

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

Emily Pansera Waczuk

**EFEITO TOXICOLÓGICO EM NINFAS DE *Nauphoeta cinerea* (BLATTODEA:
BLABERIDAE) EXPOSTAS POR INALAÇÃO AO 4-VINILCICLOHEXENO**

**Santa Maria, RS, Brasil
2019**

Emily Pansera Waczuk

EFEITO TOXICOLÓGICO EM NINFAS DE *Nauphoeta cinerea* (BLATTODEA: BLABERIDAE) EXPOSTAS POR INALAÇÃO AO 4-VINILCICLOHEXENO

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica (PPGBTox), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientador: Prof. Dr. Daniel Mendes Pereira Ardisson-Araújo

Co-orientadora: Profa. Dra. Nilda Berenice de Vargas Barbosa

**Santa Maria, RS, Brasil
2019**

Waczuk, Emily Pansera
EFEITO TOXICOLÓGICO EM NINFAS DE *Nauphoeta cinerea*
(BLATTODEA: BLABERIDAE) EXPOSTAS POR INALAÇÃO AO 4
VINILCICLOHEXENO / Emily Pansera Waczuk. - 2019.
82 p.; 30 cm

Orientador: Dr. Daniel Mendes Pereira Ardisson-Araújo
Coorientadora: Dra. Nilda Berenice de Vargas Barbosa.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de
Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2019

1. Composto 4-Vinilciclohexeno 2. Toxicidade no sistema reprodutor
3. Neurotoxicidade 4. Estresse oxidativo 5. *Nauphoeta cinerea* I. Mendes
Pereira Ardisson-Araújo, Dr. Daniel II. de Vargas Barbosa, Dra. Nilda
Berenice III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

© 2019

Todos os direitos autorais reservados a Emily Pansera Waczuk

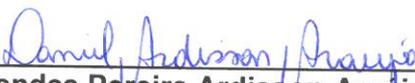
A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Emily Pansera Waczuk

EFEITO TOXICOLÓGICO EM NINFAS DE *Nauphoeta cinerea* (BLATTODEA: BLABERIDAE) EXPOSTAS POR INALAÇÃO AO 4-VINILCICLOHEXENO

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica (PPGBTox), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

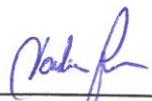
Aprovada em 28 de Outubro de 2019.


Prof. Dr Daniel Mendes Pereira Ardisson-Araujo (UFSM)
Presidente/Orientador


Prof. Dra. Daiana Silva de Ávila (UNIPAMPA)


Prof. Dr. Elgion Lúcio da Silva Loreto (UFSM)


Prof. Dra. Maria Ester Pereira (UFSM)


Prof. Dr. Vanderlei Folmer (UNIPAMPA)

Santa Maria, RS,
2019

DEDICATÓRIA

“Dedico imensuravelmente a Deus e a toda a minha família...”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente perdão Jesus Cristo/Deus Pai Todo Poderoso e muito obrigada eternamente por tudo: pelos verdadeiros ensinamentos, pelo seu amor tão grande e incondicional, pela força, pela luz, pela proteção, pela paz, pelo amparo e pela oportunidade de crescimento. Muito obrigada por permitir que eu continuasse essa caminhada com fé e coragem até o final dessa etapa, concedendo-me a capacidade de superar os obstáculos e de finalizar as atividades propostas!!! Obrigada por existir em nossas vidas!!! Muito obrigada!!!

Aos meus pais (Osvaldo Waczuk e Janete L. Pansera Waczuk) e meu irmão (Osvaldo Junior Pansera Waczuk) muito obrigada pelo cuidado, amor incondicional, coragem transmitida, segurança e proteção. Muito obrigada por todo o apoio que me passaram para que eu pudesse chegar a este momento. Obrigada pelo incentivo à minha formação!!! Obrigada por vocês existirem!!!! Amo muito vocês!!!

Aos meus familiares, especialmente a Arlete T. Pancera Waczuk, Orlando Waczuk, Greice Pancera Waczuk, Katlyn Pancera Waczuk, Eduardo Waczuk Borghelotti, Flora Pansera, Roberto Rigoni, Vera L. Rigoni, Kely Rigoni e Djonathan Waczuk muito obrigada pelo incentivo e carinho!!!

Aos meus orientadores do passado e do presente, juntamente com os professores (as) e coordenação do PPGBtox agradeço pelas oportunidades concedidas, parcerias, incentivo, compreensão, convivência, aprendizado e orientação!!! Muito obrigada à todos (as)!!!

Agradeço o professor Dr. Roger Wagner por ter nos ajudado na quantificação do composto. Muito obrigada pelo amparo, confiança, auxílio, orientação e incentivo sempre!!!!

Agradeço a todos os meus amigos (as), pela amizade verdadeira, brincadeiras, incentivo e força transmitida!!!! Muito obrigada mesmo!!!!

Agradeço aos meus colegas da pós-graduação pela parceria, pesquisa e companheirismo.

Às minhas queridas amigas (os), querido A. G., querida Geni (S. G.), querida Dileta (P.X.), A. T., X.P.P., querida Jaci, A., J., A., SeT. Or., C. e D.; ao B., querida Gorete e principalmente ao G. P. O. o meu muito obrigada por tudo..., pela existência de vocês nessa vida...!!! Sou eternamente grata a vocês queridas (os)!!! Muito Obrigada!!!

Agradeço em especial minhas amigas Auria Turcato Ceccon e Jucéli Borges Ribeiro pela amizade, apoio e pelos momentos de descontração. Muito obrigada!!!

Agradeço a banca examinadora que, gentilmente, aceitou o convite para participar da defesa desta tese.

Agradeço a CAPES, pela bolsa de doutorado.

“A todas as pessoas que sempre verdadeiramente torceram por mim, me incentivaram e hoje comemoram comigo mais esta conquista!!!”

MUITO OBRIGADA!!!

Epígrafe

***“ a melhor maneira que o homem dispõe para se
aperfeiçoar é aproximar-se de Deus...”***

(Pitágoras)

RESUMO

EFEITO TOXICOLÓGICO EM NINFAS DE *Nauphoeta cinerea* (BLATTODEA: BLABERIDAE) EXPOSTAS POR INALAÇÃO AO 4-VINILCICLOHEXENO

AUTORA: Emily Pansera Waczuk

ORIENTADOR: Dr. Daniel Mendes Pereira Ardisson-Araújo

A exposição de maneira ocupacional a inúmeros agentes tóxicos, incluindo os compostos orgânicos voláteis vem gerando agravos à saúde humana, correlacionados ao surgimento de inúmeras doenças. O composto orgânico volátil 4-vinilciclohexeno (VCH) é um contaminante ambiental bem conhecido e vem sendo investigado devido aos seus efeitos ovotóxicos em vários organismos. Entretanto, os mecanismos subjacentes a sua toxicidade, bem como os efeitos nocivos causados a outros órgãos, são incertos. Neste trabalho, foram avaliados alguns sinais de toxicidade induzidos pela exposição ao VCH espontaneamente volatilizado usando ninfas da espécie *Nauphoeta cinerea*. As ninfas foram expostas ao VCH por inalação durante 70 dias. Para a quantificação dos níveis de VCH nas caixas metabólicas foi empregado a técnica de Headspace associada à cromatografia de fase gasosa com detector de ionização de chama. Foram avaliados durante o período experimental as taxas de sobrevivência, o peso corporal total e de alguns tecidos (cabeça, corpo gorduroso e órgãos reprodutores imaturos), o consumo de ração e água e a produção de fezes. Além disso, foram avaliados *in vitro* as atividades enzimáticas das enzimas glutationa-S-transferase (GST), acetilcolinesterase (AChE) e dos níveis de espécies reativas dos tecidos isolados nos períodos de 35 e 70 dias de exposição ao VCH espontaneamente volatilizado. Os níveis da concentração de VCH volatilizado variou entre 3,41 e 7,03 nmol/mL. A exposição ao VCH espontaneamente volatilizado causou uma redução de 35% na taxa de sobrevivência dos animais expostos. As ninfas expostas durante 35 e 70 dias tiveram uma redução no ganho de peso corporal de 1,8 e 2,6 vezes, respectivamente, com uma redução no peso da cabeça, do corpo gorduroso e dos órgãos reprodutivos em maturação. Durante o período de exposição houve também nas ninfas uma diminuição significativa no consumo de ração e na produção de fezes. Apesar disso, a exposição não alterou o consumo de água, exceto no vigésimo dia. Em relação aos marcadores bioquímicos, verificou-se que a atividade enzimática da GST em todos os tecidos avaliados foi significativamente aumentada pelo VCH volatilizado após 35 e 70 dias de exposição. O corpo gorduroso apresentou a atividade da GST mais proeminente, especialmente após 35 dias de exposição, 1,6 vezes maior que o grupo controle. A exposição ao VCH espontaneamente volatilizado causou também um aumento significativo nos níveis das espécies reativas no corpo gorduroso de 1,35 vezes e 1,47 vezes após 35 e 70 dias, respectivamente. Em nenhum dos períodos avaliados a atividade da AChE da cabeça foi afetada. Não se sabe se essas alterações podem comprometer a funcionalidade dos tecidos/organismo envolvido versus os efeitos observados. Portanto, os resultados confirmaram o impacto prejudicial da inalação do VCH volatilizado e evidenciam a barata *N. cinerea* como um modelo valioso de triagem toxicológica inicial, a fim de investigar os toxicantes ambientais.

