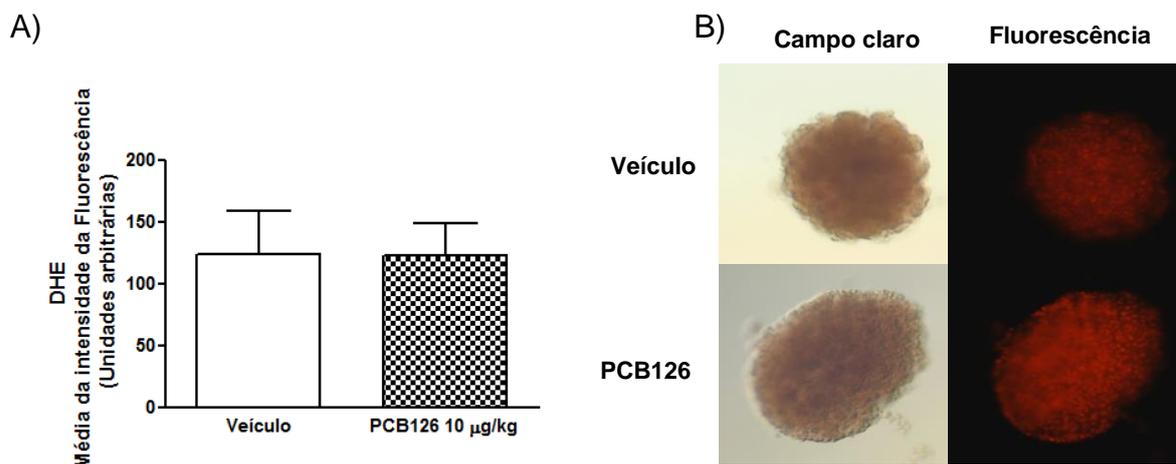


Figura 55: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a geração de ânion superóxido pelas ilhotas de Langerhans obtidas do pâncreas de ratos Wistar machos.

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). A) Para quantificação da produção de ânion superóxido pelas ilhotas de Langerhans, após 5 horas da última exposição, as ilhotas foram isoladas e incubadas *in vitro* com DHE 10 µmol/L por 30 minutos, a 37 °C. Após o período de incubação, a intensidade de fluorescência das ilhotas foi visualizada em microscópio de fluorescência; B) Imagem representativa de uma ilhota pancreática visualizada em microscópio de fluorescência. Os resultados representam a média ± e.p.m. da intensidade de fluorescência (expresso em unidades arbitrárias) das ilhotas de animais isoladas do pâncreas obtidos de 4 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com o Teste t de Student não pareado.

4.4.7.4 Quantificação de mediadores inflamatórios em sobrenadante de cultura de ilhotas de Langerhans

Adicionalmente, realizamos a quantificação da concentração de mediadores em sobrenadante de cultura de ilhotas de Langerhans. Os dados encontrados indicam que os animais expostos ao PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corpórea produziram maior quantidade de NO₂⁻ (Figura 56) e IL-6 (Figura 57) em comparação com as ilhotas de Langerhans obtidas de animais expostos ao veículo, quando presente em meio de cultura contendo alta concentração de glicose (16,7 mmol/L).

Por outro lado, não houve alteração na concentração de insulina detectável no sobrenadante de cultura de ilhotas após exposição ao PCB126 em comparação às ilhotas de animais que receberam o veículo (Figura 58). Vale ressaltar ainda, que a concentração de TNF não foi detectável nas amostras sobrenadante de cultura de ilhotas pancreáticas.

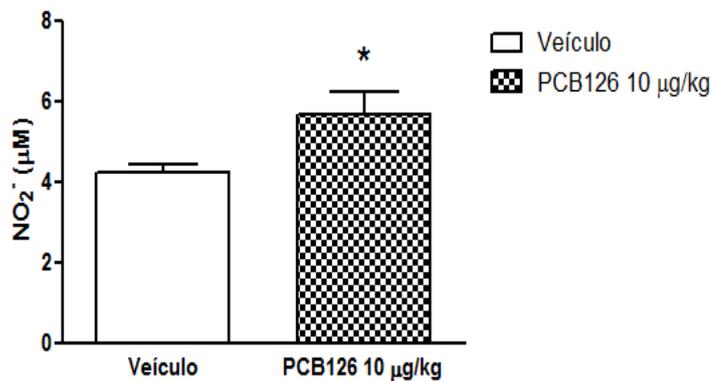


Figura 56: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a concentração de NO₂⁻ produzidas pelas ilhotas de Langerhans, obtidas do pâncreas de ratos Wistar machos, estimuladas por meio de cultura com alta concentração de glicose (16,7 mmol/L).

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Para determinação da concentração de NO₂⁻ no sobrenadante de cultura de ilhotas de Langerhans, os animais foram anestesiados com pentobarbital de sódio, eutanasiados 5 horas após as últimas exposições e as ilhotas de Langerhans foram coletadas e incubadas a 37 °C, em estufa contendo 5% de CO₂, por 24 horas, em meio de cultura RPMI com alta concentração de glicose (16,7 mmol/L). O sobrenadante da cultura foi coletado para posterior quantificação de NO₂⁻ por reação de Griess. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração de NO₂⁻ no sobrenadante de cultura de ilhotas coletado de 7 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com o Teste t de Student não pareado (**P*<0,05 vs. veículo).

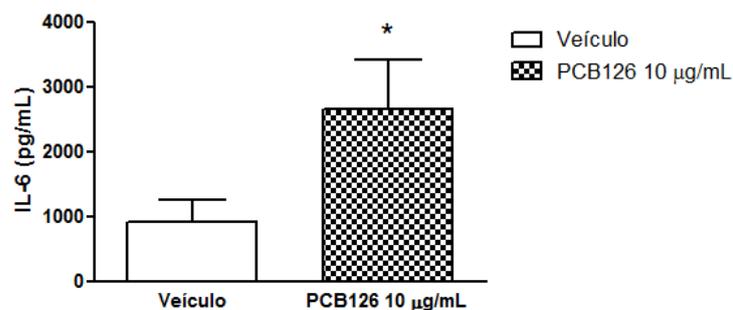


Figura 57: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a concentração de IL-6 produzida pelas ilhotas de Langerhans, obtidas do pâncreas de ratos Wistar machos, estimuladas por meio de cultura com alta concentração de glicose (16,7 mmol/L).

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Para determinação da concentração de IL-6 no sobrenadante de cultura de ilhotas de Langerhans, os animais foram anestesiados com pentobarbital de sódio, eutanasiados 5 horas após as últimas exposições e as ilhotas de Langerhans foram coletadas e incubadas a 37 °C, em estufa contendo 5% de CO₂, por 24 horas, em meio de cultura RPMI com alta concentração de glicose (16,7 mmol/L). O sobrenadante da cultura foi coletado para posterior quantificação de IL-6 por reação de imunoenzimática (ELISA). Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração de IL-6 no sobrenadante de cultura de ilhotas coletado de 7 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com o Teste t de Student não pareado (**P*<0,05 vs. veículo).

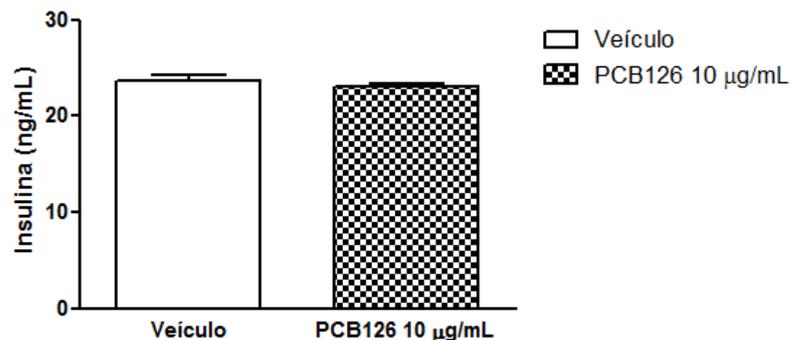


Figura 58: Efeito da exposição *in vivo* ao PCB126 ou ao veículo sobre a concentração de insulina produzida pelas ilhotas de Langerhans, obtidas do pâncreas de ratos Wistar machos, estimuladas por meio de cultura com alta concentração de glicose (16,7 mmol/L).

Os animais foram expostos durante 15 dias por instilação intranasal, uma vez ao dia, a uma solução de PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corporal. Animais controles receberam pela mesma via a solução veículo do PCB126 (solução fisiológica + 0,5% DMSO). Para determinação da concentração de insulina no sobrenadante de cultura de ilhotas de Langerhans, os animais foram anestesiados com pentobarbital de sódio, eutanasiados 5 horas após as últimas exposições e as ilhotas de Langerhans foram coletadas e incubadas a 37 °C, em estufa contendo 5% de CO₂, por 24 horas, em meio de cultura RPMI com alta concentração de glicose (16,7 mmol/L). O sobrenadante da cultura foi coletado para posterior quantificação de insulina por reação imunoenzimática. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração de insulina no sobrenadante de ilhotas coletadas de 7 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada de acordo com o Teste t de Student não pareado.

5 Discussão

Os efeitos deletérios à saúde causados pela exposição aos poluentes ambientais têm ganhado destaque na literatura nos últimos anos. Nesse sentido, vários relatos têm demonstrado correlação positiva entre exposição aos POPs e o desenvolvimento de doenças metabólicas, como o DM, porém, em estudos eminentemente epidemiológicos (AIRAKSINEN *et al.*, 2011; EVERETT; THOMPSON, 2012; JAACKS; STAIMEZ 2015; JONES *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2014; RIGNELL-HYDBOM *et al.*, 2007a, 2009b; SCHELL *et al.*, 2010; SILVERSTONE *et al.*, 2012; TAYLOR *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2013). Entre estes poluentes, os PCBs têm recebido grande atenção, uma vez que foram amplamente empregados pela indústria em uma variedade de equipamentos e produtos, como também em praguicidas, devido às suas excelentes propriedades físico-químicas (CASTRO-JIMÉNEZ, GONZALES, 2011; ERICKSON; KALEY, 2011). Recentemente, a importância da exposição ambiental aos PCBs pela via inalatória vem sendo discutida como sendo tão relevante quanto a exposição ocupacional (FREDERIKSEN *et al.*, 2012; FITZGERALD *et al.*, 2007; HARRAD *et al.*, 2009; ONO *et al.*, 2012), uma vez que as concentrações encontradas desses poluentes em ambientes fechados têm sido superiores às obtidas em ambientes abertos (ANNAMALAI; NAMASIVAYAM 2015; HU *et al.*, 2010; HULIN *et al.*, 2012; ROBERTSON; LUDEWIG, 2011; WHO, 2003). Desta forma, a literatura tem relatado um aumento dos estudos dos efeitos deletérios dos PCBs presentes no ar, em especial, pela relação da sua exposição e a incidência de doenças metabólicas (ANNAMALAI; NAMASIVAYAM 2015; LANGER, 2010; LEE *et al.*, 2011; PERSKY *et al.*, 2012). Além disso, a diversidade de POPs no meio ambiente leva a exposições distintas e os indicadores de efeitos mais comumente empregados para caracterizar a exposição, como a indução das enzimas CYPs no fígado, podem apresentar variabilidades importantes (DHAKAL *et al.*, 2013; LAUBY-SECRETAN *et al.*, 2013; VAN DUURSEN *et al.*, 2005). Por isso, a identificação de biomarcadores de exposição, de efeito ou de susceptibilidade é importante para a estimativa da exposição aos PCBs por esta via.

Com base na descrição acima, foi de interesse do nosso grupo de pesquisa investigar os efeitos desencadeados pela exposição intranasal ao PCB126, tais como, alterações metabólicas e inflamatórias, e se estas poderiam estar associadas ao início do desenvolvimento do diabetes mellitus. Para tanto, foi estabelecido como modelo de exposição ambiental, o período de quinze dias de exposição, uma vez ao

dia, nas doses de 0,1; 1 ou 10 µg/kg de massa corporal. A escolha das doses de PCB126 foi baseada em trabalhos da literatura que utilizam doses semelhantes de outros congêneres de PCBs, para estudos por via oral (KOPEC *et al.*, 2010; MARTIN; KLAASSEN, 2010; ZHENG *et al.*, 2011). Ressaltamos que, poucos são os estudos experimentais que relatam os efeitos da exposição aos PCBs por via inalatória, e os descritos na literatura (CASEY *et al.*, 1999; DHAKAL *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2010, 2012) empregam doses maiores que as utilizadas neste trabalho.

Uma vez que os dados da literatura são controversos quanto aos efeitos da exposição aos PCBs, já que os protocolos de exposição utilizam em sua maioria misturas de congêneres, variando o tempo e as vias de exposição, o primeiro passo do presente trabalho foi caracterizar o protocolo de exposição utilizado. Para tanto, quantificamos a presença de PCB126 e a expressão de AhR em diferentes tecidos. Os resultados obtidos mostraram que o indicador de exposição está presente em amostras de fígado e pulmão de animais expostos, mas não no soro (dados não mostrados), sugerindo que a exposição ao PCB126 realizada neste protocolo é de baixa intensidade. Adicionalmente, a mensuração do receptor AhR confirmou a eficiência do protocolo de exposição estabelecido neste trabalho, já que sua expressão foi significativamente aumentada em diferentes tecidos, em especial no rim e no fígado (Figura 8). Vale ressaltar que a análise da expressão do receptor AhR é uma das estratégias utilizadas pela literatura para demonstrar a exposição aos PCBs, em diferentes modelos experimentais (CALÒ *et al.*, 2014; WOJTOWICZ *et al.*, 2005).

Em conjunto, os dados apresentados mostram que a exposição ao PCB126 aqui realizada, pode ser de fraca intensidade e por período de tempo curto, mas suficiente para causar toxicidade, avaliada por diferentes estratégias descritas a seguir. Para tanto, a partir deste ponto, a discussão encontra-se dividida em três subitens, para facilitar a compreensão do leitor.

5.1 Alterações metabólicas causadas pela exposição ao PCB126

Um importante parâmetro na avaliação da toxicidade dos POPs é a massa corporal. Embora haja divergências importantes nos dados apresentados na literatura, sugerindo aumento ou redução da massa corporal, é evidente notar que as discrepâncias estão associadas a diferentes protocolos de exposição, em especial quanto ao tempo (ARIYOSHI *et al.*, 1998; CHU *et al.*, 1994). No entanto,

estudos epidemiológicos mostram que a exposição crônica humana a baixas concentrações de PCBs com poucas substituições cloradas está associada à presença ou ao desenvolvimento de obesidade abdominal e ao aumento de tecido adiposo visceral ou subcutâneo (DIRINCK *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2012; RÖNN *et al.*, 2011; ROOS *et al.*, 2013). Em condições de exposição ao PCB126 utilizadas neste trabalho, na dose de 10 µg/kg de massa corporal, observou-se aumento do ganho de massa corpórea do início ao final do protocolo experimental, sem alteração no padrão de consumo de água e ração, monitorados diariamente, e, ao contrário do esperado, observou-se redução de massa do tecido adiposo, mais especificamente das gorduras retroperitoneal e periepídimal. Estes resultados, em conjunto, sugerem claramente que a exposição ao PCB126 causa importantes alterações da homeostasia. Neste sentido, podemos supor que o aumento da massa corporal possa ser decorrente de um edema generalizado, causado por um processo inflamatório sistêmico ou por disfunção hepática e/ou renal. No entanto, a inflamação sistêmica parecer não ser o mecanismo mais plausível, uma vez que os níveis plasmáticos de mediadores pró-inflamatórios não foram alterados pela exposição ao PCB126 (Figura 37). No entanto, a alteração destes parâmetros pode não ser detectada em condições subclínicas de inflamação (HOTAMISLIGIL, 2006; HU *et al.*, 2015). Por outro lado, o fato da indução da expressão de AhR ser altamente expressiva no rim de animais expostos ao PCB126, sugerindo que este pode ser um tecido alvo de toxicidade, associado ao aumento de creatinina sérica (Figura 11), nos leva a supor que possa estar havendo retenção líquida por disfunção renal. De fato, dados da literatura mostram que a exposição *in vivo* ao TCDD ou misturas de PCBs levam à nefrotoxicidade, evidenciada pelo aumento de creatina sérica, de uréia, da expressão de CYPs e do estresse oxidativo no rim (LU *et al.*, 2009).

Quanto à massa dos órgãos internos, detectou-se somente aumento da massa úmida, mas não da massa seca do fígado. Não foi observada alteração da massa de outros órgãos como rim, baço, pulmão e fêmur. Estes dados não corroboram os encontrados na literatura, que mostram aumento da massa destes e de outros órgãos após exposição ao PCB126, utilizando concentrações, tempos e vias de exposições diferentes das utilizadas no presente trabalho (CHU *et al.*, 1994; LIND *et al.*, 2004).

A literatura mostra que o fígado é um tecido-alvo na intoxicação por PCBs, o que é confirmado pelo aumento da expressão de AhR e de enzimas de

biotransformação, bem como por lesão hepática (NTP, 2006; OVANDO *et al.*, 2006). A atividade das enzimas hepáticas exerce um importante papel como marcadores de alteração da homeostasia e como marcadores de exposição à xenobióticos, como, por exemplo, o gama GT (LEE. JACOBS, 2009), que estava aumentado nos animais expostos ao PCB126, corroborando dado recente da literatura que encontrou aumento do gama GT sérico em pacientes com altos níveis de PCBs no soro (SERDAR *et al.*, 2014).

As demais enzimas de função hepática não foram alteradas, mas, por outro lado vale ressaltar que no estudo realizado por Zheng e colaboradores (2011), camundongos foram expostos ao PCB126 nas doses de 0,3; 3; 15 ou 30 µg/kg de massa corporal, por via oral, por dois dias, e também não foi observada alteração na atividade de ALT, mas sim, aumento da massa do fígado, da massa corporal e do perfil lipídico, semelhante aos nossos resultados. De fato, aliado ao aumento da massa, detectamos alterações no perfil lipídico, caracterizado por aumento do colesterol total, HDL e VLDL no soro dos animais. Estas alterações parecem ser relevantes com relação à toxicidade causada pelo PCB126, uma vez que são comuns aos demais protocolos de exposição aos PCBs (CHU *et al.*, 1994; LIND *et al.*, 2004; SHEN *et al.*, 2012; ZHENG *et al.*, 2011).