Palavras-chave: 4-vinilciclohexeno, *Nauphoeta cinerea*, Extresse oxidativo.

ABSTRACT

TOXICOLOGICAL EFFECTS OF EXPOSURE OF 4-VINYLCYCLOHEXENE BY INHALATION IN NYMPHS OF *Nauphoeta cinerea* (BLATTODEA: BLABERIDAE)

AUTHOR: EMILY PANSERA WACZUK

ADVISOR: DR. DANIEL MENDES PEREIRA ARDISSON DE ARAÚJO

Exposure to numerous toxic agents, including occupational exposure to volatile organic compounds has generated numerous health problems in humans, which are correlated to the emergence of numerous diseases. The volatile organic compound 4-vinylcyclohexene (VCH) is a well-known environmental contaminant whose toxicity has been investigated due to its ovotoxic effects on various organisms. However, the mechanisms underlying its toxicity, as well as its harmful effects on other organs, are uncertain. In this study, we evaluated some signs of toxicity induced by exposure to volatilized VCH using nymphs of *Nauphoeta cinerea*. Nymphs were exposed to VCH by inhalation for 70 day; thereafter the headspace technique associated with gas chromatography with flame ionization detector was utilized to quantify the levels of VCH in the boxes. The survival rates, total body weight, weight of some tissues (head, fat body and reproductive organs), food and water consumption, and feces production were evaluated during the experimental period. In addition, activities of glutathione-S-transferase (GST), acetylcholinesterase (AChE), and levels of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) of isolated tissues were evaluated after 35 and 70 days of spontaneous exposure to volatilized VCH. The levels of volatilized VCH ranged from 3.41 to 7.03 nmol/mL. Exposure to spontaneously volatilized VCH caused a 35% reduction in the survival rate of exposed animals. Nymphs exposed to volatilized VCH for 35 and 70 days had a reduction in body weight by 1.8 and 2.6 times respectively, consequently a reduction in the head, fat body and immature reproductive organs were observed. During the period of exposure, there was also a significant decrease in food intake and feces production in the nymphs. Nevertheless, the exposure did not alter water consumption, except on the twentieth day. Moreover, GST activity increased in all the tissues evaluated after 35 and 70 days of exposure. The fat body presented the most prominent increase in GST activity, specifically after 35 days of exposure, 1.6 times larger than the control group. Exposure of nymphs to volatilized VCH also caused a significant increase in the levels of reactive species in the fat body by 1.35 and 1.47 times after 35 and 70 days respectively. However, there was no significant difference in the head AChE activity after 35 and 70 days. It is not clear if the changes in GST activity and body-weight could compromise the functioning of the tissues/organism involved due to the effects observed, which reinforces the need for further research. Therefore, our results support the harmful impact of volatilized VCH inhalation and demonstrates that the cockroach of the species of *N. cinerea* is a valuable model for initial toxicological screening to investigate environmental toxicants.

Keywords: 4-vinylcyclohexene, *Nauphoeta cinerea*, Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 - 4-Vinilciclohexeno.....	20
Figura 2 - Mecanismo de metabolização do VCH no fígado (1A) e no ovário (1B)	21
Figura 3 - Barata <i>Nauphoeta cinerea</i>	40
Figura 4 - Ciclo de vida da barata <i>Nauphoeta cinerea</i>	41

ARTIGO

Figure 1 - Kaplan–Meier survival curves for 70 days cockroach nymphs lifespan when exposed by inhalation (red line) or not (control) to 4-Vinylcyclohexene (VCH).....	46
Figure 2 - Water/food consumption and feces production of nymphs exposed to volatilized VCH measured every 10 days for 70 days of exposure.....	47
Figure 3 - Glutathione S-transferase activity of nymphs exposed to volatilized VCH during 35 (n=12 individuals) and 70 days (n=28 individuals).....	48
Figure 4 - Reactive species levels in nymphs exposed to volatilized VCH during 35 and 70 days.....	48

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 - Órgãos alvo de toxicidade aguda e crônica.....	22
Tabela 2 - Ações dos agentes antioxidantes.....	36

ARTIGO

Table 1 - Determination of VCH levels of air samples during the treatment	46
Table 2 - Impact of volatilized VCH inhalation in nymphs of <i>Nauphoeta cinerea</i> after 35 and 70 days of exposure on weight gain of total insect body, head, fat body, and maturing reproductive organs.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
APAF – 1	Fator ativador da apoptose 1
CAT	Catalase
CG-DIC	Cromatógrafo à gás com detector de ionização de chama (do Inglês: Gas Chromatography - Flame Ionization Detector, GC-FID)
Cu	Cobre
DCFH	2´7´diclorofluoresceína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GST	Glutathione S-transferase
HHG	Hipotalâmico-hipofisário-gonadal
HJ	Hormônio juvenil
mEH	Epóxido hidrolase microssomal
Mn	Magnésio
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
Se	Selênio
SOD	Superóxido dismutase
TNF	Fator de necrose tumoral
UV	Radiação ultravioleta
VCH	4-vinilciclohexeno
VCD	4-vinilciclohexeno diepóxidos
VCM1	4-vinilciclohexeno 1,2 epóxido
VCM2	4-vinilciclohexeno 7,8 epóxido
Zn	Zinco

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	15
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	18
1.1.1 Exposição ocupacional a químicos no geral e seus impactos na saúde humana	18
1.1.2 4-Vinilciclohexeno	19
1.1.2.1 Órgãos alvo da toxicidade aguda e crônica	22
1.1.2.2 Toxicidade no sistema reprodutor	29
1.1.2.3 Neurotoxicidade	30
1.1.2.4 Carcinogenicidade	31
1.1.2.5 Mecanismos associados a toxicidade do VCH e seus metabólitos	33
1.1.2.6 Estresse oxidativo	34
1.1.2.7 Apoptose	39
1.1.3 Organismos modelos alterativos na pesquisa	37
1.1.4 <i>Nauphoeta cinerea</i>	39
2 OBJETIVOS	42
2.1 OBJETIVOS GERAIS	42
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3 RESULTADOS	43
3.1 ARTIGO	44
4 DISCUSSÃO	51
5 CONCLUSÕES	55
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

APRESENTAÇÃO

No tópico INTRODUÇÃO está incluso o referencial teórico sobre os conteúdos abordados nesta tese. A metodologia realizada e os resultados obtidos que constituem a tese estão apresentados sob a forma de um artigo, que está no item RESULTADOS. O artigo contém os seguintes itens: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências. Os itens DISCUSSÃO e CONCLUSÃO, presentes no final da tese, apresentam descrições, interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico e os resultados deste trabalho. As REFERÊNCIAS descritas correspondem somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REFERENCIAL TEÓRICO e DISCUSSÃO desta tese.

1 INTRODUÇÃO

A exposição a inúmeros agentes tóxicos, incluindo os compostos orgânicos voláteis (COV) vem gerando agravos a saúde humana e de outros animais, visto a possibilidade de causarem, além da redução da fertilidade, várias doenças, tais como o câncer (SARADHA; MATHUR, 2006). Por isso, é crescente o interesse por pesquisas relacionadas aos COV devido às várias possíveis formas de exposição, como por inalação e de maneira ocupacional. Assim, a identificação e quantificação desse composto no ambiente possibilita a avaliação do real risco toxicológicos à saúde humana (KUNO; ROQUETTI; GOUVEIA, 2010; OGA, 2008).