Embora o HDL colesterol seja conhecido como o “colesterol bom”, devido a sua descrição como protetor contra doenças coronarianas e aterosclerose, recentemente alguns estudos têm demonstrado que o aumento dos níveis do HDL colesterol em certas condições clínicas específicas não é mais visto como benéfico, uma vez que promove efeitos vasculares deletérios, tais como, disfunção endotelial e ativação endotelial próinflamatória (RODRIGUES *et al.*, 2014), condições que podem levar ao desenvolvimento de doenças ateroscleróticas em pacientes portadores de doença renal crônica, por exemplo (SPEER *et al.*, 2013). Desta forma, passa a ser importante avaliar não só os níveis de HDL colesterol no organismo, mas também a função desta fração lipídica (PEARSON, 2006; SPEER *et al.*, 2013). Assim, com base em dados epidemiológicos humanos, os efeitos observados no metabolismo do colesterol pela exposição aos PCBs podem ser responsáveis por sérios efeitos cardiovasculares (GONCHAROV *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2011; LIND *et al.*, 2004).

Adicionalmente, houve aumento nos níveis de triglicerídeos no soro, e embora estudos epidemiológicos correlacionem altos níveis de triglicerídeos à exposição aos

PCBs (GONCHAROV *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2011; PATEL *et al.*, 2012; PELCLOVA *et al.*, 2001), os dados experimentais são controversos na literatura (LIND *et al.*, 2004). Em estudos epidemiológicos e genéticos foi evidenciado que o aumento dos triglicerídeos, do colesterol ou das lipoproteínas ricas em triglicerídeos pode ser considerado causa adicional de doença cardiovascular e aterosclerose. Por outro lado, estudos conclusivos devem ser realizados para confirmar o benefício da redução do risco de doenças cardiovasculares com a redução dos níveis de triglicerídeos (KOHAN *et al.*, 2015; MILLER *et al.*, 2011; NORDESTGAARD; VARBO, 2014). Consequentemente, os altos níveis de triglicerídeos encontrados reforçam as importantes alterações na homeostasia observadas nos animais expostos ao PCB126.

Um dado interessante encontrado no presente trabalho foi a redução na massa do coração em animais expostos à maior dose do PCB126. De fato, Jokinen e colaboradores (2003) observaram cardiomiopatia e arterite em animais expostos ao PCB126, por via oral, na dose de 1 µg/kg/dia, durante dois anos, e sugeriram que o coração é um órgão-alvo da exposição a este agente químico. Dando embasamento a esta hipótese, relembramos que houve alteração no perfil lipídico em nosso modelo experimental e que o aumento do colesterol e triglicerídeos é fator de risco importante para doenças cardiovasculares, como descrito acima (KOHAN *et al.*, 2015; NORDESTGAARD; VARBO, 2014). Dessa forma, a exposição ao PCB126 leva a alterações metabólicas importantes que podem funcionar, por exemplo, como marcadores de doença ou de exposição.

5.2 Redução da resposta de leucócitos à ativação de GPCR

O sistema imune é extremamente sensível aos efeitos tóxicos das substâncias químicas, mas pouco se sabe sobre os efeitos em longo prazo da exposição aos poluentes clorados. Como já salientado, as células do sistema imune participam efetivamente da resposta do hospedeiro, e embora sejam descritas diferentes estratégias para testar a imunotoxicidade das substâncias químicas, um importante marcador de alterações imunes é a avaliação de parâmetros hematológicos de rotina (SERDAR *et al.*, 2014; TRYPHONAS, 2001). O efeito imunossupressor dos PCBs tem sido relatado pela literatura em estudos com animais de experimentação, estudos *in vitro* ou ainda em humanos expostos a altas concentrações do poluente. No protocolo de exposição utilizado neste trabalho, o

PCB126 causou modificações no perfil de leucócitos circulantes, tanto em número quanto em função.

Modificações no número de leucócitos circulantes devem ser decorrentes da mielotoxicidade, já que reduções do número de neutrófilos, linfócitos e de células vermelhas, diminuindo a produção de eritroblastos policromáticos, foram encontrados na medula óssea destes animais após exposição ao PCB. É importante salientar que Meisner e colaboradores (1992) não constataram alteração no número de células na medula óssea após tratamento com uma combinação de PCBs, por um ano, por via oral, embora estas células tenham apresentado maior dano cromossomal. Por outro lado, estudo recente de Serdar e colaboradores (2014) encontrou redução no número de leucócitos totais, hemácias, hemoglobina e hematócrito em pacientes com altos níveis de PCBs no soro, corroborando nosso trabalho com os dados encontrados na série branca, mas não na série vermelha.

Adicionalmente, alguns estudos relataram redução no número de linfócitos circulantes após exposição *in vivo* a combinações de congêneres de PCBs ou em associação com outros POPs (NAKANISHI *et al.*, 1995; SARGENT *et al.*, 1991). Ainda, constataram que a exposição aos POPs altera a imunofenotipagem de linfócitos e induzem variação entre a taxa de CD4+/CD8+ (SERDAR *et al.*, 2014), de acordo com a quantidade de dioxina consumida por crianças (NAKANISHI *et al.*, 1995; SARGENT *et al.*, 1991). Já em estudos *in vitro*, os PCBs parecem alterar a cinética de maturação de timócitos (HORVÁTHOVÁ *et al.*, 2011; LYCHE *et al.*, 2004; LEIJS *et al.*, 2009; NAGAYAMA *et al.*, 1998).

No presente trabalho, mostramos que o número de linfócitos no sangue está diminuído em animais expostos ao PCB126 e que esta redução pode ser decorrente de uma menor migração de células da medula óssea e maior migração para o baço, uma vez que o número destas células no baço, um tecido de acúmulo, proliferação e degradação de linfócitos em ratos, estava aumentado. No entanto, a proliferação de linfócitos esplênicos estava normal após a exposição ao PCB126, quando estes foram incubados *in vitro* com concanavalina A ou LPS, que estimulam a proliferação de linfócitos T e B, respectivamente. Estes últimos dados não refletem os resultados da literatura obtidos em ensaios de incubação com PCBs, *in vitro* (LEVIN *et al.*, 2005; LIE *et al.*, 2005; MORI *et al.*, 2006; 2008), ou *in vivo* em peixes (DUFFY-WHRITENOUR *et al.*, 2010), sugerindo a complexidade do efeito imunotóxico do

PCB126 *in vivo* ou ainda, diferenças interespecies na resposta imunológica frente a esse poluente.

Aliado ao efeito mielotóxico do PCB126, a motilidade de linfócitos entre compartimentos pode estar alterada, como também a de neutrófilos, já que a expressão de moléculas de adesão envolvidas com a interação endotelial foi alterada pelo PCB126. A CD62L (L-selectina) é expressa constitutivamente na membrana de leucócitos e tem papel relevante na recirculação de linfócitos em condições basais e no recrutamento inicial de linfócitos, neutrófilos e monócitos na inflamação (IVETIC, 2013; MULLER, 2012). Após exercer suas propriedades adesivas ao endotélio, via ligação a outras selectinas ou a carboidratos fucosilados, a L-selectina é clivada pela ação de metaloproteases de membrana. Esta clivagem é responsável pela ativação leucocitária para os eventos migratórios subsequentes (IVETIC, 2013). Os nossos dados mostram que a expressão de L-selectina e sua clivagem de membrana após ativação celular por fMLP, foi reduzida pela exposição ao PCB126. Vale ressaltar que não há dados na literatura indicando efeito da exposição às bifenilas policloradas e expressão de moléculas de adesão em leucócitos, o que torna esse resultado bastante relevante, visto que pode explicar alterações de resposta leucocitária frente a estímulos fisiológicos e/ou patológicos após exposição ao poluente.

Portanto, a intoxicação com PCB126 afeta a expressão e a atividade de receptores de membrana em leucócitos ou a subsequente ativação celular. Corroborando esta última afirmação, verificamos ainda que a exposição *in vivo* ao PCB126 reduziu a capacidade de linfócitos e neutrófilos expressarem CD18 (β 2-integrina) e CD31 (PECAM-1) após ativação pelo fMLP. As β 2-integrinas, que incluem como membro o CD18, são moléculas que estão presentes exclusivamente em leucócitos e a expressão desta proteína na membrana celular ocorre após ativação das células por vários mediadores inflamatórios. Pela ligação a moléculas da superfamília das imunoglobulinas, o CD18 medeia a firme adesão destas células ao endotélio e a sinalização intracelular para a secreção de mediadores inflamatórios (HERTER; ZARBOCK, 2013; MULLER, 2012). A PECAM-1 é uma molécula da superfamília das imunoglobulinas responsável pela adesão e transmigração dos leucócitos através da parede vascular (HERTER; ZARBOCK, 2013; MULLER, 2012;). Ambas, a β 2-integrina e PECAM-1, são estocadas em grânulos intracelulares e a expressão destas proteínas é dependente de

translocação de moléculas pré-sintetizadas e controle/regulação de expressão gênica (HERTER; ZARBOCK, 2013; MULLER, 2012).

Com o intuito de verificar se a alteração da expressão dessas moléculas por efeito do PCB126 poderia influenciar a função dos leucócitos, utilizamos microscopia intravital, e analisamos a microcirculação de diferentes leitos vasculares de ratos submetidos à exposição com PCB126 ou solução controle. A análise da interação leucócito-endotélio *in vivo* mostrou um prejuízo na resposta dos leucócitos obtidos de animais expostos ao PCB126, no que concerne a sua aderência às vênulas pós-capilares do mesentério e pâncreas após estimulação tópica do leito vascular com fMLP. Adicionalmente, verificamos um aumento na concentração da molécula de adesão solúvel, sICAM-1. A ICAM-1 atua como um contra-receptor para o antígeno associado à função de linfócitos (LFA-1): a interação entre ICAM-1, presente em células endoteliais, e o LFA-1 facilita a adesão de leucócitos e a migração através do endotélio. A sua forma solúvel vem sendo associada ao desenvolvimento de diversas condições, como hipertensão, diabetes e obesidade (GLOWINSKA *et al.*, 2005; WITKOWSKA; BORAWSKA, 2004). Por outro lado, não foi observado alteração nas moléculas de adesão solúveis sVCAM-1 e sPECAM-1.

Os efeitos da exposição ao PCB126 nestas moléculas sugerem interferências em importantes funções dos leucócitos, que são essenciais fisiologicamente, não somente para a sua translocação, mas também para a defesa do organismo. Sabe-se que o fMLP é um produto bacteriano que após ligação ao seu receptor FPR-1 (*formyl peptide receptor-1*), encontrado na membrana celular de diversas células imunes e pertencente a uma superfamília de receptores conhecida como GPCRs (receptores acoplados à proteína G), ativa vias intracelulares responsáveis pela adesão dos leucócitos circulantes às paredes dos vasos, por sua locomoção no tecido inflamado e por sua atividade *killing*. Li e colaboradores (2013) demonstraram que moradores de uma região próxima à reciclagem de lixo eletrônico na China, apresentavam altas concentrações de PCBs no soro e que a resposta de neutrófilos quanto a geração de espécies reativas de oxigênio estava reduzida, indicando um prejuízo na resposta imune inata dessa população. Da mesma forma, no protocolo de exposição ao PCB126 utilizado, observamos que a capacidade de geração de espécies reativas por neutrófilos obtidos de animais expostos ao PCB126 estava reduzida após estimulação com o agente fMLP, resultado este já esperado, visto que a utilização deste estímulo inflamatório anteriormente provocou outras alterações em

funções de neutrófilos, como também reduziu a capacidade de migração destas células. Por isso, a via de ativação mediada por GPCR passou a ser o foco de investigação do trabalho, aliado ao fato de que outros estímulos inflamatórios utilizados, como o PMA e o LPS, não causaram as alterações previamente observadas com o fMLP, e de que não foi observada alterações na expressão do receptor TLR4 em neutrófilos, importante receptor de reconhecimento do LPS. Nossa hipótese de que o PCB126 interfere com a via de ativação induzida por fMLP foi fortalecida ao constatarmos redução na expressão do receptor FPR-1 em neutrófilos obtidos de animais expostos ao poluente.

Como já discutido na introdução, o mecanismo de ação proposto para os PCBs tipo-dioxina é a sua ligação ao receptor AhR, diferentemente dos PCBs tipo não-dioxina, que não apresentam esta afinidade. A literatura é controversa em relação à presença do receptor AhR em neutrófilos (STOCKINGER *et al.*, 2014; BEISCHLAG *et al.*, 2008) e, de fato, os efeitos dos PCBs sobre a redução dos leucócitos totais parece envolver outros mecanismos além de sua ligação ao receptor AhR, uma vez que estas alterações também foram observadas com a exposição aos PCBs tipo não-dioxina (SERDAR *et al.*, 2014). Desta forma, baseado na literatura (OLIVERO-VERBEL & GANEY, 1998), quatro concentrações de PCB126 foram escolhidas e incubadas com neutrófilos *in vitro*, para avaliação do efeito direto do poluente sobre estas células. Mesmo que poucos trabalhos relatem a citotoxicidade causada pelo PCB126 ou pela estimulação com fMLP em neutrófilos (OLIVERO-VERBEL & GANEY, 1998; SWEET *et al.*, 2006), não observamos alteração na viabilidade celular de leucócitos totais obtidos de animais expostos ao PCB126 ou de neutrófilos tratados *in vitro* com PCB126. Os resultados encontrados após estimulação *in vitro* ao PCB126 não refletem os efeitos observados após exposição *in vivo* ao poluente, pois não foi observado prejuízo na geração de espécies reativas de oxigênio, na expressão do receptor FPR-1 e na capacidade de migração dos neutrófilos. Assim, podemos sugerir que o efeito imunotóxico do PCB126 parece não ser decorrente de ação direta sobre a membrana celular dos neutrófilos, ou melhor, sobre os receptores FPR-1 destas células, indicando um mecanismo de ação complexo *in vivo* do PCB126 e ainda não elucidado.

5.3 Resistência insulínica causada pela exposição ao PCB126

A inflamação parece ser um dos principais mecanismos envolvidos com o desenvolvimento do DM induzido pela exposição a poluentes orgânicos persistentes e, principalmente, aos PCBs (KIM *et al.*, 2012). Após constatarmos alterações em parâmetros inflamatórios e metabólicos decorrentes do protocolo de exposição estabelecido, passamos a investigar se o PCB126 levaria ao desenvolvimento do DM e, adicionalmente, se haveria envolvimento destas alterações, previamente encontradas neste trabalho, com a gênese da doença, na tentativa de determinar possíveis indicadores de efeito precoces para exposição ao PCB126 e para o estabelecimento do DM, como, por exemplo, a redução do número e atividade de leucócitos, que têm sido recentemente descritas como um sinal pré-clínico do DM (HARSUNEN *et al.*, 2013).

Embora os níveis de glicose sanguínea e a tolerância à glicose não tenham sido alterados nos animais expostos, a sensibilidade à insulina estava diminuída após a exposição ao PCB126 na dose de 10 µg/kg de massa corpórea. Este dado corrobora trabalhos recentes da literatura, que demonstram que a exposição ao PCB126 ou ao PCB77, por via oral, nas doses de 3,3 mg/kg ou 50 mg/kg de massa corpórea, respectivamente, leva a tolerância à glicose e à insulina (BAKER *et al.*, 2013).

Nesta condição de tolerância à insulina, ocorre uma diminuição da sensibilidade dos tecidos alvo de ação da insulina em responder à concentração de insulina basal (PRENTKI; NOLAN, 2006), e como um mecanismo compensatório, as células β pancreáticas aumentam a produção e secreção de insulina, por aumento do número de células β pancreáticas ou por aumento da sua função (BUTLER *et al.*, 2003; KASUGA, 2006; PRENTKI; NOLAN, 2006; STEIL *et al.*, 2001). Uma vez que esta condição se mantenha, o esforço exercido pode levar à falência da célula β por apoptose (KASUGA, 2006; PRENTKI; NOLAN, 2006). Adicionalmente, um aumento de evidências experimentais tem indicado que a célula β pancreática é um alvo relevante e sensível da toxicidade das substâncias tipo-dioxina (DE TATA, 2014). Diante do exposto, foi interesse do nosso grupo avaliar morfológica e funcionalmente as ilhotas de Langerhans dos animais expostos ao PCB126, já que a compreensão dos eventos que ocorrem no número e função das células β pancreáticas antes do estabelecimento do diabetes tipo I ou tipo II pode permitir a

aplicação de estratégias de intervenção, com o objetivo de prevenir ou retardar o desenvolvimento da doença (LINDSKOG *et al.*, 2010).

De fato, a exposição ao PCB126 levou ao aumento da concentração sérica de insulina, mas, por outro lado, a análise histológica do pâncreas não confirmou a hipótese de alteração morfológica causada pela exposição ao PCB126, ou seja, não houve aumento do número/área ocupada pelas ilhotas no pâncreas. Adicionalmente, não foi visualizada alteração no ciclo celular ou aumento da fragmentação do DNA nas células β , indicando que o protocolo de exposição não levou a morte/destruição celular do pâncreas, dado este confirmado pela avaliação da viabilidade das células β . Embora na figura 53A exista uma alta prevalência de células pancreáticas em necrose, podemos afirmar que a manipulação para isolamento destas células, mas não a exposição ao PCB126, é que levou a esta condição, uma vez que não houve diferença nesse parâmetro nos grupos tratados com veículo ou com PCB. A porcentagem de células viáveis se manteve acima de 60%.

Como mencionado na introdução, os tecidos insulino-dependentes também podem estar diretamente relacionados ao estabelecimento do DM. Entre estes tecidos, destacamos o tecido adiposo como um dos tecidos-alvo de ação do PCB126 (BAKER *et al.*, 2003; 2015; GADUPUDI *et al.*, 2015). O aumento da expressão do transportador de glicose GLUT4 é também um dos mecanismos compensatórios do organismo em resposta à redução da sensibilidade à insulina. De fato, observamos o aumento da expressão do transportador de glicose no tecido adiposo, mas não no tecido muscular.

Adicionalmente, dados da literatura indicam que a resistência à insulina causada pela exposição aos PCBs está associada ao aumento da expressão de TNF no tecido adiposo (BAKER *et al.*, 2013; CAWTHORN; SETHI, 2008). Baker e colaboradores em estudo recente (2015) demonstraram que o receptor AhR medeia a homeostase da glicose ao promover a inflamação do tecido adiposo, em camundongos. Embora exista relação entre o aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias séricas ou localizadas, como o TNF e a IL-1 β , e a progressão da disfunção das células β pancreáticas (WANG *et al.*, 2010), de uma forma geral não foram encontrados sinais de inflamação sistêmica no animais expostos ao PCB126, principalmente ao observamos os tecidos pancreático e adiposo; ao contrário disso, sinais de estresse oxidativo, que também podem contribuir para a falha da produção

de insulina pelas células β (KASUGA, 2006; PRENTKI; NOLAN, 2006), foram encontrados localmente nas ilhotas, como descrito adiante.

Assim como a inflamação, a lipólise é um dos fatores que leva à iniciação e/ou a progressão da falência da célula β (KASUGA, 2006; PRENTKI; NOLAN, 2006). Vale lembrar que a exposição ao PCB126 causou redução da massa do tecido adiposo e que, em conjunto com o alto índice sérico de triglicérides dos animais expostos ao PCB126, podemos confirmar a ocorrência de lipólise neste tecido, o que pode estar diretamente contribuindo para o quadro de resistência à insulina observado.

O tecido adiposo é a maior fonte de liberação no organismo de leptina e IL-6, sendo que a redução da massa adiposa em obesidade reduz tanto leptina circulante quanto a IL-6 (ALLEN; FEBBRAIO, 2010; WANG *et al.*, 2010). A leptina exerce um papel vital no controle da ingestão de alimentos e no balanço energético do organismo. Em nosso protocolo de exposição, não observamos alteração no padrão de consumo de ração pelos animais expostos e não houve diferença nos níveis de leptina sérica. Por outro lado, a concentração de IL-6 no tecido adiposo estava reduzida.

A IL-6 é um mediador inflamatório que apresenta influência no metabolismo energético e na inflamação, mas a correlação entre os níveis de IL-6 e o DM2 ainda não estão completamente estabelecidos e são controversos em estudos com animais e humanos (ALLEN; FEBBRAIO, 2010). A literatura tem sugerido alguns mecanismos moleculares pelo qual a IL-6 induz a resistência insulínica (SCHULTZ *et al.*, 2010), como por exemplo no fígado (DOU *et al.*, 2013). Por outro lado, há relatos que a IL-6 parece exercer um efeito protetor na morte celular causada por citocinas em células pancreáticas (CHOI *et al.*, 2004). Oh e colaboradores (2011) mostraram que a IL-6 induz a morte da célula β , em parte, via aumento da produção de NO.

De fato, observamos aumento na produção de espécies reativas de oxigênio nas ilhotas de Langerhans obtidas de animais expostos ao poluente, o que indica aumento do estresse oxidativo nestas células. Este aumento do estresse oxidativo não parece estar relacionado ao ânion superóxido, uma vez que não foi observada alteração da geração deste pelas ilhotas pancreáticas isoladas dos animais expostos ao PCB126. Dados da literatura comprovam que não há aumento na produção de ânion superóxido decorrente da exposição ao PCB126 (BROWN *et al.*, 1998; TITHOF *et al.*, 1997). Por outro lado, o aumento na geração de NO está bem

descrito na literatura, sendo considerado um dos mecanismos de apoptose e toxicidade causados pela exposição ao PCB126, em diferentes modelos experimentais (CHEN, 2010; LEE; YANG, 2012; LIU *et al.*, 2015; WEI *et al.*, 2012).

Em nossos dados, observamos aumento da geração de NO pelas ilhotas de Langerhans após estimulação a alta concentração de glicose. Ressaltamos que o estresse oxidativo também é um dos fatores intensamente ligado à iniciação e/ou progressão da falência da célula β (KASUGA, 2006; PRENTKI; NOLAN, 2006), e que a célula β pancreática é um importante alvo de ação dos PCBs (DE TATA, 2014).

Em conjunto, nossos dados indicam que a exposição inalatória ao PCB126 na dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de massa corporal, uma vez ao dia, durante quinze dias consecutivos, é uma dose baixa de exposição, contudo, suficiente para causar disfunções metabólicas, visualizadas principalmente pela alteração na massa corpórea e perfil lipídico e alterações nas células do sistema imune relacionadas à via de ativação dependente de GPCR, confirmadas pelas modificações no padrão de expressão de moléculas de adesão, receptores e da resposta de neutrófilos circulantes após estimulação com fMLP, interferindo assim, na homeostasia de ratos Wistar machos. Essas alterações em conjunto, parecem contribuir com a gênese do diabetes mellitus, uma vez que verificamos resistência à insulina nestes animais após a exposição, corroborando a literatura (BAKER *et al.*, 2013) Ainda, os mecanismos pelos quais o PCB126 leva às alterações aqui relatadas parecem estar relacionados à função das ilhotas de Langerhans (DE TATA, 2014), principalmente ao aumento do estresse oxidativo gerado pela exposição inalatória ao PCB126, que é um dos fatores iniciadores e promotores do estabelecimento da resistência à insulina. Desta forma, nosso trabalho embasa a literatura, que vem destacando a importância de estudos que elucidem os mecanismos de ação de poluentes ambientais, principalmente aqueles presentes no ar atmosférico, e o desenvolvimento de doenças metabólicas. E por fim, reforça que o entendimento dos eventos que ocorrem nas ilhotas de Langerhans pode ser o caminho para o estabelecimento de novas estratégias de intervenção para prevenir/retardar o desenvolvimento do diabetes mellitus.

6 Referências bibliográficas¹

ABB, M.; BREUER, J.V.; ZEITZ, C.; LORENZ, W. Analysis of pesticides and PCBs in waste wood and house dust. **Chemosphere**. v.81, p.488-493, 2010.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. ATSDR. Toxicological Profile for Polychlorinated Biphenyls. Update. (Final Draft). NTIS Accession No.PB2000-108027. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 935p., 2000

AHMED, S.A.; GOGAL, R.M. JR.; WALSH, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **J Immunol Methods**. v.170, n.2, p.211-224, 1994.

ALLEN, T.L.; FEBBRAIO, M.A. IL6 as a mediator of insulin resistance: fat or fiction? **Diabetologia**. v.53, n.3, p.399-402, 2010.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. ADA. Classification and Diagnosis of Diabetes. **Diabetes Care**. v.38, p.S8-S16, 2015.

ANNAMALAI, J.; NAMASIVAYAM, V. 2015. Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: Their effects on humans and wildlife. **Environ Int**. v.76C, p.78-97, 2015.

ARIYOSHI, N.; IWASAKI, M.; KATO, H.; TSUSAKI, S.; HAMAMURA, M.; ICHIKI, T.; OGURI, K. Highly toxic coplanar PCB126 reduces liver peroxisomal enzyme activities in rats. **Environ Toxicol Pharmacol**. v.5, n.3, p.219-225, 1998.

BAHIA, L.R.; ARAUJO, D.V.; SCHAAN, B.D.; DIB, S.A.; NEGRATO, C.A.; LEÃO, M.P.; RAMOS, A.J.; FORTI, A.C.; GOMES, M.B.; FOSS, M.C.; MONTEIRO, R.A.; SARTORELLI, D.; FRANCO, L.J. The costs of type 2 diabetes mellitus outpatient care in the Brazilian public health system. **Value Health**. v.14, n.5, p.S137-140, 2011.

BAILYES, E.M., NAVÉ, B.T., SOOS, M.A.; ORR, S.R.; HAYWARD, A.C.; SIDDLE, K. Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. **Biochem J**. v.327,n.1, p.209-215, 1997.

BAKER, N.A.; KAROUNOS, M.; ENGLISH, V.; FANG, J.; WEI, Y.; STROMBERG, A., SUNKARA, M.; MORRIS, A.J.; SWANSON, H.I.; CASSIS, L.A. 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.

¹ As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

BAKER, N.A.; SHOEMAKER, R.; ENGLISH, V.; LARIAN, N.; SUNKARA, M.; MORRIS, A.J.; WALKER, M.; YIANNIKOURIS, F.; CASSIS, L.A. Effects of Adipocyte Aryl Hydrocarbon Receptor Deficiency on PCB-Induced Disruption of Glucose Homeostasis in Lean and Obese Mice. **Environ Health Perspect.** 2015. DOI:10.1289/ehp.1408594.

BATUMALAIE, K.; QVIST, R.; YUSOF, K.M.; ISMAIL, I.S.; SEKARAN, S.D. The antioxidant effect of the Malaysian Gelam honey on pancreatic hamster cells cultured under hyperglycemic conditions. **Clin Exp Med.** v.14, n.2, p.185-95, 2014.

BEISCHLAG, T.V.; LUIS MORALES, J.; HOLLINGSHEAD, B.D.; PERDEW, G.H. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr.** v.18, n.3, p.207-50, 2008.

BRASIL. ABNT. Acreis para Transformadores e capacitores; NBR 8371/94; São Paulo; 1994.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº19 de 29 de setembro de 1994. Publicada no DOU nº 218, de 18/11/1994, pág. 17409, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução normativa nº 11, de 22 de maio de 2012. Publicada no DOU em 17/05/2012 - Seção 1, pág. 4-5, 2012.

BRASIL. Ministério do Interior. Instrução Normativa 001 SEMA/STC/CRC de 10 de junho de 1983.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Projeto PNUD BRA/08/G32 – Estabelecimento de gerenciamento e disposição de Bifenilas Policloradas (PCB).

BRASIL. Portaria Interministerial 19, de 2 de janeiro de 1981.

BRASIL. RESOLUÇÃO CONAMA nº 396, de 3 de abril de 2008. Publicada no DOU nº 66, de 07/04/2008, Seção 1, páginas 64-68, 2008.

BRÄUNER, E.V.; MAYER, P.; GUNNARSEN L, VORKAMP K, RAASCHOU-NIELSEN O. Occurrence of organochlorine pesticides in indoor dust. **J Environ Monit.** v.13, n.3, p.522-526, 2011.

BUTLER, A.E.; JANSON, J.; BONNER-WEIR, S.; RITZEL, R.; RIZZA, R.A.; BUTLER, P.C. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. **Diabetes.** v.52, n.1, p.102-10, 2003.

CALÒ, M.; LICATA, P.; BITTO, A.; LO CASCIO, P.; INTERDONATO, M.; ALTAVILLA, D. Role of AHR, AHRR and ARNT in response to dioxin-like PCBs in *Spaurus aurata*. **Environ Sci Pollut Res Int.** v.21, n.24, p.14226-31, 2014.

CASADO, F.L.; SINGH, K.P.; GASIEWICZ, T.A. The aryl hydrocarbon receptor: regulation of hematopoiesis and involvement in the progression of blood diseases. **Blood Cells Mol Dis.** v.44, n.4, p.199-206, 2010.

CASEY, A.C.; BERGER, D.F.; LOMBARDO, J.P.; HUNT, A.; QUIMBY, F. Aroclor 1242 inhalation and ingestion by Sprague-Dawley rats. **J Toxicol Environ Health A.** v.56, n.5, p.311-342, 1999.

CASTRO-JIMÉNEZ, J.; GONZALEZ, C. Immunoassay-based screening of polychlorinated biphenyls (PCB) in sediments: requirements for a new generation of test kits. **J Environ Monit.** v.13, n.4, p.894-900, 2011.

CAWTHORN, W.P.; SETHI, J.K. TNF-alpha and adipocyte biology. **FEBS Lett.** v.582, n.1, p.117-131, 2008.

CHEN, F. Induction of oxidative stress and cytotoxicity by PCB126 in JEG-3 human choriocarcinoma cells. **J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.** v.45, n.8, p.932-937, 2010.

CHEN, F. Induction of oxidative stress and cytotoxicity by PCB126 in JEG-3 human choriocarcinoma cells. **J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.** v.45, n.8, p.932-7, 2010.

CHEN, X.; ZHONG, Z.; XU, Z.; CHEN, L.; WANG, Y. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. **Free Radic Res.** v.44, n.6, p.587-604, 2010.

CHOI, S.E.; CHOI, K.M.; YOON, I.H.; SHIN, J.Y.; KIM, J.S.; PARK, W.Y.; HAN, D.J.; KIM, S.C.; AHN, C.; KIM, J.Y.; HWANG, E.S.; CHA, C.Y.; SZOT, G.L.; YOON, K.H.; PARK, C.G. IL-6 protects pancreatic islet beta cells from pro-inflammatory cytokines-induced cell death and functional impairment in vitro and in vivo. **Transpl Immunol.** v.13, n.1, p.43-53, 2004.

CHOI, W.; EUM, S.Y.; LEE, Y.W.; HENNIG, B.; ROBERTSON, L.W.; TOBOREK, M. PCB 104-induced proinflammatory reactions in human vascular endothelial cells: relationship to cancer metastasis and atherogenesis. **Toxicol Sci.** v.75, n.1, p.47-56, 2003.

CHOPRA, M.; GÄHRS, M.; HABEN, M.; MICHELS, C.; SCHRENK, D. Inhibition of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin depends on protein biosynthesis. **Cell Biol Toxicol.** v.26, n.4, p.391-401, 2012.

CHU, I.; VILLENEUVE, D.C.; YAGMINAS, A.; LECAVALIER, P.; POON, R.; FEELEY, M.; KENNEDY, S.W.; SEEGAL, R.F.; HÄKANSSON, H.; AHLBORG, U.G. Subchronic toxicity of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl in the rat. I. Clinical, biochemical, hematological, and histopathological changes. **Fundam Appl Toxicol.** v.22, n.3, p.457-68, 1994.

CONSONNI, D.; SINDACO, R.; BERTAZZI, P.A. Blood levels of dioxins, furans, dioxin-like PCBs, and TEQs in general populations: a review, 1989-2010. **Environ Int.** v.44, p.151-62, 2012.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **TRENDS in Immunology.** v.25, p.4-7, 2004.

DE AZEVEDO E SILVA, C.E.; AZEREDO, A.; LAILSON-BRITO, J.; TORRES, J.P.; MALM, O. Polychlorinated biphenyls and DDT in swordfish (*Xiphias gladius*) and blue shark (*Prionace glauca*) from Brazilian coast. **Chemosphere.** v. 67, n.9, p.S48-53, 2007.

DE LIMA, C.B.; TAMURA, E.K.; MONTERO-MELENDZ, T.; PALERMO-NETO, J.; PERRETTI, M.; MARKUS, R.P.; FARSKY, S.H. Actions of translocator protein ligands on neutrophil adhesion and motility induced by G-protein coupled receptor signaling. **Biochem Biophys Res Commun.** v.417, n.2, p.918-23, 2012.

DE TATA, V. Association of dioxin and other persistent organic pollutants (POPs) with diabetes: epidemiological evidence and new mechanisms of beta cell dysfunction. **Int J Mol Sci.** v.15, n.5, p.7787-811, 2014.

DEFRONZO, R.A. 2004. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Med Clin N Am.** v.88, p. 787-835, 2004.

- DHAKAL, K.; ADAMCAKOVA-DODD, A.; LEHMLER, H.J.; THORNE, P.S.; ROBERTSON, L.W. Sulfate Conjugates Are Urinary Markers of Inhalation Exposure to 4-Chlorobiphenyl (PCB3). **Chem Res Toxicol**. v. 17, n.26, p.853-855, 2013.
- DIRINCK, E.L.; DIRTU, A.C.; GOVINDAN, M.; COVACI, A.; VAN GAAL, L.F.; JORENS, P.G. Exposure to persistent organic pollutants: relationship with abnormal glucose metabolism and visceral adiposity. **Diabetes Care**. v.37, n.7, p.1951-8, ANO.
- DONATH, M.Y.; BÖNI-SCHNETZLER, M, ELLINGSGAARD, H, HALBAN, PA, EHSES, JA. Cytokine production by islets in health and diabetes: cellular origin, regulation and function. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. v.21, p.261-267, 2010.
- DOU, L.; ZHAO, T.; WANG, L.; HUANG, X.; JIAO, J.; GAO, D.; ZHANG, H.; SHEN, T.; MAN, Y.; WANG, S.; LI, J. miR-200s Contribute to Interleukin-6 (IL-6) induced Insulin Resistance in Hepatocytes. **J Biol Chem**. v.288, n.31, p.22596–22606, 2013.
- DUFFY-WHRITENOUR, J.E.; KURTZMAN, R.Z.; KENNEDY, S.; ZELIKOFF, J.T. Non-coplanar polychlorinated biphenyl (PCB)-induced immunotoxicity is coincident with alterations in the serotonergic system. **J Immunotoxicol**. v.7, n.4, p.318-326, 2010.
- ECKERSTEN, D.; HENNINGSSON, R. Nitric oxide (NO)--production and regulation of insulin secretion in islets of freely fed and fasted mice. **Regul Pept**. v.174, n.1-3, p.32-37, 2012.
- ELAYAT, A.A.; EL-NAGGAR, M.M.; TAHIR, M. An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. **J Anat**. v.186, n.3, p.629-637, 1995.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**. v.35, n.4, p.495-516, 2007.
- EL-SHAHAWI, M.S.; HAMZA, A.; BASHAMMAKH, A.S.; AL-SAGGAF, W.T. An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants. **Talanta**. v.80, p.1587-1597, 2010.
- ERICKSON, M.D.; KALEY, R.G. 2nd. Applications of polychlorinated biphenyls. **Environ Sci Pollut Res Int**. v.18, n.2, p.135-151, 2011.
- EUM, S.Y.; ANDRAS, I.; HENNIG, B.; TOBOREK, M. NADPH oxidase and lipid raft-associated redox signaling are required for PCB153-induced upregulation of cell adhesion molecules in human brain endothelial cells. **Toxicol Appl Pharmacol**. v.240, n.2, p.299-305, 2009.
- EVERETT, C.G.; THOMPSON, O.M. Associations of dioxins, furans and dioxin-like PCBs with diabetes and pre-diabetes: is the toxic equivalency approach useful? **Environ Res**. v.118, p.107-111, 2012.
- EVERETT, C.J., FRITHSEN, I.L.; DIAZ, V.A.; KOOPMAN, R.J.; SIMPSON, W.M. JR; MAINOUS, A.G. 3rd. Association of a polychlorinated dibenzo-p-dioxin, a polychlorinated biphenyl, and DDT with diabetes in the 1999-2002 National Health and Nutrition Examination Survey. **Environ Res**. v.103, n.3, p.413-418, 2007.
- EVERETT, C.J.; FRITHSEN, I.; PLAYER, M. Relationship of polychlorinated biphenyls with type 2 diabetes and hypertension. **J Environ Monit**. v.13, n.2, p.241-251, 2011.
- FIERENS, S.; MAIRESSE, H.; HEILIER, J.F.; DE BURBURE, C.; FOCANT, J.F.; EPPE, G.; DE PAUW, E.; BERNARD, A. Dioxin/polychlorinated biphenyl body burden, diabetes and

endometriosis: findings in a population-based study in Belgium. **Biomarkers**. v.8, n.6, p.529-534, 2003.