O composto orgânico volátil 4-vinilciclohexeno (VCH) vem sendo gerado como subproduto da fabricação de borrachas sintéticas e plásticos (RAPPAPORT; FRASER, 1976; IARC, 1994). Sua principal forma de exposição é por inalação, o que é preocupante, uma vez que em estudos toxicológicos realizados, o VCH é tóxico em roedores e está associado a danos nos folículos primários e primordiais, de modo a desencadear inclusive até mesmo menopausa precoce (SMITH; MATTISON; SIPES, 1990a; SPRINGER et al., 1996a; MAYER et al., 2002; BHATTACHARYA; KEATING, 2012a; KAPPELER; HOYER, 2012).

Apesar dos mecanismos envolvidos na toxicidade do VCH não estejam ainda completamente decifrados, foi proposto que a sua metabolização ocorre via isoformas da proteína citocromo P450 no fígado e nos ovários (SMITH, MATTISON, SIPES, 1990a; ABOLAJI, et al., 2014). Essa metabolização leva à biotransformação oxidativa de modo a torná-lo mais hidrofílico e para conseqüentemente ser eliminado (SMITH, MATTISON, SIPES, 1990a; ABOLAJI, et al., 2014). No entanto, sabe-se que a geração de epóxidos oriundos da bioativação do VCH podem levar a alterações na homeostase redox da célula, o que desencadeia a formação de espécies reativas e aponta para um possível mecanismo de ação tóxica do composto (ABOLAJI et al., 2015; RIZZO et al., 2012).

A inativação dos metabólitos do VCH gerados pode ocorrer através das ações das enzimas epóxido hidrolase microssomal (mEH) e por meio do envolvimento da enzima glutationa-S-transferase (GST) (CANNADY et al., 2002). Nos diferentes modelos alternativos, essas enzimas possuem um papel importante no potencial ovotóxico intermediado pelo VCH (GIANNARINI et al., 1981; BHATTACHARYA; KEATING, 2012a; KAPPELER; HOYER, 2012; KEATING; SIPES; HOYER, 2008).

Como é crescente a exposição ao composto VCH, torna-se importante a pesquisa de novos modelos experimentais que permitam a avaliação de manifestações

toxicológicas geradas através da exposição por diferentes vias, como a inalatória, de curto, médio e/ou longo prazo.

Nesse contexto, a barata da espécie *Nauphoeta cinerea* é oriunda da região leste da África e encontrada em ambientes de clima tropical e temperado (CLOPTON, 2012). As baratas já foram usadas como um organismo modelo em estudos toxicológicos (WANULE; SIRSIKAR, 2009; STANKWIEWICZ; DABROWSKI; LIMA, 2012; RODRIGUES et al., 2013; ABOLAJI et al., 2014; ADEDARA et al., 2015). Portanto, o objetivo desse estudo foi utilizar ninfas de *N. cinerea* para avaliação da exposição a doses relevantes de VCH, visando identificar possíveis alvos toxicológicos que serviriam para a sua validação como um modelo alternativo de triagem toxicológica inicial.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Exposição ocupacional a químicos no geral e seus impactos na saúde humana

Ao longo da história da civilização humana, o trabalho sempre foi concebido como indispensável para o homem, tanto do ponto de vista econômico-produtivo quanto social (UVA; FARIA, 2000). Entretanto, riscos eminentes do trabalhador às exposições ocupacionais, oriundas do próprio trabalho, como substâncias químicas, podem gerar agravos para sua saúde (RIGOTTO; AUGUSTO, 2007; UVA; FARIA, 2000). Segundo a Organização Internacional do Trabalho, anualmente em torno de 35 milhões de casos envolvem doenças advindas da exposição ocupacional a substâncias químicas (KATO; GARCIA; WUNSCH, 2007). Esse fato implica em 439.000 óbitos com causas em doenças respiratórias crônicas, cardiovasculares, pneumoconiose e câncer (KATO; GARCIA; WUNSCH, 2007). A correlação entre as exposições ocupacionais de diversas fontes e o surgimento das enfermidades já é notória há vários anos.

A salubridade no ambiente de trabalho estabelece um fenômeno relevante quando o foco é saúde e bem-estar (PIVETTA et al., 2001; LAGAZ, 2007). Entretanto, situações e ambientes considerados insalubres podem desencadear o adoecimento do trabalhador exposto, tornando-o vulnerável aos efeitos nocivos do possível agente envolvido (RIGOTTO; AUGUSTO, 2007). Tem-se, dessa forma, conhecimento que atualmente existem mais de 750.000 substâncias químicas, sendo que 85.000 são usadas na rotina e comércio, e em torno de 7.000 destas, tem descrição de causar possíveis efeitos e riscos à saúde humana (MELLO; WAISMANN, 2004). A avaliação do risco advinda da identificação do dano visa mostrar as possíveis reações adversas à saúde humana coligada à exposição aos xenobióticos (JARDIM; CALDAS, 2009).

No entanto, a caracterização do risco envolve estimativas tanto quantitativas como qualitativas, de um dado efeito num dado organismo, considerando como requisitos os locais definidos de exposição (JARDIM; CALDAS, 2009). O malefício à saúde está diretamente relacionado com as particularidades da substância química, a dose/resposta, assim como o tempo e vias de exposição que podem ser por contato dérmico, via oral ou inalatória (JARDIM; CALDAS, 2009; SWARTJES, 2015). A exposição ocupacional a xenobióticos pode ocorrer também de forma indireta, ou seja, pelo solo, ar que respira, ingestão de água e consumo de alimentos (ABRHANS, 2002; JARDIM; CALDAS, 2009; ARNOLD et al. 2013). Por isso, uma avaliação da exposição, coligada ao conhecimento dos reais efeitos e limites de exposição considerados seguros

à saúde, possibilita instituir as precedências e formas de intervir-se efetivamente para resguardar a população dos riscos envolvidos.

No Brasil, em 2016, o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) registrou 6.968 ocorrências de intoxicações humanas por agentes tóxicos vinculadas ao trabalho (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Cabe salientar que os efeitos adversos intrínsecos à exposição ocupacional a substâncias químicas podem ser reduzidos mediante detecções precoces. Assim, o monitoramento da exposição passa a ser uma peça chave para se avaliar e interpretar os parâmetros em meio biológico e ou ambientais com o intuito de identificar os riscos à saúde antes de uma possível intoxicação.

Nesse contexto, vários estudos realizados no Brasil visam avaliar a exposição de brasileiros às substâncias químicas, especialmente relacionadas a metais (TAVARES; CARVALHO, 1992; SILVA et al., 2004; SAKUMA; CAPITANI, 2004; GARDNER et al., 2010; COSTA; MOREIRA & BARROCAS, 2015), pesticidas (FERREIRA, et al., 2012; PASIANI et al., 2012; KRAWCZYK et al., 2017; MEYER et al., 2017) e compostos voláteis (CORREIA-DEUR et al., 2012; SCOVRONICK et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2017a). Entre as substâncias químicas, em particular os compostos orgânicos voláteis, ganham destaque por serem considerados poluentes ambientais e oriundos de inúmeras fontes, dentre elas de solventes orgânicos e processos industriais (WESCHLER; SHIELDS, 1997).

Compostos orgânicos voláteis desencadeiam alterações em nível de qualidade atmosférica (HOYER, 2005; DOERR et al., 1995; TANG; LIU; DUAN, 2015). A emissão de maneira geral dos compostos orgânicos pode gerar transformações de curto a longo prazo, tanto quimicamente quanto fisicamente ao meio ambiente e a saúde humana (MACHADO, 2003, TANG; LIU; DUAN, 2015). Quando se trata de exposição aos COV, sabe-se que mesmo em concentrações consideradas variáveis e ou duradouras, existe claro prejuízo à saúde que incluem doenças crônicas de baixa gravidade imediata e ou doenças graves como o câncer (SMITH et al., 1997; TUNNICLIFFE et. al., 1999; YANG et al., 2003; BHATTACHARYA; KEATING, 2012a; COLLINS; MONTALI; MANUS, 1987a). Tais efeitos podem levar a alterações metabólicas nos organismos em nível neurológico, imunológico, reprodutivo (redução da fertilidade) entre outros (DOERR et al., 1995; TANG; LIU; DUAN, 2015).