FITZGERALD, E.F.; HWANG, S.A.; GOMEZ M, BUSH B, YANG BZ, TARBELL A. Environmental and occupational exposures and serum PCB concentrations and patterns among Mohawk men at Akwesasne. **J Expo Sci Environ Epidemiol**. v.17, n.3, p.269-278, 2007.

FONSECA, V.A. Defining and Characterizing the Progression of Type 2 Diabetes. **Diabetes care**. v.32, p.S151-S156, 2009.

FREDERIKSEN, M.; MEYER, H.W.; EBBEHØJ, N.E.; GUNNARSEN, L. Polychlorinated biphenyls (PCBs) in indoor air originating from sealants in contaminated and uncontaminated apartments within the same housing estate. **Chemosphere**. v.89, n.4, p.473-479, 2012.

GADUPUDI, G.; GOURRONC, F.A.; LUDEWIG, G.; ROBERTSON, L.W.; KLINGELHUTZ, A.J. 2015. PCB126 inhibits adipogenesis of human preadipocytes. **Toxicol In Vitro**. v.29, n.1, p.132-141.

GHOSH, S.; MURINOVA, L.; TRNOVEC, T.; LOFFREDO, C.A.; WASHINGTON, K.; MITRA, P.S.; DUTTA, S.K. Biomarkers linking PCB exposure and obesity. **Curr Pharm Biotechnol**. v.15, n.11, p.1058-68, 2014.

GIRARD, J. The incretins: from the concept to their use in the treatment of type 2 diabetes. Part A: incretins: concept and physiological functions. **Diabetes Metab**. v.34, n.6, p.550-559, 2008.

GONCHAROV, A.; HAASE, R.F.; SANTIAGO-RIVERA, A.; MORSE, G.; AKWESASNE TASK FORCE ON THE ENVIRONMENT, MCCAFFREY, R.J.; REJ, R.; CARPENTER, D.O. High serum PCBs are associated with elevation of serum lipids and cardiovascular disease in a Native American population. **Environ Res**. v.106, n.2, p.226-239, 2008.

GRAY, S.L.; SHAW, A.C.; GAGNE, A.X.; CHAN, H.M. Chronic exposure to PCBs (Aroclor 1254) exacerbates obesity-induced insulin resistance and hyperinsulinemia in mice. **J Toxicol Environ Health A**. v.76, n.12, p.701-15, 2013.

GRODSKY, G.M.; BENNETT, L.L. Insulin secretion from the isolated pancreas in absence of insulinogenesis: effect of glucose. **Proc Soc Exp Biol Med**. v.114, p.769-771, 1963.

GUYOT, E. CHEVALLIER, A.; BAROUKI, R.; COUMOUL, X. The AhR twist: ligand-dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications. **Drug Discov Today**. v.18, n.9-10, p.479-486, 2012.

HAN, S.G.; EUM, S.Y.; TOBOREK, M.; SMART, E.; HENNIG, B. Polychlorinated biphenyl-induced VCAM-1 expression is attenuated in aortic endothelial cells isolated from caveolin-1 deficient mice. **Toxicol Appl Pharmacol**. v.246, n.1-2, p.74-82, 2010.

HARRAD, S.; HAZRATI, S.; IBARRA, C. Concentrations of polychlorinated biphenyls in indoor air and polybrominated diphenyl ethers in indoor air and dust in Birmingham, United Kingdom: implications for human exposure. **Environ Sci Technol**. v.40, n.15, p.4633-4638, 2006.

HARSUNEN, M.H.; PUFF, R.; D'ORLANDO, O.; GIANNOPOULOU, E.; LACHMANN, L.; BEYERLEIN, A.; VON MEYER, A.; ZIEGLER, A.G. Reduced Blood Leukocyte and Neutrophil Numbers in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes. **Horm Metab Res**. v. 45, n.6, p.467-470, 2013.

HASSOUN, E.A.; PERIANDRI-STEINBERG, S. Assessment of the roles of antioxidant enzymes and glutathione in 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB 126)-induced oxidative stress in the brain tissues of rats after subchronic exposure. **Toxicol Environ Chem.** v.92, n.2, p.301-316, 2010.

HAZRATI, S.; HARRAD, S. Calibration of polyurethane foam (PUF) disk passive air samplers for quantitative measurement of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): factors influencing sampling rates. **Chemosphere.** v.67, n.3, p.448-455, 2007.

HAZRATI, S.; HARRAD, S. Causes of variability in concentrations of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in indoor air. **Environ Sci Technol.** v.40, n.24, p.7584-7589, 2006.

HEPPNER, K.M.; HABEGGER, K.M.; DAY, J.; PFLUGER, P.T.; PEREZ-TILVE, D.; WARD, B.; GELFANOV, V.; WOODS, S.C.; DIMARCHI, R.; TSCHÖP, M. Glucagon regulation of energy metabolism. **Physiol Behav.** v.100, n.5, p.545-548, 2010.

HERTER, J.; ZARBOCK, A. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. **J Immunol.** v.190, n.9, p.4451-4457, 2013.

HOROBIN, R.W. How Romanowsky stains work and why they remain valuable - including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. **Biotech Histochem.** v.86, n.1, p.36-51, 2011.

HORVÁTHOVÁ, M.; JAHNOVÁ, E.; PALKOVIČOVÁ, L.; TRNOVEC, T.; HERTZ-PICCIOTTO, I. Dynamics of lymphocyte subsets in children living in an area polluted by polychlorinated biphenyls. **J Immunotoxicol.** v.8, n.4, p.333-345, 2011.

HOTAMISLIGIL, G.S. 2006. Inflammation and metabolic disorders. **Nature.** v. 444, 2006.

HOU, J.C.; MIN, L.; PESSIN, J.E. Insulin granule biogenesis, trafficking and exocytosis. **Vitam Horm.** v.80, p.473-506, 2009.

HU, H.; JIANG, H.; REN, H.; HU, X.; WANG, X.; HAN, C. AGEs and chronic subclinical inflammation in diabetes: disorders of immune system. **Diabetes Metab Res Rev.** v.31, n.2, p.127-137, 2015.

HU, X.; ADAMCAKOVA-DODD, A.; LEHMLER, H.J.; HU, D.; HORNBUCKLE, K.; THORNE, P.S. Subchronic inhalation exposure study of an airborne polychlorinated biphenyl mixture resembling the Chicago ambient air congener profile. **Environ Sci Technol.** v.46, n.17, p.9653-9662, 2012.

HU, X.; ADAMCAKOVA-DODD, A.; LEHMLER, H.J.; HU, D.; KANIA-KORWEL, I.; HORNBUCKLE, K.C.; THORNE, P.S. Time course of congener uptake and elimination in rats after short-term inhalation exposure to an airborne polychlorinated biphenyl (PCB) mixture. **Environ Sci Technol.** v.44, n.17, p.6893-6900, 2010.

HULIN, M.; SIMONI, M.; VIEGI, G.; ANNESI-MAESANO, I. Respiratory health and indoor air pollutants based on quantitative exposure assessments. **Eur Respir J.** v.40, n.4, p.1033-1045, 2012.

International Agency For Research On Cancer. IARC. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzoparadioxin, 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran, and 3,3,4,4,5-pentachlorobiphenyl. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.** v.100F, p.339-378, 2012.

International Agency For Research On Cancer. IARC. Identification of research needs to resolve the carcinogenicity of highpriority IARC carcinogens: Polychlorinated biphenyls (PCBs). **IARC Technical Publication No. 42**, p.166-183, 2009.

International Diabetes Federation. **IDF Diabetes ATLAS**. 6th edition. 2013.

IVETIC, A. Signals regulating L-selectin-dependent leucocyte adhesion and transmigration. **Int J Biochem Cell Biol**. v.45, n.3, p.550-555, 2013.

JONES, O. A. H.; MAGUIRE, M.L.; GRIFFIN, J.L. Environmental pollution and diabetes: a neglected association. **The Lancet**. v.371, p.287-288, 2008.

JOSHI, S.R.; PARIKH, R.M.; DAS, A.K. Insulin--history, biochemistry, physiology and pharmacology. **J Assoc Physicians India**. v.55, p.19-25, 2007.

KASUGA, M. Insulin resistance and pancreatic beta cell failure. **J Clin Invest**. v.116, n.7, p.1756-1760, 2006.

KAUL, K.; HODGKINSON, A.; TARR, J.M.; KOHNER, E.M.; CHIBBER, R. Is inflammation a common retinal-renal-nerve pathogenic link in diabetes? **Curr Diabetes Rev**. v.6, n.5, p.294-303, 2010.

KOPEC, A.K.; BURGOON, L.D.; IBRAHIM-AIBO, D.; BURG, A.R.; LEE, A.W.; TASHIRO, C.; POTTER, D.; SHARRATT, B.; HARKEMA, J.R.; ROWLANDS, J.C.; BUDINSKY, R.A.; ZACHAREWSKI, T.R. Automated dose-response analysis and comparative toxicogenomic evaluation of the hepatic effects elicited by TCDD, TCDF, and PCB126 in C57BL/6 mice. **Toxicol Sci**. v.118, n.1, p.286-297, 2010.

LAI, I.; CHAI, Y.; SIMMONS, D.; LUTHE, G.; COLEMAN, M.C.; SPITZ, D.; HASCHEK, W.M.; LUDEWIG, G.; ROBERTSON, L.W. Acute toxicity of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) in male Sprague-Dawley rats: effects on hepatic oxidative stress, glutathione and metals status. **Environ Int**. v.36, n.8, p.918-923, 2010.

LAUBY-SECRETAN, B.; LOOMIS, D.; GROSSE, Y.; EL GHISSASSI, F.; BOUVARD, V.; BENBRAHIM-TALLAA, L.; GUHA, N.; BAAN, R.; MATTOCK, H.; STRAIF, K.; International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group IARC, Lyon, France. Carcinogenicity of polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls. **Lancet Oncol**. v.14, n.4, p.287-8, 2013.

LEE, D.H.; JACOBS, D.R. JR. Is serum gamma-glutamyltransferase a marker of exposure to various environmental pollutants? **Free Radic Res**. v.43, n.6, p.533-7, 2009.

LEE, D.H.; LIND, L.; JACOBS, D.R. JR.; SALIHOVIC, S.; VAN BAVEL, B.; LIND, P.M. Associations of persistent organic pollutants with abdominal obesity in the elderly: The Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) study. **Environ Int**. v.40, p.170-178, 2012.

LEE, D.H.; STEFFES, M.W.; SJÖDIN, A.; JONES, R.S.; NEEDHAM, L.L.; JACOBS, D.R. JR. Low dose organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls predict obesity, dyslipidemia, and insulin resistance among people free of diabetes. **PLoS One**. v.6, n.1, p.e15977, 2011.

LEE, H.G.; YANG, J.H. PCB126 induces apoptosis of chondrocytes via ROS-dependent pathways. **Osteoarthritis Cartilage**. v.20, n.10, p.1179-85, 2012.

LEIJS, M.M.; KOPPE, J.G.; OLIE, K.; VAN AALDEREN, W.M.; DE VOOGT, P.; TEN TUSSCHER, G.W. Effects of dioxins, PCBs, and PBDEs on immunology and hematology in adolescents. **Environ Sci Technol**. v.43, n.20, p.7946-7951, 2009.

LETO, D.; SALTIEL, A.R. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v.13, n.6, p.383-396, 2012.

LEVIN, M.; MORSEY, B.; MORI, C.; NAMBIAR, P.R.; DE GUISE, S. Non-coplanar PCB-mediated modulation of human leukocyte phagocytosis: a new mechanism for immunotoxicity. **J Toxicol Environ Health A**. v.68, n.22, p.1977-1993, 2005.

LI, D.S.; YUAN, Y.H.; TU, H.J.; LIANG, Q.L.; DAI, L.J. A protocol for islet isolation from mouse pancreas. **Nat Protoc**. v.4, n.11, p.1649-1652, 2009.

LIE, E.; LARSEN, H.J.; LARSEN, S.; JOHANSEN, G.M.; DEROCHE, A.E.; LUNN, N.J.; NORSTROM, R.J.; WIIG, O.; SKAARE, J.U. Does high organochlorine (OC) exposure impair the resistance to infection in polar bears (*Ursus maritimus*)? Part II: Possible effect of OCs on mitogen- and antigen-induced lymphocyte proliferation. **J Toxicol Environ Health A**. v.68, n.6, p.457-484, 2005.

LIND, P.M.; ERIKSEN, E.F.; LIND, L.; ORBERG, J.; SAHLIN, L. Estrogen supplementation modulates effects of the endocrine disrupting pollutant PCB126 in rat bone and uterus: diverging effects in ovariectomized and intact animals. **Toxicology**. v.199, n.2-3, p.129-36, 2004.

LINDSKOG, C.; ASPLUND, A.; ENKQVIST, M.; UHLEN, M.; KORSGREN, O.; PONTEN, F. 2010. Antibody-based proteomics for discovery and exploration of proteins expressed in pancreatic islets. **Discov Med**. v.9, n.49, p.565-578, 2010.

LIU, H.; GOONERATNE, R.; HUANG, X.; LAI, R.; WEI, J.; WANG, W. A rapid in vivo zebrafish model to elucidate oxidative stress mediated PCB126-induced apoptosis and developmental toxicity. **Free Radic Biol Med**. 2015. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.002.

LU, C.F.; WANG, Y.M.; PENG, S.Q.; ZOU, L.B.; TAN, D.H.; LIU, G.; FU, Z.; WANG, Q.X.; ZHAO, J. Combined effects of repeated administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and polychlorinated biphenyls on kidneys of male rats. **Arch Environ Contam Toxicol**. v.57, n.4, p.767-776, 2009.

LUCENA, C.F.; ROMA, L.P.; GRACIANO, M.F.; VERAS, K.; SIMÕES, D.; CURI, R.; CARPINELLI, A.R. Omega-3 supplementation improves pancreatic islet redox status: in vivo and in vitro studies. **Pancreas**. v.44, n.2, p.287-295, 2015.

LYCHE, J.; LARSEN, H.; SKAARE, J.U.; TVERDAL, A.; DAHL, E.; JOHANSEN, G.; ROPSTAD, E. Effects of perinatal exposure to low doses of PCB 153 and PCB 126 on lymphocyte proliferation and hematology in goat kids. **J Toxicol Environ Health A**. v.67, n.11, p.889-904, 2004.

MACEDO, S.M.; LOURENÇO, E.L.; BORELLI, P.; FOCK, R.A.; FERREIRA, J.M.JR.; FARSKY, S.H. Effect of in vivo phenol or hydroquinone exposure on events related to neutrophil delivery during an inflammatory response. **Toxicology**. v.220, n.2-3, p.126-35, 2006.

MACHADO, U.F. 2006. GLUTs e Síndrome Metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.50, n.2, n.p., 2006.

MAGLIANO, D.J.; LOH V.H.; HARDING, J.L.; BOTTON, J.; SHAW, J.E. 2014. Persistent organic pollutants and diabetes: a review of the epidemiological evidence. **Diabetes Metab.** v.40, n.1, p.1-14, 2014.

MARTIN, L.; KLAASSEN, C.D. Differential effects of polychlorinated biphenyl congeners on serum thyroid hormone levels in rats. **Toxicol Sci.** v.117, n.1, p.36-44, 2010.

MATTHAEI, S.; STUMVOLL, M.; KELLERER, M.; HÄRING, H.U. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. **Endocr Rev.** v.21, n.6, p.585-618, 2000.

MCTAGGART, J.S.; CLARK, R.H.; ASHCROFT, F.M. The role of the KATP channel in glucose homeostasis in health and disease: more than meets the islet. **J Physiol.** v.588, n.17, p.3201-3209, 2010.

MEGSON, D.; O'SULLIVAN, G.; COMBER, S.; WORSFOLD, P.J.; LOHAN, M.C.; EDWARDS, M.R.; SHIELDS, W.J.; SANDAU, C.D.; PATTERSON, D.G. JR. Elucidating the structural properties that influence the persistence of PCBs in humans using the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) dataset. **Sci Total Environ.** v.461-462, p.99-107, 2013.

MEISNER, L.F.; ROLOFF, B.; SARGENT, L.; PITOT, H. Interactive cytogenetic effects on rat bone-marrow due to chronic ingestion of 2,5,2',5' and 3,4,3',4' PCBs. **Mutat Res.** v.283, n.3, p.179-183, 1992.

MELINO, G.; KNIGHT, R.A.; NICOTERA, P. How many ways to die? How many different models of cell death? **Cell Death Differ.** v.12, n.2, p.1457-62, 2005.

MORI, C.; MORSEY, B.; LEVIN, M.; GORTON, T.S.; DE GUISE, S. Effects of organochlorines, individually and in mixtures, on B-cell proliferation in marine mammals and mice. **J Toxicol Environ Health A.** v.71, n.4, p.266-275, 2008.