1.1.2. 4-Vinilciclohexeno

O 4-Vinilciclohexeno (VCH) (figura 1) é produzido comercialmente e de forma espontânea através da dimerização do 1,3-butadieno (ABOLAJI et al., 2014). Trata-se

de um composto orgânico, líquido, incolor, gerado como um subproduto da fabricação de borrachas sintéticas, plásticos, produção de pneus (RAPPAPORT; FRASER, 1976; IARC, 1994; ABOLAJI et al., 2014). Atualmente, o VCH é utilizado como um intermediário na síntese química de outros compostos, incluindo a síntese de diepóxidos e como diluentes de resinas epoxídicas que podem ser aplicadas na fabricação de embalagens de alimentos (ABOLAJI et al., 2014).

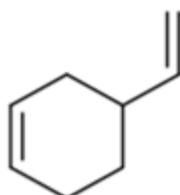


Figura 1: 4-Vinilciclohexeno

Fonte: Wikipedia

A exposição ao VCH pode ocorrer por meio do contato dérmico, inalação e ou ingestão (BHATTACHARYA; KEATING, 2012a). Dessa maneira, pode-se inferir que a exposição humana ocupacional é preocupante, uma vez que os estudos toxicológicos já realizados demonstraram o potencial tóxico deste composto e de seus metabólitos em diferente espécies (SMITH; MATTISON; SIPES, 1990a; SPRINGER et al., 1996b; MAYER et al., 2002; BHATTACHARYA; KAPPELER; HOYER, 2012a, b). Além disso, o principal local de exposição ocupacional humana ocorre no ambiente industrial (SPRINGER et al., 1996b). É importante ressaltar que, até o presente momento, não se tem relato dos efeitos da exposição ao VCH em humanos (SHARARA et al., 1998). Além disso, as possíveis consequências ambientais relacionadas a esse agente tóxico não foram amplamente estudadas.

Apesar da absorção, metabolismo e excreção do VCH não estejam ainda compreendidos, foi proposto que a sua metabolização ocorre por meio da ação dos citocromos P450 no fígado e ovários (figura 2) que leva a sua biotransformação oxidativa a fim de torná-lo mais polar excreção (SMITH; MATTISON; SIPES, 1990a; ABOLAJI et al., 2014).

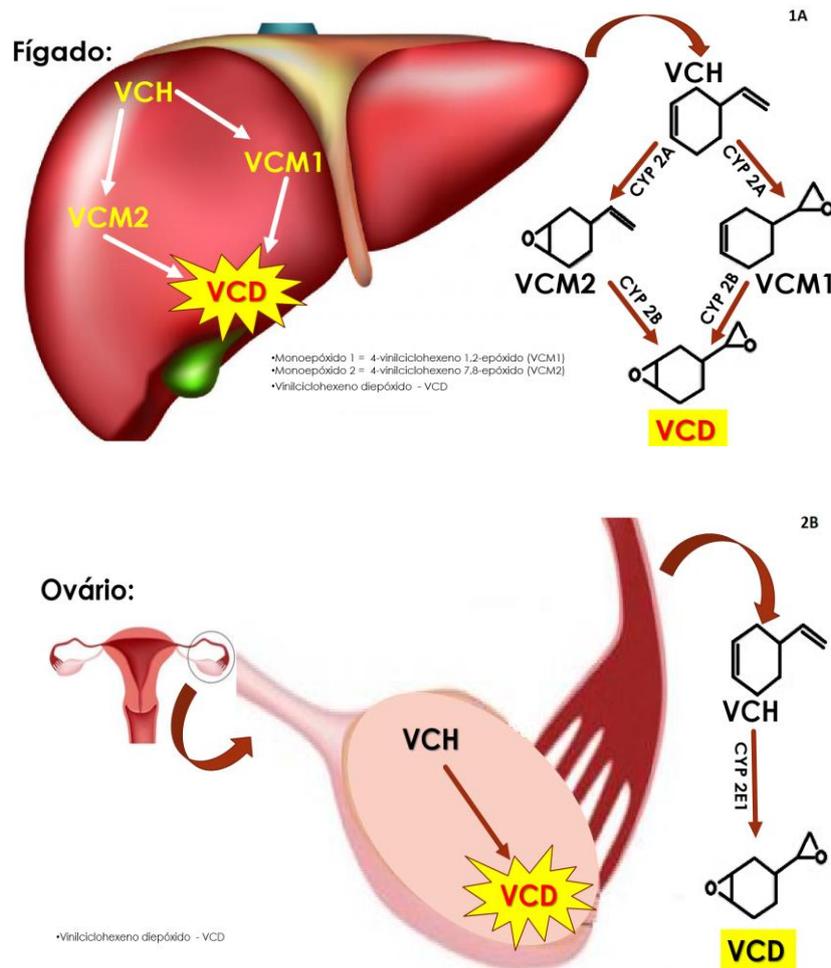


Figura 2: Mecanismo de metabolização do VCH no fígado (1A) e no ovário (1B).

Fonte: Autor, (2019)

Inicialmente, o citocromo P450 2A presente no fígado leva à oxidação de uma das ligações duplas do VCH, o que resulta na formação de dois metabólitos monoepóxicos, o 4-vinilciclohexeno-1,2-epóxido (VCM1) e o 4-vinilciclohexeno-7,8-epóxido (VCM2). A segunda oxidação ocorre pela citocromo P450 2B, também no fígado, onde leva a formação do seu metabólito diepóxicos denominado de vinilciclohexeno diepóxido (VCD) (ABOLAJI et al., 2014).

Embora o fígado seja considerado possivelmente o principal local de bioativação do VCH, um estudo realizado por Cannady e seus colaboradores (2003) afirma que os níveis circulantes de VCH pode atingir os ovários por meio da circulação, e também sofrer o processo de biotransformação e até mesmo de detoxificação em fêmeas de roedores. Nos ovários, destaca-se o envolvimento da citocromo P450 2E1 para metabolização do VCH diretamente em VCD (MUKHTAR; PHILPOT; BEND, 1978; ABOLAJI et al., 2014). Já outros metabólitos oriundos da bioativação do VCH no ovário ainda não foram identificados (CANNADY et al., 2003).

A inativação dos metabólitos formados no fígado e ovários de fêmeas de roedores ocorre através da enzima epóxido hidrolase microssomal (mEH), o que leva à formação do metabólito inativo tetrol ou também chamado de 4-(1,2-dihidroxi)etil-1,2-dihidroxíciclohexano (CANNADY et al., 2002; ABOLAJI et al., 2014; FLAWS et al., 1994a). Além disso, existe o envolvimento da enzima glutationa-S-transferase (GST) que leva à conjugação do VCD com glutationa reduzida (GSH), de modo a formar adutos (CANNADY et al., 2002; ABOLAJI et al., 2014; FLAWS et al., 1994a). A principal via de eliminação do VCH em roedores ocorre pela urina, de modo que 60% de uma dose administrada seja eliminada pelos rins (ECHA, 2012). A segunda principal via é pelo ar expirado (ECHA, 2012) seguido das fezes (SMITH et al., 1990b). Por outro lado, dentre os tecidos suscetíveis à acumulação do VCH, tem-se destaque o tecido adiposo, músculo e pele em roedores (SMITH et al., 1990b; ECHA, 2012).