MORI, C.; MORSEY, B.; LEVIN, M.; NAMBIAR, P.R.; DE GUISE, S. Immunomodulatory effects of in vitro exposure to organochlorines on T-cell proliferation in marine mammals and mice. **J Toxicol Environ Health A.** v.69, n.3-4, p.283-302, 2006.

MREMA, E.J.; RUBINO, F.M.; BRAMBILLA, G.; MORETTO, A.; TSATSAKIS, A.M.; COLOSIO, C. Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity. **Toxicology.** v.10, n.307, p.74-88, 2012.

MULLER, W.A. Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. **Vet Pathol.** v.50, n.1, p.7-22, 2013.

NAGAYAMA, J.; TSUJI, H.; IIDA, T.; HIRAKAWA, H.; MATSUEDA, T.; OKAMURA, K.; HASEGAWA, M.; SATO, K.; MA, H.Y.; YANAGAWA, T.; IGARASHI, H.; FUKUSHIGE, J.; WATANABE, T. Postnatal exposure to chlorinated dioxins and related chemicals on lymphocyte subsets in Japanese breast-fed infants. **Chemosphere.** v.37, n.9-12, p.1781-1787, 1998.

NAKANISHI, Y.; NOMOTO, Y.; MATSUKI, A.; KUNITAKE, R.; HARA, N. Effect of polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans on leukocyte in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid. **Fukuoka Igaku Zasshi.** v.86, n.5, p.261-266, 1995.

National Toxicology Program. NTP. Toxicology and carcinogenesis studies of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) (CAS No. 57465-28-8) in female Harlan Sprague-Dawley rats (Gavage Studies). **Natl Toxicol Program Tech Rep Ser.** v.520, p.4-246, 2006.

NUNEMAKER, C.S.; BUERK, D.G.; ZHANG, M.; SATIN, L.S. Glucose-induced release of nitric oxide from mouse pancreatic islets as detected with nitric oxide-selective glass microelectrodes. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 292, n.3, p.E907-12, 2007.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur J Biochem.** v.267, n.17, p.5421-5426, 2000.

OH, Y.S.; LEE, Y.J.; PARK, E.Y.; JUN, H.S. Interleukin-6 treatment induces beta-cell apoptosis via STAT-3-mediated nitric oxide production. **Diabetes Metab Res Rev.** v.27, n.8, p.813-9, 2011.

OLIVERO-VERBEL, J.; GANEY, P.E. Effect of three polychlorinated biphenyls on f-met-leu-phe-induced degranulation in rat neutrophils. **Toxicol Lett.** v.98, n.3, p.195-202, 1998.

ONO, J.; TAKAHASHI, D.; GUO, X.; TAKAHASHI, S.; TAKEOKA, H. A numerical study on the seasonal variability of polychlorinated biphenyls from the atmosphere in the East China Sea. **Chemosphere.** v.89, n.4, p.389-397, 2012.

OTTO-BUCZKOWSKA, E.; CHOBOT, A. Role of ghrelin and leptin in the regulation of carbohydrate metabolism. Part I. Ghrelin. **Postepy Hig Med Dosw (Online).** v.66, p.795-798, 2012.

OVANDO BJ, VEZINA CM, MCGARRIGLE BP, OLSON JR. 2006. Hepatic gene downregulation following acute and subchronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Toxicol Sci.** v.94, n.2, p.428-438, 2006.

PATEL, C.J.; CULLEN, M.R.; IOANNIDIS, J.P.; BUTTE, A.J. 2012. Systematic evaluation of environmental factors: persistent pollutants and nutrients correlated with serum lipid levels. **Int J Epidemiol.** v.41, n.3, p.828-843, 2012.

PEARSON, H. 2006. When good cholesterol turns bad. **Nature.** v.444, n.7121, p.794-795, 2006.

PELCLOVÁ, D.; FENCLOVÁ, Z.; DLASKOVÁ, Z.; URBAN, P.; LUKÁS, E.; PROCHÁZKA, B.; RAPPE, C.; PREISS, J.; KOCAN, A.; VEJLUPKOVÁ, J. 2001. Biochemical, neuropsychological, and neurological abnormalities following 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposure. **Arch Environ Health.** v.56, n.6, p.493-500, 2001.

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

PERSKY, V.; PIORKOWSKI, J.; TURYSKI, M.; FREELS, S.; CHATTERTON, R. JR; DIMOS, J.; BRADLOW, H.L.; CHARY, L.K.; BURSE, V.; UNTERMAN, T.; SEPKOVIC, D.W.; MCCANN, K. 2012. Polychlorinated biphenyl exposure, diabetes and endogenous hormones: a cross-sectional study in men previously employed at a capacitor manufacturing plant. **Environ Health.** v.29, n.11, p.57, 2012.

POLI, D.; CAGLIERI, A.; GOLDONI, M.; CASTOLDI, A.F.; COCCINI, T.; RODA, E.; VITALONE, A.; CECCATELLI, S.; MUTTI, A. 2009. Single step determination of PCB 126 and 153 in rat tissues by using solid phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry: Comparison with solid phase extraction and liquid/liquid extraction. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** v.877, n.8-9, p.773-783, 2009.

POUR, O.R.; DAGOGO-JACK, S. 2010. Prediabetes as a Therapeutic Target. **Clinical Chemistry.** v.57, p.1-6, 2010.

PRENTKI, M.; NOLAN, C.J. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. **J Clin Invest.** v.116, n.7, p.1802-1812, 2006.

RIBEIRO, A.L.; SHIMADA, A.L.; HEBEDA, C.B.; DE OLIVEIRA, T.F.; DE MELO LOUREIRO, A.P.; FILHO, W.R.; SANTOS, A.M.; DE LIMA, W.T.; FARSKY, S.H. In vivo hydroquinone exposure alters circulating neutrophil activities and impairs LPS-induced lung inflammation in mice. **Toxicology.** v.288, n.1-3, p.1-7, 2011.

RIGNELL-HYDBOM, A.; LIDFELDT, J.; KIVIRANTA, H.; RANTAKOKKO, P.; SAMSIOE, G.; AGARDH, C.D.; RYLANDER, L. Exposure to p,p9-DDE: A Risk Factor for Type 2 Diabetes. **PLoS ONE.** v.4, n.10, p.e7503, 2009.

RIGNELL-HYDBOM, A.; RYLANDER, L.; HAGMAR, L. Exposure to persistent organochlorine pollutants and type 2 diabetes mellitus. **Human & Experimental Toxicology.** v.26, p.447-452, 2007.

RITTER, R.; SCHERINGER, M.; MACLEOD, M.; MOECKEL, C.; JONES, K.C.; HUNGERBÜHLER, K. Intrinsic human elimination half-lives of polychlorinated biphenyls derived from the temporal evolution of cross-sectional biomonitoring data from the United Kingdom. **Environ Health Perspect.** v.119, n.2, p.225-31, 2011.

ROBERTSON, L.W.; LUDEWIG, G. Polychlorinated Biphenyl (PCB) carcinogenicity with special emphasis on airborne PCBs. **Gefahrst Reinhalt Luft.** v.71, n.1-2, p.25-32, 2011.

RODRIGUES, S.F.; ALMEIDA-PAULA, L.D.; GRANGER, D.N. Synergistic effects of high blood cholesterol and hypertension on leukocyte and platelet recruitment in the cerebral microcirculation. **Hypertension.** v.63, n.4, p.747-52, 2014.

RÖNN, M.; LIND, L.; VAN BAVEL, B.; SALIHOVIC, S.; MICHAËLSSON, K.; LIND, P.M. Circulating levels of persistent organic pollutants associate in divergent ways to fat mass measured by DXA in humans. **Chemosphere.** v.85, n.3, p.335-343, 2011.

ROOS, V.; RÖNN, M.; SALIHOVIC, S.; LIND, L.; VAN BAVEL, B.; KULLBERG, J.; JOHANSSON, L.; AHLSTRÖM, H.; LIND, P.M. Circulating levels of persistent organic pollutants in relation to visceral and subcutaneous adipose tissue by abdominal MRI. **Obesity (Silver Spring).** v.21, n.2, p.413-418, 2013.

RUZZIN, J.; PETERSEN, R.; MEUGNIER, E.; MADSEN, L.; LOCK, E.J.; LILLEFOSSE, H.; MA, T.; PESENTI, S.; SONNE, S.B.; MARSTRAND, T.T.; MALDE, M.K.; DU, Z.Y.; CHAVEY, C.; FAJAS, L.; LUNDEBYE, A.K.; BRAND, C.L.; VIDAL, H.; KRISTIANSEN, K.; FRØYLAND L. Persistent Organic Pollutant Exposure Leads to Insulin Resistance Syndrome. **Environmental Health Perspectives.** v.118, n.4, p. 465-471, 2010.

SARGENT, L.; DRAGAN, Y.P.; ERICKSON, C.; LAUFER, C.J.; PITOT, H.C. Study of the separate and combined effects of the non-planar 2,5,2',5'- and the planar 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl in liver and lymphocytes in vivo. **Carcinogenesis.** v.12, n.5, p.793-800, 1991.

SCHELL, L.M.; BURNITZ, K.K., LATHROP P.W. Pollution and human biology. **Annals of Human Biology.** v.37, p.347-366, 2010.

SCHULTZ, O.; OBERHAUSER, F.; SAECH, J.; RUBBERT-ROTH, A.; HAHN, M.; KRONE, W.; LAUDES, M. Effects of inhibition of interleukin-6 signalling on insulin sensitivity and lipoprotein (a) levels in human subjects with rheumatoid diseases. **PLoS One.** v.5, n.12, p.e14328, 2010.

SERDAR, B.; LEBLANC, W.G.; NORRIS, J.M.; DICKINSON, L.M. Potential effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) and selected organochlorine pesticides (OCPs) on immune cells and blood biochemistry measures: a cross-sectional assessment of the NHANES 2003-2004 data. **Environ Health**. v.16, n.13, p.114, 2014.

SHIMADA, A.L.; RIBEIRO, A.L.; BOLONHEIS, S.M.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; HEBEDA, C.B.; FARSKY, S.H. In vivo hydroquinone exposure impairs MCP-1 secretion and monocyte recruitment into the inflamed lung. **Toxicology**. v.296, n.1-3, p.20-6, 2012.

SILVERSTONE, A.E.; ROSENBAUM, P.F.; WEINSTOCK, R.S.; BARTELL, S.M.; FOUSHEE, H.R.; SHELTON, C.; PAVUK, M. **Environ Health Perspect**. v.120, n.5, p.727-32, 2012.

SIPOS, E.; CHEN, L.; ANDRÁS, I.E.; WROBEL, J.; ZHANG, B.; PU, H.; PARK, M.; EUM, S.Y.; TOBOREK, M. Proinflammatory adhesion molecules facilitate polychlorinated biphenyl-mediated enhancement of brain metastasis formation. **Toxicol Sci**. v.126, n.2, p.362-371, 2012.

SPEER, T.; ZEWINGER, S.; FLISER, D. Uraemic dyslipidaemia revisited: role of high-density lipoprotein. **Nephrol Dial Transplant**. v. 28, n.10, p.2456-2463, 2013.

STANLEY, S.; WYNNE, K.; BLOOM, S. Gastrointestinal satiety signals III. Glucagon-like peptide 1, oxyntomodulin, peptide YY, and pancreatic polypeptide. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. v.286, n.5, p.G693-697, 2004.

STEIL, G.M.; TRIVEDI, N.; JONAS, J.C.; HASENKAMP, W.M.; SHARMA, A.; BONNER-WEIR, S.; WEIR, G.C. Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v.280, n.5, p.E788-796, 2001.

STOCKINGER, B.; DI MEGLIO, P.; GIALITAKIS, M.; DUARTE, J.H. The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. **Annu Rev Immunol**. v.32, p.403-32, 2014.

STOCKINGER, B.; HIROTA, K.; DUARTE, J.; VELDHOFEN, M. External influences on the immune system via activation of the aryl hydrocarbon receptor. **Semin Immunol**. v.23, n.2, p.99-105, 2011.

STROWSKI, M.Z.; BLAKE, A.D. Function and expression of somatostatin receptors of the endocrine pancreas. **Mol Cell Endocrinol**. v.286, n.1-2, p.169-179, 2008.

SUAREZ-LOPEZ JR, LEE DH, PORTA M, STEFFES MW, JACOBS DR JR. 2015. Persistent organic pollutants in young adults and changes in glucose related metabolism over a 23-year follow-up. **Environ Res**. v.137C, p.485-494, 2015.

SWEET, L.I.; PASSINO-READER, D.R.; MEIER, P.G.; OMANN, G.M. Effects of polychlorinated biphenyls, hexachlorocyclohexanes, and mercury on human neutrophil apoptosis, actin cytoskeleton, and oxidative state. **Environ Toxicol Pharmacol**. v.22, n.2, p.179-88, 2006.

TANAKA, T.; MORITA, A.; KATO, M.; HIRAI, T.; MIZOUE, T.; TERAUCHI, Y.; WATANABE, S.; NODA, M.; SCOP STUDY GROUP. Congener-specific polychlorinated biphenyls and the prevalence of diabetes in the Saku Control Obesity Program (SCOP). **Endocr J**. v.58, n.7, p.589-596, 2011.

TANG, M.; CHEN, K.; YANG, F.; LIU, W. 2014. Exposure to organochlorine pollutants and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One**. v.15, n.9(10):e85556.

THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporters in the 21st Century. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v.298, n.2, p.E141-145, 2010.

TIEMANN, U. *In vivo* and *in vitro* effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor, and lindane on the female reproductive tract of mammals: A review. **Reproductive Toxicology.** v.25, p.316-326, 2008.

TRYPHONAS, H. Approaches to detecting immunotoxic effects of environmental contaminants in humans. **Environ Health Perspect.** v.109, p.877-84, 2001.

TSIKAS, D. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. **Free Radic Res.** v.39, n.8, p.797-815, 2005.

VAN DEN BERG, K.J.; ZURCHER, C.; BROUWER, A. Effects of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl on thyroid function and histology in marmoset monkeys. **Toxicol Lett.** v.41, n.1, p.77-86, 1988.

VAN DUURSEN, M.B.; SANDERSON, J.T.; VAN DEN BERG, M. Cytochrome P450 1A1 and 1B1 in human blood lymphocytes are not suitable as biomarkers of exposure to dioxin-like compounds: polymorphisms and interindividual variation in expression and inducibility. **Toxicol Sci.** v.85, n.1, p.703-712, 2005.

WANG, C.; GUAN, Y.; YANG, J. Cytokines in the Progression of Pancreatic β -Cell Dysfunction. **Int J Endocrinol.** v.2010, p.515136, 2010.

WEI, W.; LI, X.F.; LI, X.N.; CHEN, X.M.; LIU, A.L.; LU, W.Q. Oxidative stress and cell-cycle change induced by coexposed PCB126 and benzo(a) pyrene to human hepatoma (HepG2) cells. **Environ Toxicol.** v.27, n.5, p.316-20, 2012.

WEST, B.; PARIKH, P.; ARNIELLA, G.; HOROWIT, C.R. Observations and Recommendations for Community-Based Diabetes Screenings. **The Diabetes Educator.** v.36, p.887-892, 2010.

WILHELM, J.; VYTÁSEK, R.; OSTÁDALOVÁ, I.; VAJNER, L. Evaluation of different methods detecting intracellular generation of free radicals. **Mol Cell Biochem.** v.328, n.1-2, p.167-176, 2009.

WOJTOWICZ, A, TOMANEK M, AUGUSTOWSKA K, GREGORASZCZUK EL. Aromatic hydrocarbon receptor (AhR) in the porcine theca and granulosa cells: effect of TCDD, PCB 126 and PCB 153 on the expression of AhR. **Endocr Regul.** v.39, n.4, p.109-18, 2005.

World Health Organization; WHO. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus, Geneva, 59p, WHO/NCD/NCS/99.2, 1999.

World Health Organization; WHO. Polychlorinated Biphenyls: Human Health Aspects - Concise International Chemical Assessment Document, No 55. Geneva, 2003.

World Health Organization; WHO. Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, Chapter 5.10 PCBs Air Quality Guidelines – Second Edition, 2000.

ZHENG, J.L.; PARFETT, C.; WILLIAMS, A.; YAGMINAS, A.; ZHOU, G.; DOUGLAS, G.R.; YAUK, C.L. Assessment of subclinical, toxicant-induced hepatic gene expression profiles after low-dose, short-term exposures in mice. **Regul Toxicol Pharmacol.** v.60, n.1, p.54-72, 2011.

7 Anexos

7.1 Ficha do aluno

about:blank

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9141 - 6720366/2 - Ana Lucia Borges Shimada

Email: alshimada@usp.br
Data de Nascimento: 08/12/1986
Cédula de Identidade: RG - 8.785.472 8 - PR
Local de Nascimento: Estado de Santa Catarina
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico-Bioquímico - Universidade Estadual de Maringá - Paraná - Brasil - 2009
Mestrado: Mestre em Ciências - Área: Toxicologia e Análises Toxicológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2011

Curso: Doutorado
Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula: 12/04/2011
Início da Contagem de Prazo: 12/04/2011
Data Limite para o Depósito: 13/04/2015
Orientador: Prof(a). Dr(a). Sandra Helena Polisselli Farsky - 12/04/2011 até o presente.
Email: sfarsky@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 12/04/2011
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 13/06/2013
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:

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 09/02/2015

Impresso em: 19/03/2015 14:15:45

Terezinha Sueli Duarte
FCF/USP
Nº USP 8830369



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9141 - 6720366/2 - Ana Lucia Borges Shimada

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5752-2/3	Danos em Biomoléculas e o seu Papel no Monitoramento da Exposição a Agentes Tóxicos	27/05/2011	01/07/2011	45	3	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0210 - Toxicologia Ambiental ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo	01/08/2011	03/12/2011	-	3	-	-	-	-
FBC5722-2/1	Controle Hormonal da Resposta Inflamatória	02/08/2011	22/08/2011	60	4	89	A	N	Concluída
FBC5814-5/2	Toxicologia Aplicada aos Alimentos	23/08/2011	12/09/2011	75	5	100	A	N	Concluída
FBC5800-4/1	Temas Avançados em Ciências e Tecnologia Farmacêutica I	17/10/2011	23/10/2011	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5803-2/1	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	05/03/2012	18/03/2012	30	2	100	A	N	Concluída
BMB5817-1/2	Fisiopatologia do Diabetes Mellitus (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	13/08/2013	17/09/2013	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	10	20	23
Estágios:			
Total:	10	20	23

Créditos Atribuídos à Tese: 167

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 09/02/2015

Impresso em: 19/03/2015 14:15:45

Terezinha Suelli Duarte
 FCF/USP
 Nº USP 8830369

7.2 Currículo lattes

15/03/2015

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Ana Lucia Borges Shimada)



Ana Lucia Borges Shimada

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2453242258943773>

Última atualização do currículo em 15/03/2015

Graduada em Farmácia com habilitação em Análises Clínicas pela Universidade Estadual de Maringá (2008), obteve o título de Mestre em Ciências na área de Toxicologia e Análises Toxicológicas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (2011). Atualmente é doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas na mesma instituição. Possui experiência em Toxicologia com ênfase em Toxicologia Experimental e Imunotoxicologia, atuando principalmente nos seguintes temas: poluição atmosférica, diabetes e inflamação. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Ana Lucia Borges Shimada
Nome em citações bibliográficas	SHIMADA, Ana Lucia Borges; SHIMADA, A.L.B.; Shimada, Ana Lúcia Borges; Shimada, Ana LÂcia Borges; SHIMADA, ANA LÚCIA B.

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Avenida Professor Lineu Prestes, 580 Bloco 13B Cidade Universitária 05508-900 - Sao Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30912197 URL da Homepage: http://www.fcf.usp.br
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2011	Doutorado em andamento em Toxicologia e Análises Toxicológicas. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Estudo experimental da exposição ao PCB126 sobre a indução de Diabetes Mellitus tipo II, Orientador: Sandra Helena Polisselli Farsky. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
2009 - 2011	Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas (Conceito CAPES 5). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Efeitos da exposição in vivo à hidroquinona sobre funções do tecido traqueal e de macrófagos alveolares de camundongos, Ano de Obtenção: 2011. Orientador: Sandra Helena Polisselli Farsky. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Palavras-chave: intoxicação ambiental e ocupacional; MCP-1; fagocitose; Candida albicans; inflamação. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Análise Toxicológica / Especialidade: Imunotoxicologia. Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Análise Toxicológica / Especialidade: Toxicologia Experimental.

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4266492E9>

1/15

2004 - 2008	Graduação em Farmácia Bioquímica. Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.
--------------------	---

Formação Complementar

2012 - 2012	Nanotecnologia. (Carga horária: 8h). Departamento de Análises Clínicas da FCF/USP.
2012 - 2012	Aplicação Espectrometria de Massa na Metabolômica. (Carga horária: 3h). Departamento de Análises Clínicas da FCF/USP.
2012 - 2012	Metabolic signatures in polarized macrophages. (Carga horária: 1h). Departamento de Análises Clínicas da FCF/USP.
2012 - 2012	Insulina e Inflamação. Departamento de Análises Clínicas da FCF/USP.
2011 - 2011	Avaliação de Risco. (Carga horária: 8h). Sociedade Brasileira de Toxicologia.
2011 - 2011	Manuseio, Descarte e Transporte de Resíduo Químico. (Carga horária: 3h). Universidade de São Paulo.
2011 - 2011	Toxicologia Forense Internacional. (Carga horária: 6h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2011 - 2011	Aplicações de Nanopartículas na área Médica e Farm. (Carga horária: 1h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2009 - 2009	Escola de Altos Estudos em Toxicologia. (Carga horária: 70h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2007 - 2007	O Uso de Nanopartículas em Produção de Vacina. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.
2006 - 2006	Terapia Fotodinâmica. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.
2006 - 2006	Boas Práticas Em Farmácia. (Carga horária: 8h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.
2006 - 2006	Novos Sistemas de Liberação de Fármacos. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.
2006 - 2006	Atenção às Urgências Toxicológicas II. (Carga horária: 16h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.
2005 - 2005	Trat. Fitoterápico, Téc. de Resistencia em Micobac. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.
2004 - 2004	Conhecendo a Farmácia. (Carga horária: 24h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.
2004 - 2004	Florais de Bach. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.
2004 - 2004	Curso Intensivo de Inglês Básico. (Carga horária: 120h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2014 - Atual Vínculo: Aluna de Pós-graduação, Enquadramento Funcional: Aluna de Doutorado

Vínculo institucional

2011 - 2014 Vínculo: Aluna de Pós-graduação, Enquadramento Funcional: Aluna de Doutorado, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações

Vínculo institucional

2009 - 2011 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluna de Mestrado, Regime:

Outras informações

Dedicação exclusiva.

Bolsista FAPESP Projeto no. 2009/03964-5.

Atividades**08/2013 - 08/2013**

Ensino, Comprometimento do Sistema Imunológico, Nível: Pós-Graduação

Disciplinas ministradas

Aula Ministrada: Alteração da função leucocitária em intoxicações

08/2013 - 08/2013

Ensino, Comprometimento do sistema imunológico, Nível: Pós-Graduação

Disciplinas ministradas

Aula ministrada: Modelos experimentais de estudos toxicológicos

08/2012 - 12/2012

Extensão universitária , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Atividade de extensão realizada

Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) Monitoria na disciplina Toxicologia Geral I (FBC0425) ministrada aos alunos do curso de Farmácia Bioquímica (FCF-USP) sob supervisão da Prof. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro.

08/2011 - 12/2011

Extensão universitária , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Atividade de extensão realizada

Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) Monitoria na disciplina Toxicologia Ambiental (FBC0210) ministrada aos alunos do curso de Engenharia Ambiental (Poli-USP) sob supervisão da Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento.

06/2009 - 12/2009

Extensão universitária , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Atividade de extensão realizada

Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) Monitoria na disciplina Análises Toxicológicas (FBC0440) ministrada aos alunos do curso de Farmácia Bioquímica (FCF-USP) sob supervisão do Prof. Dr. Ernani Pinto Jr..

Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.**Vínculo institucional****2012 - Atual**

Vínculo: Professor convidado, Enquadramento Funcional: Professor convidado

Vínculo institucional**2004 - 2008**

Vínculo: Livre, Enquadramento Funcional: Acadêmica, Regime: Dedicção exclusiva.

Atividades**03/2015 - 03/2015**

Ensino, Especialização em Eng de Segurança do Trabalho, Nível: Especialização

Disciplinas ministradas

Disciplina ministrada: O ambiente e as doenças do Trabalho

02/2014 - 02/2014

Ensino, Especialização em Eng de Segurança do Trabalho, Nível: Especialização

Disciplinas ministradas

Disciplina ministrada: O ambiente e as doenças do Trabalho

02/2013 - 02/2013

Ensino, Especialização em Eng de Segurança do Trabalho, Nível: Especialização

Disciplinas ministradas

Disciplina ministrada: O ambiente e as doenças do Trabalho

02/2012 - 02/2012

Ensino, Especialização em Eng de Segurança do Trabalho, Nível: Especialização

Disciplinas ministradas

Disciplina ministrada: O ambiente e as doenças do Trabalho

03/2008 - 12/2008

Estágios , Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas.

Estágio realizado

Monitoria na disciplina de Toxicologia ministrada aos alunos do curso de Farmácia sob supervisão da Prof. Dra. Simone Aparecida Galerani Mossini.

4/2004 - 8/2004

Estágios , Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises

Clínicas.
Estágio realizado
Estágio em Práticas de Laboratório.

Projetos de pesquisa

2011 - Atual

Estudo experimental da exposição ao PCB126 sobre a indução de Diabetes Mellitus tipo II

Descrição: A Diabetes (DM) é uma doença que acomete atualmente 285 milhões de pessoas em todo o mundo. Em 2030, estima-se que 428 milhões de pessoas apresentem esta doença (IDF, 2010). Uma vez que a literatura relata uma possível associação entre a DM e a exposição aos poluentes orgânicos persistentes (POPs), como as bifenilas policloradas (PCBs), o presente projeto visa investigar se a exposição ao PCB n 126 (3,3',4,4',5-Pentaclorobifenil) desencadeia alterações endógenas envolvidas na gênese da diabetes do tipo II. Para tanto, ratos Wistar machos serão expostos por instilação ao PCB126 nas concentrações de 1 ou 10 ppb (1 ou 10 g/L). Animais expostos ao veículo serão utilizados como controle. 24 horas após a última exposição, os animais serão sacrificados para coleta do sangue circulante e pâncreas. Em amostras de sangue, serão avaliados: o número de células circulantes; a expressão de moléculas de adesão em leucócitos circulantes, por citometria de fluxo; os níveis plasmáticos de moléculas de adesão circulantes de atividade endotelial e a concentração de citocinas próinflamatórias, como IL-1alfa, TNF-alfa e IL-6 por kits de ELISA e o NO, por Reação de Griess; o perfil bioquímico e lipídico, a concentração de insulina e glicose basal e o teste de tolerância à glicose intravenoso. Em amostras de tecido pancreático, serão avaliados: a pureza e a viabilidade morfológica das ilhotas pancreáticas; a atividade da mieloperoxidase; a estereologia do pâncreas; a proteômica para o perfil de proteínas inflamatórias; a expressão dos receptores AhR e PPARs por western blot, e por microscopia intravital será analisada a interação leucócito-endotélio no pâncreas. Os dados obtidos poderão contribuir para a elucidação dos efeitos causados pela exposição aos PCBs, possivelmente sobre alterações observadas durante o desenvolvimento da diabetes do tipo II. Projeto FAPESP no. 2011/09677-8 e no. 2012/02994-0.. Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Doutorado: (1) .

Integrantes: Ana Lucia Borges Shimada - Integrante / Sandra Helena Poliselli Farsky - Coordenador / Ernani Pinto Junior - Integrante / Stephen Fernandes de Paula Rodrigues - Integrante / Wesley Soares Cruz - Integrante / Paulo Hilário Nascimento - Integrante / Natália Guimarães de Figueiredo - Integrante / Mari Cleide Sogayar - Integrante. Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Auxílio financeiro.

2011 - Atual

CARACTERIZAÇÃO DAS AÇÕES DO EXTRATO DA INFLORESCÊNCIA DA Achyrocline satureoides SOBRE A FUNÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA INFLAMAÇÃO

Descrição: Desde a antiguidade, as plantas medicinais vêm sendo utilizadas para o tratamento de diversas doenças e, gradativamente, o uso destes medicamentos naturais tem aumentado, porém, na maioria das vezes, o emprego do medicamento popular é realizado sem critérios adequados, ou seja, sem a fundamentação necessária na literatura para o uso, o que em algumas vezes, poderá resultar em efeitos indesejáveis e tóxicos. Achyrocline satureoides (Lam) D.C., popularmente conhecida como marcela, marcela do campo, macelinha, macela ou camomila-nacional é muito utilizada popularmente para tratar males do estomago e do intestino, problemas respiratórios, anemias, inflamações, infecções virais, diabetes e doenças de próstata. Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo trabalhos com o objetivo de esclarecer os mecanismos antiinflamatórios das inflorescências da Marcela. No presente projeto serão investigadas as ações do extrato das inflorescências da Achyrocline satureoides sobre as funções de neutrófilos. Para tanto, serão empregados Ratos Wistar, machos. Os efeitos da administração oral do extrato sobre a migração de neutrófilos in vivo serão investigados na inflamação induzida pelo lipopolissacarídeo de E.coli (LPS) no

tecido subcutâneo dorsal (bolsa de ar); sobre fenômenos de interação leucócito-endotélio (comportamento rolling e adesão) na microcirculação mesentérica em ensaios de microscopia intravital e sobre as secreções de mediadores quimiotáticos (leucotrieno B4 e CINC) por ensaios imunoenzimáticos no exsudato obtido da bolsa de ar inflamada. Ensaios in vitro, empregando neutrófilos obtidos da cavidade peritoneal dos animais (4hs após a injeção local de glicogênio de ostra a 1%) e pré-incubados com o extrato, serão realizados para quantificar a expressão de moléculas de adesão e de receptores para o LPS toll-like receptor-4 (TLR-4) em ensaios de citometria de fluxo; a adesão de neutrófilos à cultura de célula endotelial e a quimiotaxia em câmara de Boyden. Em conjunto, estes ensa.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Ana Lucia Borges Shimada - Coordenador / Sandra Helena Poliselli Farsky - Integrante / Ferraz-de-Paula, Viviane - Integrante / Eric Diego Barioni - Integrante / Stephen Fernandes de Paula Rodrigues - Integrante / José Roberto Santin - Integrante.

2011 - Atual

ESTUDO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA DE NANOCÁPSULAS DE INDOMETACINA E ÉSTER ETÍLICO DE INDOMETACINA: ENSAIOS DE MICROSCOPIA INTRAVITAL

Descrição: Nos últimos anos, a nanotecnologia tem se destacado como uma ferramenta importante para o desenvolvimento de novos produtos nas mais variadas áreas, incluindo a farmacêutica. Dentre os diversos produtos nanotecnológicos disponíveis, os sistemas nanoparticulados ganham destaque por proporcionar vetorização de forma sustentada e atuar como carreadores de fármacos, aumentando a eficácia terapêutica. Estas características são fundamentais para o tratamento de inúmeras doenças, dentre as quais, as neoplasias. Apesar das inúmeras vantagens dos nanofármacos antineoplásicos, os parâmetros farmacológicos e toxicológicos desta estratégia terapêutica precisam ser melhor entendidos. Neste contexto, o presente estudo visa avaliar a atividade anti-carcinogênica e os possíveis efeitos tóxicos de nanocápsulas de indometacina e éster etílico de indometacina (associados ou não) e de sua formulação usual. Para tanto, os ensaios in vivo serão realizados em camundongas C57BL6. O tumor cerebral será induzido in vivo pela inoculação intracraniana da linhagem de células GL261 de glioma maligno de camundongo, 10 dias antes do início dos tratamentos. Os tratamentos serão realizados em dois protocolos distintos: 1) para avaliação da cinética de distribuição no tecido cerebral, os fármacos, marcados com fluoróforos serão administrados, nas doses de 1 ou 5 mg/kg, 30 minutos, 2 horas ou 4 horas, por via oral e intravenosa, ou 2) serão administrados uma vez dia, por via oral ou intraperitoneal, durante 10 dias, para avaliação do desenvolvimento tumoral ou para avaliação de parâmetros microcirculatórios. Os ensaios de microscopia intravital serão realizados para avaliar a distribuição das nanocápsulas na microcirculação do tecido cerebral, bem como a interação leucócito-endotélio, leucócito-plaqueta e plaqueta-endotélio, formação de trombos e de áreas hemorrágicas em vasos da microcirculação cerebral..

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Ana Lucia Borges Shimada - Coordenador / Farsky, Sandra Helena Poliselli - Integrante / André Nakasato - Integrante / Stephen Fernandes de Paula Rodrigues - Integrante / José Roberto Santin - Integrante / Carine Cristiane Drewes - Integrante.

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Auxílio financeiro.

2009 - Atual

Efeitos da exposição in vivo à hidroquinona sobre funções do tecido traqueal e de macrófagos alveolares de camundongos

Descrição: Projeto FAPESP no. 2009/03964-5..

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) .

Integrantes: Ana Lucia Borges Shimada - Integrante / Sandra Helena Poliselli Farsky - Coordenador.

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo -

	<p>Bolsa. Número de produções C, T & A: 16</p>
2005 - 2006	<p>Projeto de Iniciação Científica: Padronização e Validação de Técnica para a Determinação de Mercúrio em Material Biológico</p> <p>Descrição: Projeto Iniciação Científica Período 01/08/2005 a 31/07/2006 Carga Horária 960 horas. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Graduação: (1) .</p> <p>Integrantes: Ana Lucia Borges Shimada - Integrante / Miguel Machinski Jr - Integrante / Paula Nishiyama - Coordenador / Gisele Neumann Zanella - Integrante.</p> <p>Número de produções C, T & A: 1</p>

Projetos de extensão

2007 - 2008	<p>Projeto Extensão: Assistência Farmacêutica para o Aprimoramento do Profissional Farmacêutico</p> <p>Descrição: 95 horas/aula. Situação: Concluído; Natureza: Extensão. Alunos envolvidos: Graduação: (4) .</p> <p>Integrantes: Ana Lucia Borges Shimada - Integrante / Elisiane Coan Boian - Integrante / Patrícia de Souza Bonfim - Integrante / Cássia Lopes Paixão - Integrante / Angela Maria Campanha - Coordenador / Raquel Soares Tasca - Integrante.</p>
2006 - 2007	<p>Número de produções C, T & A: 6</p> <p>Projeto Extensão: Atenção Farmacêutica às Pessoas Atendidas pelo Programa de Medicamentos Excepcionais</p> <p>Descrição: Para promover o acesso da população brasileira a medicamentos de qualidade em quantidade adequada ao menor preço possível, o Ministério da Saúde, vem implementando, desde 1998, ações que expressam de forma articulada os eixos assumidos no desenho da Política Nacional de Medicamentos. Uma dessas ações é o Programa de Medicamentos Excepcionais, onde são distribuídos gratuitamente medicamentos utilizados no nível ambulatorial, onde a maioria deles é de elevado valor unitário ou de uso crônico. Em termos operacionais, os Estados é que planejam a aquisição desses medicamentos a partir das necessidades da população e controlam a distribuição e os estoques. Pretende-se com este projeto, acompanhar as pessoas que são beneficiadas por este Programa, levando informações e orientações tanto sobre a sua patologia ou agravo à saúde quanto dos medicamentos utilizados, de forma particular sobre a ocorrência de reações adversas a medicamentos. período 01/05/2006 a 31/12/2006 384h - bolsista período 01/01/2007 a 31/03/2007 e 01/05/2007 a 31/12/2007 528h - bolsista . Situação: Concluído; Natureza: Extensão. Alunos envolvidos: Graduação: (2) .</p> <p>Integrantes: Ana Lucia Borges Shimada - Integrante / Paula Nishiyama - Coordenador / Luiz Peraro - Integrante / Milca Ribeiro Saruhashi - Integrante / Anderson Rodrigo Oliveira - Integrante / João Henrique Torquato Oliveira - Integrante. Financiador(es): Universidade Estadual de Maringá - Bolsa. Número de produções C, T & A: 4</p>
2004 - 2005	<p>Projeto Extensão: Atenção Farmacêutica às pessoas atendidas pelo Programa de Medicamentos Excepcionais</p> <p>Descrição: Para promover o acesso da população brasileira a medicamentos de qualidade em quantidade adequada ao menor preço possível, o Ministério da Saúde, vem implementando, desde 1998, ações que expressam de forma articulada os eixos assumidos no desenho da Política Nacional de Medicamentos. Uma dessas ações é o Programa de Medicamentos</p>

Excepcionais, onde são distribuídos gratuitamente medicamentos utilizados no nível ambulatorial, onde a maioria deles é de elevado valor unitário ou de uso crônico. Em termos operacionais, os Estados é que planejam a aquisição desses medicamentos a partir das necessidades da população e controlam a distribuição e os estoques. Pretende-se com este projeto, acompanhar as pessoas que são beneficiadas por este Programa, levando informações e orientações tanto sobre a sua patologia ou agravo à saúde quanto dos medicamentos utilizados, de forma particular sobre a ocorrência de reações adversas a medicamentos. Carga Horária: período 01/09/2004 a 30/06/2005 324h .