1.1.2.1 Órgãos alvo da toxicidade aguda e crônica

Inúmeras substâncias potencialmente tóxicas podem ser avaliadas através de testes de toxicidade aguda e crônica em modelos animais. A exposição aguda avalia os efeitos severos e breves em um organismo-teste durante um curto período de tempo e a exposição crônica avalia também os efeitos em períodos de exposição prolongados, podendo variar de acordo com a espécie estudada. Para as avaliações da toxicidade aguda e crônica desses compostos, até o presente momento foram utilizados diferentes modelos tanto vertebrados quanto invertebrados, nos quais são demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Órgãos alvo de toxicidade aguda e crônica

Composto	Protocolo de exposição	Efeito	Órgãos avaliados	Espécie	Referência
VCD 0,57 mmol/kg	Receberam única dose i.p.	↓ Níveis de GSH hepático só 2h após administração Não alterou TBARS	Fígado e ovários	Ratas (F344)	Devine et al., (2001)
VCD 0,57mmol/ kg e VCH 7,4 mmol/kg	Receberam única dose i.p.	Não alterou a expressão da mEH	Ovários	Camundongas (B6C3F1)	Cannady et al., (2002)
VCD 30 µM	Cultura de ovário 4 DPN por 24 e 48 horas (única dose)	↓ Nº de folículos primordiais, primários no 14 d após a exposição	Ovários	Ratas (F344)	Devine et al., (2004)

VCD 80 mg/Kg	Receberam única dose i.p.	Ausência de toxicidade	Fígado e ovários	Ratas (F344)	Hu et al., (2001b)
VCD 80 mg/Kg	Receberam única dose i.p.	↑ Atividade das Casp. 3, 9	Fígado e ovários	Ratas (F344)	Hu et al., (2001a)
VCD 80 mg/kg	Receberam única dose i.p.	↑ N° de folículos Ausência de atresia folicular ↓ Expressão da Bax	Ovários	Ratas (F344)	Borman et al., (1999)
VCD 80 mg/kg	Receberam diariamente por 6, 8, 10, 12, 15 d injeções i.p.	↓ N° de folículos primordiais e primários no 15º d Dano no DNA 10º e 12ºd Alterações morfológicas nos ovários (10º d)	Ovários	Ratas (F344)	Springer et al., (1996b)
VCD 80 mg/Kg	Receberam diariamente por 6, 8, 10, 12 d injeções i.p.	↓ N° de folículos primordiais e primários 12º d (ambas as espécies) ↑ Atresia folicular (8º d camun.) 12ºd em ratas)	Ovários	Ratas (F344) e camundongas (B6C3F1)	Kao et al., (1999)
VCD 80 mg / kg e 0,57 mmol/ kg	Receberam diariamente por 30 d injeções i.p.	↓ Peso do útero nos adultos ↓ N° de oócitos nos folículos primordiais e primários	Fígado, baço, útero e ovários	Ratas (F344)	FLAWS, et al., (1994b)
VCD 80 mg / kg e 0,57 mmol/kg	Receberam diariamente por 10 d injeções i.p.	↑ Expressão da Bax, MnSOD e mEH nos folículos primordiais e primários ↓ Expressão da bax e Cu-ZnSOD no fígado	Fígado e ovários	Ratas (F344)	Springer et al., (1996a)
VCD 320 mg/Kg	Receberam única dose i.p.	↓ N° de folículos primordiais, primários 6 d após a exposição	Ovários	Ratas (F344)	Devine et al., (2004)
VCH 400 mg/kg	Receberam única dose oral	Acumula-se no tecido adiposo, músculo e pele Eliminação pela urina, ar expirado, fezes e tecidos Taxa de epoxidação do VCH para VCM1 é maior em camundongas do que em ratas	Tecido adiposo, músculo, pele	Ratas (F344) e Camundongas (B6C3F1)	Smith et al., (1990b)

VCD / VCM1 10-1000µM	Receberam diariamente por 5 d na dieta	<p>↓ Atividade da GST</p> <p>↑ Oxidação da DCFH</p> <p>↓ Conteúdo total de tiois</p> <p>Inibição da AChE e δ-ALA-D</p> <p>Alteração dos genes da SOD1 MAPK-2; CAT e TrxR-1</p>	Mosca inteira	<i>Drosophila melanogaster</i> ambos os sexos	Abolaji et al., (2015)
VCH 10µM – 1mM	Receberam diariamente por 5 d na dieta	<p>↑ Expressão da SOD, Nrf-2 e MAPK-2;</p> <p>↑ Atividade da CAT e produção de ERO;</p> <p>↓ Atividade da GST, δ-ALA-D e AChE.</p>	Mosca inteira	<i>Drosophila melanogaster</i> ambos os sexos	Abolaji et al., (2014)
VCD 80 e 320mg/kg	Receberam diariamente por 8 d injeções i.p.	<p>↓ Expressão Bcl-2, casp. 3, 8, 9;</p> <p>↑ Expressão da tp53.</p>	Testículos	Cachorros	Paksoy (2018)
VCH 300-5000 mg/kg	Receberam diariamente por 14 d pela via oral	↑ Mortalidade em doses ≤ 1250 mg/kg	Rim e ovários	Ratos (F344) e camundongos (B6C3F1) de ambos os sexos	Collins e Manus (1987b)
VCD 10, 20, 30µM	Cultura de ovário 4 DPN por 15 d	↓ Nº de folículos primordiais e primários	Ovários	Ratas (F344)	Devine et al., (2004)
VCD 30 µM	Cultura de ovários 4º DPN por 15 d	<p>↑ Apoptose (casp. 3)</p> <p>↓ Nº de folículos primordiais e primários</p>	Ovários	Ratas (F344)	Devine et al., (2002)
VCD 80 mg/kg	Receberam diariamente entre o 4º e 19º DPN injeções i.p.	<p>↑ Apoptose (casp. 3)</p> <p>↓ Nº de folículos primordiais e primários</p>	Ovários	Ratas (F344)	Devine et al., (2002)
VCD 80 mg/Kg	Receberam diariamente por 15 d injeções i.p.	↑ Apoptose (membros da família Bcl2) e liberação do cit. c	Fígado e ovários	Ratas (F344)	Hu et al., (2001b)
VCD 80 mg/Kg	Receberam Diariamente por 15 d injeções i.p.	<p>↓ Nº de folículos primordiais e primários</p> <p>↑ Atividade da casp. 3</p>	Utero e ovários	Ratas (F344)	Thompson et al., (2002)
VCD 80 mg/Kg	Receberam diariamente por 15 d injeções i.p.	↑ Apoptose (casp. 3, 8, 9)	Figado e ovários	Ratas (F344)	Hu et al., (2001a)
VCD 80 mg/kg	Receberam diariamente por 15 d injeções i.p.	<p>↓ Nº de folículos primordiais e primários</p> <p>↑ Atresia folicular</p> <p>↑ Expressão da Bax</p>	Ovários	Ratas (F344)	Borman et al., (1999)

VCD 0,57 mmol/kg e VCH 7,4 mmol/kg	Receberam diariamente por 15 d injeções i.p.	↑ Expressão da citocromo P450 2E1; 2A e 2B.	Ovários	Camundongas (B6C3F1)	Cannady et al., (2003)
VCD 0,57 mmol/kg	Receberam diariamente por 15 d injeções i.p.	↓ Níveis de GSH hepático ↓ Nº de folículos primordiais e primários Não alterou TBARS	Fígado e ovários	Ratas (F344)	Devine et al., (2001)
VCD 0,57 mmol/kg e VCH 7,4 mmol/kg	Receberam Diariamente por 15 d injeções i.p.	↑ Expressão da mEH	Ovários	Camundongas (B6C3F1)	Cannady et al., (2002)
VCD / 80, 160 e 250 mg/Kg	Receberam por 15 d injeções IM	↓ Nº de folículos primordiais, primários e secundários na dose de 250 ↓ Nº de folículos primordiais e primários na dose de 160 Transitório da ALT e AST na dose de 250	Ovários	Macacos fêmeas <i>cynomolgus</i>	Appt et al., (2006)
VCD 160 mg/Kg	Receberam Diariamente por 15 d injeções i.p.	↑ Níveis de FSH ↑ Período do ciclo estral ↓ Peso dos ovários Ausência de folículos 85d após a exposição	Adrenais, fígado, baço, ovários e útero	Camundongas (C57BL/6J)	Lohff et al., (2005)
VCD 160 mg/Kg	Receberam diariamente por 17 d injeções i.p.	Falência ovariana e nenhuma gravidez bem sucedida foi alcançada	Ovários	Camundongas (C57BL/6J)	Haas et al., (2007)
VCD 160 mg/kg	Receberam diariamente por 10 ou 20d injeções i.p.	↓ Nº de folículos ovarianos no 10ºd Ausência de folículos no 20ºd ↓ Peso dos ovários e utero ↑ Níveis de FSH	Ovários, útero	Camundongas (B6C3F1)	Lohff et al., (2006)
VCD 160 mg/kg	Receberam diariamente por 25d injeções i.p.	↓ Peso ovariano ↓ Nº de folículos primordiais, primários, secundarios e antral Tumor ovariano das células de Sertoli e Leydig em 3 e 5 meses após a exposição	Ovários	Ratas (F344)	Hoyer et al., (2009)