Situação: Em andamento; Natureza: Extensão.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Especialização: (0) / Mestrado acadêmico: (0) / Mestrado profissional: (0) / Doutorado: (0) .

Integrantes: Ana Lucia Borges Shimada - Integrante / Paula Nishiyama - Coordenador / Milca Ribeiro - Integrante.

Financiador(es): Universidade Estadual de Maringá - Bolsa.

Outros Projetos

2007 - 2008

Projeto Ensino: Vivência no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Regional de Maringá.

Descrição: 70 horas/aula.

Situação: Concluído; Natureza: Outra.

Integrantes: Ana Lucia Borges Shimada - Integrante / Paula Nishiyama - Coordenador.

2006 - 2006

Projeto Ensino: Melhoria do Ensino Profissionalizante em Farmácia

Descrição: Setor: Farmácia Ensino 62 horas/aula.

Situação: Concluído; Natureza: Outra.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) .

Integrantes: Ana Lucia Borges Shimada - Integrante / Raquel Soares Tasca - Coordenador.

2004 - 2006

Projeto Ensino: Sistematização das Análises Toxicológicas

Descrição: O Laboratório de Toxicologia do Departamento de Análises Clínicas (DAC) desenvolve atividades de pesquisa e extensão a fim de subsidiar o ensino de Toxicologia. São realizadas análises laboratoriais de urgência para o esclarecimento e/ou confirmação de suspeitas de intoxicações agudas ou não, para o acompanhamento de pessoas intoxicadas, para o controle do grau de exposição a medicamentos, drogas de abuso e produtos químicos de uso ocupacional. Como o Laboratório atende solicitações provenientes do LEPAC (Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas), Hospital Universitário e demais segmentos, este projeto tem como objetivo sistematizar e organizar as análises realizadas por este Laboratório, desenvolvendo e implementando a informatização dos dados para melhorar a qualidade das informações existentes e facilitar o seu uso nas atividades de ensino, pesquisa e extensão. Período 19/7/2004 a 30/04/2006 Carga Horária 360 horas/aula.

Situação: Concluído; Natureza: Outra.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Especialização: (0) / Mestrado acadêmico: (0) / Mestrado profissional: (0) / Doutorado: (0) .

Integrantes: Ana Lucia Borges Shimada - Integrante / Erika Bando - Integrante / Miguel Machinski Jr - Integrante / Paula Nishiyama - Coordenador.

Financiador(es): Universidade Estadual de Maringá - Cooperação.

Número de produções C, T & A: 8

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Farmacologia / Subárea: Toxicologia.
2. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Análise Toxicológica/Especialidade: Imunotoxicologia. 3.
- Grande área: Ciências Biológicas / Área: Farmacologia / Subárea: Farmacologia Geral. 4.
- Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Análise Toxicológica. 5.
- Grande área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública.

Idiomas

Português	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Inglês	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Espanhol	Compreende Bem, Fala Pouco, Lê Bem, Escreve Pouco.

Prêmios e títulos

2012	2º lugar no prêmio Jovem Cientista Prof. Dr. Mario Mariano, categoria Doutorado, área Biológicas, na apresentação Oral da XXI Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli, Universidade de São Paulo/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
2012	(co-autora) 2º Lugar no Prêmio Jovem Cientista Prof. Dr. Mario Mariano, categoria Mestrado, área Biológicas, na apresentação Oral da XXI Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli, Universidade de São Paulo/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
2011	(co-autora) 1º lugar apresentação oral da área Toxicologia Experimental no XVII Congresso Brasileiro de Toxicologia, Sociedade Brasileira de Toxicologia - SBTOX.

Produções

Produção bibliográfica

Citações

Web of Science

Total de trabalhos:5 Total de citações:13

Fator H:3

Shimada, Ana Lucia B Data: 13/02/2014

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica ▼

1. ★ CARVALHO, A. L. N. ; ANNONI, R. ; TORRES, L. H. L. ; DURAO, A. C. C. S. ; **SHIMADA, A.L.B.** ; ALMEIDA, F. M. ; HEBEDA, C. B. ; LOPES, F. D. T. Q. S. ; DOLHNIKOFF, M. ; MARTINS, M. A. ; SILVA, L. ; FARSKY, S. ; SALDIVA, P. ; ULRICH, C. M. ; OWEN, R. ; MARCOURAKIS, T. ; MAUAD, T. . Anacardic Acids from Cashew Nuts Ameliorate Lung Damage Induced by Exposure to Diesel Exhaust Particles in Mice. Evidence-Based Complementary and Alternative

Medicine (Print) **JCR**, v. 2013, p. 1-13, 2013.

Citações: **WEB OF SCIENCE** 1 | **SCOPUS** 2

2. ★ CARRAU, GONZALO ; DREWES, CARINE C. ; **SHIMADA, ANA LÚCIA B.** ; BERTUCCI, ANA ; FARSKY, SANDRA H.P. ; STEFANI, HELIO A. ; GONZALEZ, DAVID . Synthesis and preliminary biological evaluation of a compound library of triazolylcyclytols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry (Print)* **JCR**, v. 21, p. 4225-4232, 2013.

3. ★ **Shimada, Ana Lúcia Borges** ; Ribeiro, André Luiz Teroso ; Bolonheis, Simone Marques ; Ferraz-de-Paula, Viviane ; Hebeda, Cristina Bichels ; Farsky, Sandra Helena Poliselli . In vivo hydroquinone exposure impairs MCP-1 secretion and monocyte recruitment into the inflamed lung. *Toxicology (Amsterdam)* **JCR**, v. 296, p. 20-26, 2012.

Citações: **WEB OF SCIENCE** 5 | **SCOPUS** 6

4. ★ **Shimada, Ana Lúcia Borges** ; Lino-dos-Santos-Franco, Adriana ; Bolonheis, Simone Marques ; Nakasato, André ; Damazo, Amílcar Sabino ; Tavares-de-Lima, Wothan ; Farsky, Sandra Helena Poliselli . In vivo hydroquinone exposure causes tracheal hyperresponsiveness due to TNF secretion by epithelial cells. *Toxicology Letters* **JCR**, v. 211, p. 10-17, 2012.

Citações: **WEB OF SCIENCE** 4 | **SCOPUS** 5

5. ★ Ribeiro, André Luiz Teroso ; **Shimada, Ana Lúcia Borges** ; Hebeda, Cristina Bichels ; de Oliveira, Tiago Franco ; de Melo Loureiro, Ana Paula ; Filho, Walter dos Reis Pereira ; Santos, Alcinéa Meigikos dos Anjos ; de Lima, Wothan Tavares ; Farsky, Sandra Helena Poliselli . In vivo hydroquinone exposure alters circulating neutrophil activities and impairs LPS-induced lung inflammation in mice. *Toxicology (Amsterdam)* **JCR**, v. 288, p. 1-7, 2011.

Citações: **WEB OF SCIENCE** 6 | **SCOPUS** 8

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. BOIAN, Elisiane Coan ; BOIAN, Marciele Coan ; BORELLI, S. ; **SHIMADA, Ana Lucia Borges** . Detecção de Antígenos HLA Classe I solúveis no plasma dos grupos étnicos: Caucásios e Mulatos. In: II Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS, 2007, Maringá. Anais do II Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS, 2007.

2. **SHIMADA, Ana Lucia Borges** ; NISHIYAMA, Paula ; SARUHASHI, Milca Ribeiro ; OLIVEIRA, João Henrique Torquato ; OLIVEIRA, Anderson Rodrigo ; PERARO, Luiz ; SHIMAZAKI, Lúcia Toshico . Medicamentos de alto custo utilizados no tratamento da osteoporose. In: II Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS, 2007, Maringá. Anais do II Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS, 2007.

3. SARUHASHI, Milca Ribeiro ; **SHIMADA, Ana Lucia Borges** ; PERARO, Luiz ; SHIMAZAKI, Lúcia Toshico ; NISHIYAMA, Paula ; OLIVEIRA, Anderson Rodrigo . Orientação farmacêutica às pessoas portadores da Doença de Alzheimer. In: II Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS, 2007, Maringá. Anais do II Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS, 2007.

4. **SHIMADA, Ana Lucia Borges** ; TASCA, Raquel Soares ; CAMPANHA, Angela Maria ; BONFIM, Patrícia de Souza ; BOIAN, Elisiane Coan ; PAIXAO, Cássia Lopes . Benzodiazepínicos Dispensados pela Farmácia Ensino da Universidade Estadual de Maringá no Período de 1996 a Junho de 2007. In: II Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS, 2007, Maringá. Anais do II Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS, 2007.

5. BOIAN, Elisiane Coan ; BONFIM, Patrícia de Souza ; CAMPANHA, Angela Maria ; PAIXAO, Cássia Lopes ; **SHIMADA, Ana Lucia Borges** ; TASCA, Raquel Soares . Dispensação de Psicofármacos na Farmácia Ensino da Universidade Estadual de Maringá - Paraná, no Período de Janeiro de 1996 a Junho de 2007. In: II Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS, 2007, Maringá. Anais do II Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS, 2007.

6. BOIAN, Elisiane Coan ; BONFIM, Patrícia de Souza ; CAMPANHA, Angela Maria ; PAIXAO, Cássia Lopes ; **SHIMADA, Ana Lucia Borges** ; TASCA, Raquel Soares . Evolução da Dispensação dos Medicamentos Psicotrpicos Anorexígenos na Farmácia Ensino da Universidade Estadual de Maringá - Paraná, no Período de Janeiro de 1996 a Junho de 2007. In: II Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS, 2007, Maringá. Anais do II Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS, 2007.

Resumos publicados em anais de congressos

1. RODRIGUES, S. F. P. ; FIEL, L. A. ; LOIOLA, R. A. ; **SHIMADA, A.L.B.** ; PEREIRA, N. R. ; GUTERRES, S. S. ; POHLMANN, A. R. ; FARSKY, S. . Indomethacin/Indomethacin Ester-Loaded Nanocapsules Reduce Brain Tumor of Mice: Mechanism of entrance into the brain, in vivo, and into the tumor cells, in vitro. In: 11th World congress on inflammation, 2013, Natal. *Immuno Natal 2013*, 2013. v. único. p. 54-54.
2. RODRIGUES, S. F. P. ; FIEL, L. A. ; LOIOLA, R. A. ; **SHIMADA, A.L.B.** ; PEREIRA, N. R. ; GUTERRES, S. S. ; POHLMANN, A. R. ; FARSKY, S. . Indomethacin/Indomethacin Ester-Loaded Nanocapsules Reduce Brain Tumor of Mice: Mechanism of entrance into the brain, in vivo, and into the tumor cells, in vitro. In: XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2013, São Paulo. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP, 2013. v. 49. p. 61-61.
3. **SHIMADA, A.L.B.** ; LOIOLA, R. A. ; RODRIGUES, S. F. P. ; FARSKY, S. . PCB126 INSTILLATION CAUSES INSULIN RESISTANCE AND OXIDATIVE STRESS IN ISLETS OF LANGERHANS OF WISTAR RATS. In: XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2013, São Paulo. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP, 2013. v. 49. p. 44-44.
4. RODRIGUES, S. F. P. ; FIEL, L. A. ; **SHIMADA, A.L.B.** ; LOIOLA, R. A. ; PEREIRA, N. R. ; GUTERRES, S. S. ; POHLMANN, A. R. ; FARSKY, S. . Indomethacin/indomethacin ester nanocapsules, but not indomethacin in solution, reduce brain tumor of mice. In: XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2013, Porto Alegre. Livro de resumos do CBTOX, 2013. v. único.
5. **SHIMADA, A.L.B.** ; LOIOLA, R. A. ; RODRIGUES, S. F. P. ; CRUZ, W. S. ; SA-NUNES, A. ; FOCK, R. A. ; FARSKY, S. . PCB126 instillation reduces immunological responses and alters metabolic parameters: a role in diabetes generation/development?. In: XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2013, Porto Alegre. Livro de resumos do CBTOX, 2013. v. único.
6. **SHIMADA, A.L.B.** ; Lino dos Santos Franco, A. ; BOLONHEIS, S. M. ; de Lima, Wothan Tavares ; FARSKY, S. . Hydroquinone causes trachea hyperresponsiveness dependent on TNF- α secretion from epithelium. In: Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas, XVI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2011, São Paulo. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011. v. 47. p. 64-64.
7. BOLONHEIS, S. M. ; **SHIMADA, A.L.B.** ; SIMMONS, S. ; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. ; FARSKY, S. . Amblyomin-X, a kunitz serineprotease inhibitor enhances phagocytosis of *Candida albicans* in THP-1 derived macrophages. In: Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas, XVI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2011, São Paulo. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011. v. 47. p. 55-55.
8. **SHIMADA, Ana Lucia Borges** ; RIBEIRO, A. L. T. ; HEBEDA, C. B. ; LIMA, W. T. ; FARSKY, S. . Effects of Hydroquinone inhalation on secretion of trachea cells. In: XII International Congress of Toxicology, 2010, Barcelona. *Toxicology Letters*, 2010. p. 34.
9. RIBEIRO, A. L. T. ; **SHIMADA, Ana Lucia Borges** ; HEBEDA, C. B. ; LIMA, W. T. ; FARSKY, S. . Inhaled Hydroquinone effects on leukocyte recruitment into the lung and adhesion molecules from circulating blood. In: XII International Congress of Toxicology, 2010, Barcelona. *Toxicology Letters*, 2010. p. 33-34.
10. RIBEIRO, A. L. T. ; **SHIMADA, Ana Lucia Borges** ; SILVA, P. C. B. ; HEBEDA, C. B. ; LIMA, W. T. ; FARSKY, S. . Effects of Inhalation of Hydroquinone on Lung Leukocyte Recruitment Induced by LPS. In: XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF/USP, 2009, São Paulo. *Anais da XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF/USP*, 2009.
11. **SHIMADA, Ana Lucia Borges** ; RIBEIRO, A. L. T. ; SILVA, P. C. B. ; HEBEDA, C. B. ; LIMA, W. T. ; FARSKY, S. . Inhalation of Hydroquinone Impairs LPS-Induced Leukocyte Migration to the Lung. In: 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2009, Ribeirão Preto. *Anais do XLI Congresso de Farmacologia e Terapêutica Experimental*, 2009.
12. RIBEIRO, A. L. T. ; **SHIMADA, Ana Lucia Borges** ; HEBEDA, C. B. ; LIMA, W. T. ; FARSKY, S. . Effects of Inhalation of Hydroquinone on Phagocytic and Fungicidal Activities on Alveolar Macrophages. In: XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2009, Belo Horizonte-MG. *Revista Brasileira de Toxicologia*, 2009. v. 22. p. 220.

- 13. SHIMADA, Ana Lucia Borges** ; SARUHASHI, Milca Ribeiro ; PERARO, Luiz ; SHIMAZAKI, Lúcia Toshico ; OLIVEIRA, Anderson Rodrigo ; NISHIYAMA, Paula . Pharmaceutical Care to the Wilson 's Disease Patients. In: 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences, CIFARP, 2007, Ribeirão Preto. Anais do 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2007.
- 14. SHIMADA, Ana Lucia Borges** ; ZANELLA, Gisele Neumann ; MACHINSKI JR, Miguel ; NISHIYAMA, Paula . Exposição Ocupacional ao Mercúrio Metálico. In: I Congresso de Farmácia de Maringá, 2007, Maringá-PR. ADAPEC Arquivos, 2007. v. 11. p. 186.
- 15. SHIMADA, Ana Lucia Borges** ; SARUHASHI, Milca Ribeiro ; PERARO, Luiz ; SHIMAZAKI, Lúcia Toshico ; NISHIYAMA, Paula . O Programa de Medicamentos Excepcionais da 15ª Regional de Saúde do Estado do Paraná. In: I Congresso de Farmácia de Maringá, 2007, Maringá-PR. ADAPEC Arquivos, 2007. v. 11. p. 200.
- 16. SHIMADA, Ana Lucia Borges** ; BANDO, Erika ; MACHINSKI JR, Miguel ; NISHIYAMA, Paula . Identificação de Substâncias Psicoativas Ilícitas pelo Laboratório de Toxicologia da Universidade Estadual de Maringá. In: II Seminário sobre Prevenção e Tratamento da Dependência Química e III Semana de Prevenção ao Uso Indevido de Drogas, 2005, Maringá. II Seminário sobre Prevenção e Tratamento da Dependência Química e III Semana de Prevenção ao Uso Indevido de Drogas, 2005.
- 17. SHIMADA, Ana Lucia Borges** ; BANDO, Erika ; MACHINSKI JR, Miguel ; NISHIYAMA, Paula . Análises de Substâncias Psicoativas em Material Biológico. In: II Seminário sobre Prevenção e Tratamento da Dependência Química e III Semana de Prevenção ao Uso Indevido de Drogas, 2005, Maringá. II Seminário sobre Prevenção e Tratamento da Dependência Química e III Semana de Prevenção ao Uso Indevido de Drogas, 2005.
- 18. SHIMADA, Ana Lucia Borges** ; BANDO, Erika ; MACHINSKI JR, Miguel ; NISHIYAMA, Paula . Monitorização Biológica realizada pelo Laboratório de Toxicologia no ano de 2004. In: I Congresso Internacional de Saúde, V Seminário Científico do CCS e XVIII Semana da Integração de Farmácia, 2005, Maringá, 2005.
- 19.** NISHIYAMA, Paula ; BANDO, Erika ; **SHIMADA, Ana Lucia Borges** ; FERNANDES, Marcio Adriano ; MACHINSKI JR, Miguel . A contribuição do Laboratório de Análises Toxicológicas na Toxicovigilância. In: VI Congresso Nacional da Rede UNIDA, 2005, Belo Horizonte-MG. Olho Mágico (UEL). Londrina-PR, 2005. v. 12. p. 353-354.
- 20. SHIMADA, Ana Lucia Borges** ; BANDO, Erika ; MACHINSKI JR, Miguel ; NISHIYAMA, Paula . Análise Forense e Controle de Farmacodependência Realizadas pelo Laboratório de Toxicologia da UEM. In: XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2005, Recife-PE. Revista Brasileira de Toxicologia, 2005. v. 8. p. 186.