VCD 80 mg/kg	Receberam diariamente por 30 d injeções i.p.	↓ N° de folículos primordiais e primários	Ovários	Ratas (F344)	Mayer et al., (2002)
VCD 100-500 mg/kg	Receberam diariamente por 28 d pela via oral	↓ Ganho de peso corporal, testículos e epidídimo ↓ N° de espermatozóides e motilidade ↓ Níveis de FSH, LH e testosterona Alteração de biomarcadores de estresse oxidativo, inflamação e apoptose Alteração da atividade de enzimas antioxidantes	Testículos e epidídimo	Ratos machos (Wistar)	Adedara et al., (2016b)
VCD 100, 250 e 500 mg/kg	Receberam diariamente por 28 d pela via oral	Induz dano oxidativo e inflamação no fígado e rim de ambos os sexos ↑ Expressão de iNOS, COX-2, casp. 9 e 3 no fígado	Fígado e rim	Ratos (Wistar) de ambos os sexos	Abolaji et al., (2016a)
VCD 40, 80 mg/Kg	Receberam diariamente por 30 d injeções i.p.	Destruição de folículos primordiais e primários ↓ Consumo de comida ↑ Níveis de Creatinina ↑ Peso do fígado	Fígado, rim e ovários	Ratas Sprague Dawley	Muhammad et al., (2009)
VCH / VCD / VCM1 / VCM2 0,07 – 7,4 mmol/kg	Receberam diariamente por 30 d injeções i.p.	VCH (CE50 C.F.=2,7 e R.F.= nenhum efeito) VCD (CE50 C.F.=0,2 e R.F.=0,4) VCM1 (CE50 C.F.=0,5 e R.F.=1,4) VCM2 (CE50 C.F.=0,7 e R.F.=não foi avaliado no estudo)	Ovários	Camundongas (B6C3F1) e ratas (F344)	Smith et al., (1990a)
VCH 6 mmol/kg e 4PC 3 ou 6 mmol/kg	Receberam diariamente por 30d injeções i.p.	↓ N° de folículos antrais Não alterou os níveis de FSH Ausência de toxicidade do 4PC	Ovários	Camundongas (B6C3F1)	Hooser et al., (1993)
VCH 800mg/kg; VCD 40- 320mg/kg e	Receberam diariamente por 30d injeções i.p.	Somente o VCH [160 e 320mg] reduziu o peso do testículo e vesícula	Testículos, epidídimo e vesícula seminal	Camundongos (B6C3F1)	Hooser et al., (1995)

VCM1
200mg/kg

seminal e causou
necrose progressiva
das células
germinativas

VCH 50-1200 mg/kg	Receberam diariamente por 13 semanas pela via oral	↑ ↓ ↓	Mortalidade na máxima dose Peso corporal em ambos os sexos Degeneração dos tubulos proximais do rim em ratos machos Nº de foliculos ovarianos na máxima dose	Rim e ovários	Ratos (F344) e camundongos (B6C3F1)	Collins e Manus (1987b)
VCD 6,5 – 200 mg/kg	Receberam diariamente por 13 semanas aplicações dérmica e pela via oral	↓	Lesões cutâneas, tais como ulceração, hiperqueratose e hiperplasia das glandulas sebácias Peso corporal No estômago (hiperplasia e hiperqueratose) em ambas as espécies No rim (degeneração/necros e das células tubulares) em ambas as espécies Em camundongas nos ovários (atrofia folicular) e nos testículos (degeneração do epitélio germinativo)	Derme, estômago, rim, ovários e testículos	Camundongas (B6C3F1) e ratas (F344)	CHHABRA et al., 1990b)
VCH 200 e 400mg/kg	Receberam diariamente 5 d por semana, durante 2 anos pela via oral		Induz tumores ovarianos somente em camundongas. Ratos (ambos os sexos) e camundongos machos tiveram elevada mortalidade e ausência de indícios conclusivos de efeito carcinogênico Em camundongos teve lesões não neoplasicas, tais como hiperplasia epitelial do estômago, congestão dos pulmões, e glândulas supra renais e alteração citológica do cortex adrenal.	Ovários, estômago, pulmões, glândulas supra renais e cortex adrenal	Ratos (F344) e camundongos (B6C3F1) ambos os sexos	Collins et al., (1987a)

VCH 50-1500ppm	Expostos por inalação durante 6h por dia, 5 dias por semana, durante 13 semanas	↓ Peso corporal somente em ratos na maior concentração ↑ Peso do fígado e rim somente em ratos Devido a elevada mortalidade mais em camundongos machos o peso corporal e dos órgãos não foi avaliado Atrofia ovariana mais em camundongas do que em ratas Letargia nas maiores concentrações	Fígado, rim, ovários e testículos	Camundongos (B6C3F1) e ratos Sprague Dawley (ambos os sexos)	Bevan et al., (1996)
VCH 50-2000ppm	Expostos por inalação durante 6h por dia, durante 2 d e/ou durante 13 semanas	Em nenhuma das espécies e períodos avaliados teve a indução de micronúcleos	Células da medula óssea	Camundongos (B6C3F1) e ratos Sprague Dawley (ambos os sexos)	Bevan et al., (2001)

Ref. = Referência; i.p. = intraperitoneal; n^o = número; DPN= dia pós-natal; MAPK = proteínas quinases ativadas por mitógenos; AP-1 = proteína ativadora 1; FSH = hormônio folículo estimulante. Cit. c = citocromo c.; Casp. = caspase; CE50 = Concentração (mmol/kg) efetiva do composto que reduz os oócitos para 50% dos controles); C.F.= Camundongo fêmea; C. M. = Camundongo macho; R. F. = Rato fêmea; R. M. = Rato macho; VCM1 = 4 - vinilciclohexeno 1,2-epóxido; VCM2 = 4-vinilciclohexeno 7,8-epóxido; GST= glutathione-S-transferase; SOD1= superóxido dismutase1; TrxR1= tioredoxina redutase; CAT= catalase; AChE= acetilcolinesterase; MAPK-2 = proteína quinase 2 ativada por mitógeno; δ-ALA-D = Ácido Delta Aminolevulínico Desidratase; 4PC= 4-fenilciclohexano; ERO = espécies reativas de oxigênio; ERN = espécies reativas de nitrogênio; GPx= glutathione peroxidase; PI3K = fosfatidilinositol-3 quinase; GSTp = glutathione S-transferase pi; AMH = Hormônio anti-Mülleriano; mEH = epóxido hidrolase microssomal.

Os pontos críticos da toxicidade do VCH e de seus metabólitos observada nos diferentes órgãos-alvo dependem da concentração utilizada, do tempo de duração da exposição, da capacidade de metabolização de cada órgão ou organismo-modelo utilizado nos ensaios, do tipo de metabólito epóxido gerado durante a bioativação nas diferentes espécies e das vias de administração (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 1986; NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 1989; MUHAMMAD et al.,

2009; DEVINE et al., 2001; HOYER et al., 2001). Além disso, os efeitos tóxicos observados mediante a exposição ao VCH e aos seus metabólitos, principalmente o VCD se devem a períodos prolongados de exposições a doses diárias. Os órgãos-alvo avaliados nos testes de toxicidade aguda e crônica foram os ovários, útero, testículos, epidídimo, vesícula seminal, córtex adrenal, pulmão, estômago, rim, baço, fígado e pele. Apesar dos estudos demonstrarem quase sempre algum sinal de alteração nos diferentes órgãos-alvo avaliados, o papel exato frente a toxicidade desses compostos precisa ser melhor investigado.

Dentre os órgãos-alvo avaliados, os órgãos reprodutores de fêmeas testadas são os mais alvejados. A insuficiência ovariana, por exemplo, observada nos estudos se deve principalmente aos danos provocados pela exposição ao metabólito diepóxido VCD nos folículos ovarianos pré-antrais (SMITH; MATTISON; SIPES, 1990a; SPRINGER et al., 1996b; MAYER et al., 2002; BHATTACHARYA; KAPPELER; HOYER, 2012b).

1.1.2.2 Toxicidade no sistema reprodutor

A integridade estrutural e fisiológica das funções reprodutivas em nível ovariano e testicular estão diretamente relacionadas ao pleno funcionamento do sistema hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG) (SMITH, 1983; GUYTON; HALL, 2002). Compostos tóxicos que afetam as funções reprodutivas afetam a fertilidade, causando de forma direta ou indireta distúrbios menstruais, alteração da espermatogênese e teratogênese (SARADHA; MATHUR, 2006; KUMAR et al., 2008; SMITH, 1983; MATTISON, 1983; MARONPOT, 1987). Além disso, disfunções reprodutivas podem também resultar em quadros neoplasias benignas ou malignas em humanos e animais (SMITH, 1983; MARONPOT, 1987). No entanto, fêmeas de humanos apresentam um número finito não regenerável de folículos no nascimento (HIRSHFIELD, 1991). A grande maioria dos folículos que não for selecionado para o desenvolvimento da ovulação sofre degeneração em vários estágios de desenvolvimento por um processo denominado de atresia (HIRSHFIELD, 1991). Desde o nascimento no ovário, a atresia folicular ocorre através do mecanismo de morte celular programada, ininterruptamente até o esgotamento do fornecimento de folículos que com o tempo leva a insuficiência ovariana, conhecida também como período da menopausa (GOSDEN, 1987; TILLY et al., 1991).

Por conseguinte, inúmeros compostos químicos conhecidos por serem ovotóxicos levam à depleção de folículos ovarianos e representam um risco de curto,

médio ou a longo prazo aos indivíduos humanos expostos (MATTISON et al., 1984; MAYER et al., 2002). Assim, toda e qualquer substância com potencial tóxico que acometa os folículos ovarianos pode ocasionar falência ovariana precoce (THOMPSON et al., 2002). Dentre os compostos, o VCH e seus metabólitos demonstram potencial ovotóxico em animais nas diferentes vias de exposição, tais como inalação, dérmicas e ou por via oral (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 1989; GRIZZLE et al., 1994; BEVAN et al., 1996). Entretanto, tem-se uma diferença nos efeitos tóxicos desses compostos observados entre as espécies de animais estudadas.

A exposição ao composto VCH pode levar à destruição seletiva de folículos pré-antrais (primordiais e primários) em camundongos fêmeas, mas não em ratos (SMITH, CARTER, SIPES, 1990b; SMITH et al., 1990c; SMITH, MATTISON, SIPES, 1990a; HOOSER et al., 1993). Já os metabólitos monoepóxidos e diepóxido são considerados ovotóxicos para ambas as espécies e agem na mesma fase folicular que o VCH (SMITH et al., 1990c; FLAWS et al., 1994a, b; SPRINGER et al., 1996 b, c; ABOLAJI et al., 2015). Importante ressaltar que esses efeitos tóxicos devem-se principalmente ao metabólito diepóxidos, o VCD, que provoca insuficiência ovariana, podendo desencadear menopausa precoce em mulheres expostas, além de colocá-las em maior risco de doenças pós-menopáusicas, tais como alzheimer, doenças cardíacas e osteoporose (LOHFF, et al., 2006; HOOSER et al., 1994; HULLEY et al., 1998; WEBBER et al., 2005). Além disso, a exposição ao VCD por modelo murinho pode também acelerar o desenvolvimento natural de atresia folicular mediante morte celular apoptótica (SPRINGER et al., 1996 b, c). A exposição pode reduzir o peso de órgãos reprodutores, cessar ciclos estrais normais em roedores na fase adulta, alterar biomarcadores de estresse oxidativo e induzir neoplasia ovariana (CHHABRA et al., 1990a; FLAWS et al., 1994b; HOOSER et al., 1994; MAYER et al., 2001; REIS et al., 2014; ABOLAJI, et al., 2016b).

Não somente os ovários são alvos toxicológicos do VCH e seus metabólitos, mas também o sistema reprodutor masculino pode ser afetado (HOOSER et al., 1995; CHHABRA et al., 1990b; ADEDARA et al., 2016b; PAKSOY, 2018). Alteração no estado redox, no equilíbrio endócrino e disfunção em nível testicular e epididimal podem ser observadas em roedores mediante a exposição ao metabólito VCD (HOOSER et al., 1995; ADEDARA et al., 2016b; CHHABRA et al., 1990b).

1.1.2.3 Neurotoxicidade

Neurotoxicidade é definida como qualquer efeito danoso em nível estrutural ou funcional do sistema nervoso ocasionado por agentes físicos, químicos e/ou biológicos

e que podem atuar de modo direto ou indireto ou de modo contínuo ou reversível (SLIKKER; BOWYER, 2005). As exposições a um possível agente tóxico podem gerar distúrbios neurológicos, axonopatias, mielopatias, alterações fisiológicas e de comportamento (COSTA, 1998). Além disso, alguns sinais clínicos podem ser evidenciados, tais como tremores, estados convulsivos, ataxia e até mesmo excitabilidade (RATTAN, 2010; GILBERT, 2012).

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor do sistema nervoso presente desde insetos a mamíferos (WÄCHTLER, 1988). Interessante, o sistema nervoso dos insetos possui uma concentração maior de ACh em comparação com mamífero roedor (SATTELLE; BREERT, 1990). A enzima acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela degradação da ACh e, em muitos casos é vista como um dos principais alvos de ação neurotóxicos de xenobióticos (LEIBSON; LIFSHITZ, 2008). Em nível estrutural, a AChE em insetos é semelhante à dos vertebrados que é encontrada nas células nervosas do cérebro e ao longo do cordão nervoso ventral (THAPA et al., 2017). Os ensaios envolvendo a avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) podem ser utilizados como método biomarcador para a avaliação da função do sistema nervoso e do impacto de xenobióticos em seu pleno funcionamento (KIM et al., 2010; 2014; ABOLAJI et al., 2014; ABOLAJI et al., 2015).

O VCH é um composto que, dentre os inúmeros agentes tóxicos de exposição ocupacional, é também estudado quanto ao seu caráter neurotóxico (ABOLAJI et al., 2015). Até o presente momento, a neurotoxicidade foi observada somente pela exposição via oral por cinco dias os compostos VCH, VCM e VCD (10-1000 μ M) em moscas da fruta da espécie *Drosophila melanogaster*. A mosca exposta apresentou inibição da atividade da acetilcolinesterase (ABOLAJI et al., 2015).

1.1.2.4 Carcinogenicidade

Câncer envolve um vasto grupo de doenças de amplo tropismo orgânico que acometem várias espécies, em especial humanos. De fato, é considerada a segunda causa de morte no mundo (WHO, 2018). De acordo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil entre 2014-2015 mais de quinhentos mil novos casos de cânceres e colocou o país entre os países de maior ocorrência da doença (INCA, 2014; PANIS et al., 2018). Entretanto, essa ocorrência poderá chegar a seiscentos mil novos casos em 2018-2019 (INCA, 2017). Somente na região sul do Brasil, os tipos de canceres mais incidentes são os de próstata, mama, ovário, seguido de pulmões e brônquios, colo do útero e câncer esofágico (BARROS et al., 2000; PANIS et al., 2018). O processo de formação de um câncer envolve vários estágios tais como a exposição a um possível

agente cancerígeno, as fases de iniciação, instauração no organismo de uma determinada pré-neoplasia, bem como sua conversão e progressão propriamente dita. Inúmeras vias de sinalização intracelular estão envolvidas na carcinogenicidade (DHILLON et al., 2007; REUTER et al., 2010; TAKASHIMA; FALLER, 2013). Além disso, as células já cancerosas parecem comumente exibir uma desregulação nos sistemas de controle do crescimento e propagação celular, ocasionando o desenvolvimento de agregados celulares anormais (tumores) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Diversos fatores de risco podem contribuir para o desenvolvimento de um câncer, tais como, fatores genéticos (KNUDSEN, 1989; PONDER, 1990), tabagismo (HANKINSON et al., 1992), radiação ultravioleta (UV) (HELBOCK et al., 1998), álcool (GIOVANNUCCI, 1995), dieta rica em gordura (CIBEIRA; GUARAGNA, 2006); obesidade (DIVISI et al., 2006), alteração hormonal (LEE et al., 1975; HENDERSON, ROSS, PIKE, 1991; GOLDITZ et al., 1992; TANAKA et al., 2002; TANAKA et al., 2004), aditivos (HISLOP, 1993), poluição ambiental (GOUGH, 1990), exposição química ocupacional (CHHABRA et al., 1990a; BLAIR; KAZEROUNI, 1997; ZAHM; WARD, 1998; CARPENTER; ARCARO; SPINK, 2002; JARUP, 2003; CLAPP; HOWE; LEFEVRE, 2005; GARCÍA-PÉREZ et al., 2015) entre outros.