Apresentações de Trabalho

- 1.** RIBEIRO JUNIOR, G. ; VERAS, M. M. ; COSTA, N. S. X. ; **SHIMADA, A.L.B.** ; ALEMANY, A. A. S. ; SALDIVA, P. ; FARSKY, S. ; MAUAD, T. . Mice exposed to ambient particulate matter present alterations in gene expression of P21 and SIRT2. 2014. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
- 2. SHIMADA, A.L.B.** ; CRUZ, W. S. ; NAKASATO, A. ; FARSKY, S. . PCB126 Inhalation reduces the number and function of lymphocytes in rats. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- 3. SHIMADA, A.L.B.** ; GUERONI, D. ; SA-NUNES, A. ; FOCK, R. A. ; FARSKY, S. . Polychlorinated biphenyl exposure alters traffic pattern and cell adhesion molecules expression of lymphocytes. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- 4. SHIMADA, A.L.B.** ; LOIOLA, R. A. ; RODRIGUES, S. F. P. ; FARSKY, S. . PCB126 instillation causes insulin resistance and oxidative stress in islets of langerhans of Wistar rats. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- 5. SHIMADA, A.L.B.** ; LOIOLA, R. A. ; RODRIGUES, S. F. P. ; CRUZ, W. S. ; SA-NUNES, A. ; FOCK, R. A. ; FARSKY, S. . PCB126 instillation reduces immunological responses and alters metabolic parameters: a role in diabetes generation/development?. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- 6.** CRUZ, W. S. ; **SHIMADA, A.L.B.** ; FARSKY, S. . PCB126 instillation enhances aryl hydrocarbon receptor expression on rat 's tissue. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- 7. SHIMADA, A.L.B.** . Imunotoxicidade: O risco é real?. 2013. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

8. **SHIMADA, A.L.B.**; BOLONHEIS, S. M.; NAKASATO, A.; FARSKY, S. . Alterations on biological systems caused by in vivo PCB126 inhalation exposure in rats. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
9. **SHIMADA, A.L.B.**; CRUZ, W. S.; NAKASATO, A.; FARSKY, S. . Polychlorinated bipheny 126 inhalation alters metabolic parameters and inflammatory markers in rats. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
10. **SHIMADA, A.L.B.**; CRUZ, W. S.; NAKASATO, A.; FARSKY, S. . In vivo PCB126 inhalation exposure alters adhesion molecules expression on circulating leukocytes. 2012. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
11. **SHIMADA, A.L.B.**; CRUZ, W. S.; NAKASATO, A.; FARSKY, S. . Exposição inalatória ao PCB126 altera o número e função de leucócitos de ratos. 2012. (Apresentação de Trabalho/Outra).
12. **SHIMADA, A.L.B.** . Poluentes atmosféricos. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
13. **SHIMADA, A.L.B.**; Ribeiro, ALT; HEBEDA, C. B.; BOLONHEIS, S. M.; FARSKY, S. . Papel da MCP-1 no prejuízo da migração de leucócitos mononucleares (MN) após exposição in vivo à hidroquinona (HQ). 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
14. RIBEIRO, A. L. T.; **SHIMADA, A.L.B.**; HEBEDA, C. B.; OLIVEIRA, T.F.; PEREIRA FILHO, W. R.; SANTOS, A. M. A.; LOUREIRO, A. P. M.; FARSKY, S. . Efeitos da exposição in vivo a baixas concentrações de hidroquinona sobre o estresse oxidativo e sobre o recrutamento leucocitário para o pulmão inflamado. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
15. BOLONHEIS, S. M.; **SHIMADA, A.L.B.**; SIMMONS, S.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; FARSKY, S. . Amblyomin-X, a kunitz serineprotease inhibitor enhances phagocytosis of *Candida albicans* in THP-1 derived macrophages. 2011. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
16. **SHIMADA, A.L.B.**; Lino dos Santos Franco, A.; BOLONHEIS, S. M.; LIMA, W. T.; FARSKY, S. . Hydroquinone causes trachea hyperresponsiveness dependent on TNF- α secretion from epithelium. 2011. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
17. **SHIMADA, Ana Lucia Borges**; Ribeiro, ALT; HEBEDA, C. B.; LIMA, W. T.; FARSKY, S. . Effects of hydroquinone inhalation on secretion of trachea cells. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
18. RIBEIRO, A. L. T.; **SHIMADA, Ana Lucia Borges**; HEBEDA, C. B.; LIMA, W. T.; FARSKY, S. . Inhaled hydroquinone effects on leukocyte recruitment into the lung and adhesion molecules from circulating blood. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
19. **SHIMADA, Ana Lucia Borges**; RIBEIRO, A. L. T.; HEBEDA, C. B.; BOLONHEIS, S. M.; Lino dos Santos Franco, A.; LIMA, W. T.; FARSKY, S. . Effects of Hydroquinone inhalation on functions of tracheal tissue. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
20. Ribeiro, ALT; **SHIMADA, Ana Lucia Borges**; HEBEDA, C. B.; BOLONHEIS, S. M.; LIMA, W. T.; FARSKY, S. . In vivo Hydroquinone exposure affects leukocyte recruitment and adhesion molecules expression on LPS inflamed lung. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
21. **SHIMADA, Ana Lucia Borges**; Ribeiro, ALT; HEBEDA, C. B.; BOLONHEIS, S. M.; LIMA, W. T.; FARSKY, S. . Effects of Hydroquinone inhalation on functions of tracheal tissue. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
22. **SHIMADA, Ana Lucia Borges**; RIBEIRO, A. L. T.; SILVA, P. C. B.; HEBEDA, C. B.; LIMA, W. T.; FARSKY, S. . Inhalation of Hydroquinone Impairs LPS-induced Leukocyte Migration to the Lung. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
23. Ribeiro, ALT; **SHIMADA, Ana Lucia Borges**; SILVA, P. C. B.; HEBEDA, C. B.; LIMA, W. T.; FARSKY, S. . Effects of Inhalation of Hydroquinone on Lung Leukocyte Recruitment Induced by LPS. 2009. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
24. Ribeiro, ALT; **SHIMADA, Ana Lucia Borges**; HEBEDA, C. B.; LIMA, W. T.; FARSKY, S. . Effects of Inhalation of Hydroquinone on Phagocytic and Fungicidal Activities on Alveolar Macrophages. 2009. (Apresentação de

Trabalho/Congresso).

25. SHIMADA, Ana Lucia Borges ; SARUHASHI, Milca Ribeiro ; PERARO, Luiz ; OLIVEIRA, Anderson Rodrigo ; SHIMAZAKI, Lúcia Toshico ; NISHIYAMA, Paula . Pharmaceutical Care to the Wilson 's Disease Patients. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

26. SHIMADA, Ana Lucia Borges ; SARUHASHI, Milca Ribeiro ; PERARO, Luiz ; NISHIYAMA, Paula ; OLIVEIRA, Anderson Rodrigo ; SHIMAZAKI, Lúcia Toshico ; OLIVEIRA, João Henrique Torquato . Medicamentos de Alto Custo Utilizados no Tratamento da Osteoporose. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

27. SHIMADA, Ana Lucia Borges ; BOIAN, Elisiane Coan ; BONFIM, Patrícia de Souza ; PAIXAO, Cássia Lopes ; CAMPANHA, Angela Maria ; TASCA, Raquel Soares . Evolução da Dispensação dos Medicamentos Psicotrópicos Anorexígenos na Farmácia Ensino da Universidade Estadual de Maringá - Paraná, no Período de Janeiro de 1996 a Junho de 2007. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

28. SHIMADA, Ana Lucia Borges ; BONFIM, Patrícia de Souza ; BOIAN, Elisiane Coan ; PAIXAO, Cássia Lopes ; CAMPANHA, Angela Maria ; TASCA, Raquel Soares . Dispensação de Psicofármacos na Farmácia Ensino da Universidade Estadual de Maringá - Paraná, no Período de Janeiro de 1996 a Junho de 2007. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

29. SHIMADA, Ana Lucia Borges ; BONFIM, Patrícia de Souza ; BOIAN, Elisiane Coan ; PAIXAO, Cássia Lopes ; CAMPANHA, Angela Maria ; TASCA, Raquel Soares . Benzodiazepínicos Dispensados pela Farmácia Ensino da Universidade Estadual de Maringá no Período de 1996 a Junho de 2007. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

30. SHIMADA, Ana Lucia Borges ; SARUHASHI, Milca Ribeiro ; SHIMAZAKI, Lúcia Toshico ; PERARO, Luiz ; NISHIYAMA, Paula ; OLIVEIRA, Anderson Rodrigo . Orientação Farmacêutica às pessoas portadores da doença de Alzheimer. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

31. BOIAN, Elisiane Coan ; BOIAN, Marciele Coan ; BORELLI, S. ; **SHIMADA, Ana Lucia Borges** . Detecção de Antígenos HLA Classe I solúveis no plasma dos grupos étnicos: Caucasoídes e Mulatos. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

32. SHIMADA, Ana Lucia Borges ; SARUHASHI, Milca Ribeiro ; NISHIYAMA, Paula ; PERARO, Luiz ; SHIMAZAKI, Lúcia Toshico . Programa de Medicamentos Excepcionais: Os Primeiros Passos. 2006. (Apresentação de Trabalho/Outra).

33. SHIMADA, Ana Lucia Borges ; NISHIYAMA, Paula ; MACHINSKI JR, Miguel ; ZANELLA, Gisele Neumann . Exposição Ocupacional ao Mercúrio Metálico. 2006. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

34. SHIMADA, Ana Lucia Borges ; SARUHASHI, Milca Ribeiro ; NISHIYAMA, Paula ; PERARO, Luiz ; SHIMAZAKI, Lúcia Toshico . O Programa de Medicamentos Excepcionais da 15ª Regional de Saúde do Estado do Paraná. 2006. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

35. SHIMADA, Ana Lucia Borges ; BANDO, Erika ; MACHINSKI JR, Miguel ; NISHIYAMA, Paula . Monitorização Biológica Realizada pelo Laboratório de Toxicologia no ano de 2004. 2005. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

36. SHIMADA, Ana Lucia Borges ; BANDO, Erika ; MACHINSKI JR, Miguel ; NISHIYAMA, Paula . Identificação de Substâncias Psicoativas Ilícitas pelo Laboratório de Toxicologia da Universidade Estadual de Maringá. 2005. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

37. SHIMADA, Ana Lucia Borges ; BANDO, Erika ; MACHINSKI JR, Miguel ; NISHIYAMA, Paula . Análises de Substâncias Psicoativas em Material Biológico. 2005. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

38. SHIMADA, Ana Lucia Borges ; BANDO, Erika ; MACHINSKI JR, Miguel ; NISHIYAMA, Paula . Análise Forense e Controle de Farmacodependência Realizadas pelo Laboratório de Toxicologia da UEM. 2005. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

39. SHIMADA, Ana Lucia Borges ; BANDO, Erika ; FERNANDES, Marcio Adriano ; MACHINSKI JR, Miguel ; NISHIYAMA, Paula . A contribuição do Laboratório de Análises Toxicológicas na Toxicovigilância. 2005. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Bancas

Participação em bancas de trabalhos de conclusão

Monografias de cursos de aperfeiçoamento/especialização

1. **SHIMADA, A.L.B.**; MOSSINI, S. A. G.; NISHIYAMA, Paula. Participação em banca de Jorge Augusto Delatorre Alencar. Estudo dos Riscos Químicos em Trabalhadores de Galvanoplastia de Metais Sanitários. 2012. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Engenharia de Segurança do Trabalho) - Universidade Estadual de Maringá.
2. **SHIMADA, Ana Lucia Borges**; MOSSINI, S. A. G.; NISHIYAMA, Paula. Participação em banca de Ronaldo Egevarth Leme. Programa de Prevenção à Exposição Ocupacional ao Benzeno numa Empresa de Armazenagem de Produtos da Região de Maringá - PR. 2011. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Engenharia de Segurança do Trabalho) - Universidade Estadual de Maringá.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. FEBRACE - Feira Brasileira de Ciências e Engenharia. Avaliadora. 2014. (Encontro).
2. Society of Toxicology 52nd Annual Meeting. PCB126 Inhalation reduces the number and function of lymphocytes in rats. 2013. (Congresso).
3. 11th World Congress on Inflammation. POLYCHLORINATED BIPHENYL EXPOSURE ALTERS TRAFFIC PATTERN AND CELL ADHESION MOLECULES EXPRESSION OF LYMPHOCYTES. 2013. (Congresso).
4. XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia. Alterations on lymphocyte membrane molecule caused by in vivo PCB126 exposure. 2013. (Congresso).
5. 6th European Congress of Pharmacology. Alterations on biological systems caused by in vivo PCB126 inhalation exposure in rats. 2012. (Congresso).
6. XLVII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. 2012. (Congresso).
7. 44º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Polychlorinated biphenyl 126 inhalation alters metabolic parameters and inflammatory markers in rats. 2012. (Congresso).
8. FEBRACE - Feira Brasileira de Ciências e Engenharia. Avaliadora. 2012. (Encontro).
9. XVII Congresso Brasileiro de Toxicologia. 2011. (Congresso).
10. XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. 2011. (Congresso).
11. III Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas. 2011. (Simpósio).
12. VIII Semana de Estudos do curso de Biomedicina do Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio. Atuação profissional em pesquisa. 2011. (Outra).
13. XII International Congress of Toxicology. 2010. (Congresso).

14. 42º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. 2010. (Congresso).
15. XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia. 2009. (Congresso).
16. 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. 2009. (Congresso).
17. I Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Área de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 2009. (Simpósio).
18. Fórum de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 2009. (Encontro).
19. 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP). 2007. (Congresso).
20. II Congresso Internacional de Saúde, VI Seminário Científico do CCS. 2007. (Congresso).
21. . I Congresso de Farmácia de Maringá, II Encontro Científico do LEPAC e XIX Semana de Integração de Farmácia.. 2006. (Congresso).
22. .IV Fórum de Extensão e Cultura da UEM: Extensão Universitária - Intercâmbio de Saberes. 2006. (Outra).
23. .IV Semana de Prevenção ao Uso Indevido de Drogas. 2006. (Outra).
24. . I Congresso Internacional da Saúde, V Seminário Científico do CCS e XVIII Semana da Integração da Farmácia. 2005. (Congresso).
25. II Maratona de Revezamento Volta de Maringá Pare de Fumar Correndo.Monitora. 2005. (Outra).
26. .II Seminário sobre Prevenção e Tratamento da Dependência Química e III Semana de Prevenção ao uso Indevido de Drogas. 2004. (Seminário).
27. .Evento de Extensão VII Semana de Artes, VI Mostra do Museu Dinâmico Interdisciplinar, II Mostra Intregada de Ensino, Pesquisa e Extensão e V Simpósio da APADEC. 2004. (Outra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. MARCOURAKIS, T. ; **SHIMADA, Ana Lucia Borges** ; TORRES, L. H. L. ; ELLER, S. C. W. S. ; DREWES, C. C. ; BAIRROS, A. V. . II Escola de Inverno em Toxicologia. 2013. (Outro).
2. PINTO JR., E. ; TORRES, L. H. L. ; ALMEIDA, R. M. ; **SHIMADA, A.L.B.** ; RIBEIRO, A. L. T. ; OLIVEIRA, C. D. ; FIGUEIREDO, N. G. . I Escola de Inverno em Toxicologia. 2012. (Outro).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 15/03/2015 às 20:55:53

7.3 Aprovação do comitê de ética no uso de animais



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

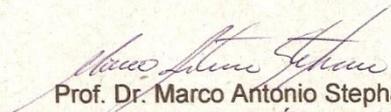
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/48/2011

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "Estudo experimental da exposição ao PCB126 sobre a indução de Diabetes Mellitus tipo II" (Protocolo CEUA/FCF/315), de responsabilidade da pesquisadora **Ana Lucia Borges Shimada**, sob a orientação da Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 02 de maio de 2011.

São Paulo, 03 de maio de 2011.


Prof. Dr. Marco Antonio Stephano

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF 45/2013

São Paulo, 09 de abril de 2013.

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), em reunião realizada em 08 de abril de 2013, apreciou as alterações propostas para o projeto de pesquisa “**Estudo experimental da exposição ao PCB126 sobre a indução de Diabetes Mellitus tipo II**” (Protocolo CEUA nº 315), a saber: inclusão de 140 animais.

Sobre o assunto, a CEUA **aprova a inclusão de 100 animais**. Observou-se que as análises referentes aos experimentos 1, 2 e 3 delineados no formulário poderiam ser realizadas no mesmo grupo de 20 animais. O mesmo procedimento de preparo das amostras é descrita para os experimentos 1 e 2 no item 4.6 do projeto. Como a quantidade de material necessário para essas análises não é grande, os tecidos poderiam ser fracionados para atender as diferentes análises.

Cordialmente,

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

Ilmo(a) Sr(a).
Ana Lucia Borges Shimada
Orientador(a)/supervisor(a): Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky
FBC/FCF/USP