Nesse contexto, de acordo com a agência internacional para pesquisa em câncer (IARC), a exposição química ocupacional ao composto VCH e ao seu metabólito VCD pode ser nociva à saúde humana, pois são classificados ambos como carcinógenos do grupo 2B. É dizer, tanto o VCH quanto o VCD são possivelmente carcinogênicos para humanos (IARC, 1994; NTP, 2016). Embora, até o presente momento não existam pesquisas com seres humanos, essa classificação foi baseada em estudos com animais, que demonstram seu potencial carcinogênico (MARONPOT, 1987; NTP, 1986; NTP, 1989; CHHABRA et al., 1990 a, b; NTP, 2016).

Collins, Montali e Manus (1987a) demonstraram que a administração oral do VCH por dois anos (cinco dias por semana) nas doses de 200 e 400 mg/Kg induz tumores ovarianos em camundongos fêmea. Ainda no mesmo estudo, os camundongos machos e os ratos de ambos os sexos apresentaram excessiva mortalidade nas doses avaliadas, impossibilitando confirmar, nesse contexto experimental um possível efeito carcinogênico (COLLINS; MONTALI; MANUS, 1987a). Surpreendentemente, em outro estudo semelhante, ratos fêmea sobreviventes à exposição ao VCH exibiam resistência a indução de tumores e até mesmo em causar danos à folicúlos ovarianos (NTP, 1986; SMITH et al., 1990a, b). Referente a isso, a literatura destaca que é incomum os casos de incidência natural de tumores ovarianos em roedores, a não ser mediante a exposição a químicos com potenciais carcinogênicos (KRARUP, 1970 a, b; JULL, 1973; DOBSON; FELTON, 1983; NTP, 1986). Além disso, notavelmente em vários estudos

se observa que a insuficiência ovariana causada pelo declínio hormonal e / ou de folículos pré-antrais parece anteceder o desenvolvimento de neoplasias ovarianas (DOBSON; FELTON, 1983; JULL, 1973; NTP, 1986; CHAKRABORTY, GORE, 2004; MAFFUCCI, GORE, 2006; HOYER et al., 2009). Essa perda folicular foi também observada em camundongos expostos VCH (SMITH, CARTER, SIPES, 1990b; SMITH et al., 1990c; SMITH, MATTISON, SIPES, 1990a; HOOSER et al., 1993) e em ambas as espécies de roedores (camundongos e ratos) através da exposição aos metabólitos de VCH monoepóxidos e diepóxidos (SMITH et al., 1990a, b; HOOSER et al., 1993; KAO; SIPES; HOYER, 1999; ABOLAJI et al., 2015). Assim, o potencial carcinogênico do VCH possivelmente se deve ao metabólito VCD gerado pela biotransformação do VCH *in vivo* (COLLINS; MONTALI; MANUS, 1987a; NTP, 1986; SMITH et al., 1990c).

A diferença no metabolismo do VCH entre os roedores parece ser também um dos pontos críticos e determinantes na diferença interespecíficas frente a indução da carcinogenicidade ovariana observada nos estudos (SMITH et al., 1990a, b; CHHABRA et al., 1990a, b). Além do metabólito VCD ser considerado entre os metabólitos do VCH o epóxido mais ovotóxico, é também o mais mutagênico (MURRAY; CUMMINS, 1979; EL-TANTAWY; HAMMOCK, 1980; SIMMON; BADEN, 1980; TURCHI et al., 1981; VOOGD; VAN; JACOBS, 1981; MORTELMANS et al., 1986) e comprovável carcinógeno ovariano e de pele em roedores (DUUREN et al., 1967; MARONPOT, 1987; NTP, 1989; CHHABRA et al., 1990a, b; HUFF, 2001; HOYER et al., 2009), provavelmente também devido as suas propriedades em nível molecular (VANDUUREN et al., 1963; VANDUUREN et al., 1967; WATABE; SAWAHATA, 1976).

1.1.2.5 Mecanismos associados à toxicidade do VCH e seus metabólitos

Os mecanismos moleculares pelos quais o VCH e seus metabólitos agem não estão completamente compreendidos, mas especulam-se algumas possíveis ações toxicológicas. Durante o metabolismo do VCH, a geração de metabólitos epóxidos pode levar a alterações na homeostase redox celular, desencadeando a formação de espécies reativas, o que sugere ser um dos mecanismos de ação do composto (ABOLAJI et al., 2015; RIZZO et al., 2012). Isso se deve pelo fato dos metabólitos gerados serem supostamente considerados mais reativos e potencialmente mais tóxicos do que o próprio composto de origem, que nesse caso é o VCH (ABOLAJI et al., 2015). Essa diferença observada é devido principalmente aos epóxidos presentes na estrutura dos metabólitos e ausentes na estrutura do VCH (VANDUUREN et al., 1963; VANDUUREN et al., 1967; WATABE; SAWAHATA, 1976).

Características associadas a morte celular por apoptose, tais como alterações morfológicas (SPRINGER et al., 1995a; SPRINGER et al., 1996c) e danos no DNA tem sido observadas nos folículos primordiais e primários dos ovários de roedores expostos ao VCD (SPRINGER et al., 1995b; SPRINGER et al., 1996b). Assim, a presença dos compostos podem desencadear alteração da expressão e distribuição de alguns genes específicos associados com a indução da apoptose, tais como a Bax (SPRINGER et al., 1996a) e a BAD (HU et al., 2001b). Observou-se também a translocação da proteína anti-apoptótica Bcl-xL mitocondrial para o compartimento citosólico (HU et al., 2001b). O VCD, por sua vez, induz um aumento na relação Bax/Bcl-xL na mitocôndria favorecendo assim, o processo apoptótico (HU et al., 2001b). A exposição do VCD em nível mitocondrial levou a liberação de citocromo c para o citoplasma resultando na promoção da morte celular apoptótica mediante uma possível ativação da cascata proteolítica mediada por caspases (KLUCK et al., 1997; HU et al., 2001a, b; HOYER et al., 2001). Evidencia-se também um possível envolvimento inicial dessa cascata via caspases iniciadoras 8 e 9 (HU et al., 2001a,b ; ABOLAJI et al., 2016b). Assim, o VCD pode induzir a apoptose tanto pelas vias intrínsecas quanto extrínsecas em folículos pré-antrais.

1.1.2.6 Estresse oxidativo

A expressão 'radical livre' tem sido utilizada para definir qualquer molécula detentora de um ou mais elétrons não pareados, sendo altamente instáveis e muito reativos. Essas espécies reativas cumprem diversas funções biológicas importantes (BARBOSA et al., 2010). Em eucariotos, as mitocôndrias são consideradas as principais fontes endógenas de radicais livres por intermédio da cadeia transportadora de elétrons (GREEN; BRAND; MURPHY, 2004), de modo que o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é o radical mais frequentemente produzido (HEKIMI; LAPOINTE; YANG, 2011). Por outro lado, células que compõem o sistema imunológico também são consideradas fontes de radicais livres, no qual produzem enzimas de membrana tais como a NADPH oxidases (Nox) que são proteínas capazes de gerar o $O_2^{\cdot-}$ e causarem a mortalidade de microrganismos invasores (LAMBETH; KAWAHARA; DIEBOLD, 2007; BARBOSA et al., 2010). Células epiteliais, endoteliais, nervosas e macrófagos são produtoras da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) que gera o radical livre óxido nítrico (NO) (LAMBETH; KAWAHARA; DIEBOLD, 2007; MONCADA; HIGGS, 2006). No entanto, quando a produção de radicais livres se torna elevada, podem ocorrer inúmeros danos oxidativos em tecidos, órgãos e/ou sistemas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Nesse cenário, o

estresse oxidativo pode ser descrito como um desbalanço frente as defesas antioxidantes e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em favor do segundo. (HALLIWELL, 2006).

Um aumento no quadro de desbalanço ou estresse oxidativo no organismo está diretamente relacionado à produção de danos a lipídios, proteínas e até mesmo ao DNA (HALLIWELL, 1994; KUSHNAREVA; NEWMAYER, 2010). Qualquer componente presente nas células pode estar vulnerável à ação das ERO, comprometendo até mesmo a integridade celular (SMIRNOFF, 1993). Sabe-se também que danos no DNA mitocondrial causados pelas ERO oriundas de diversas fontes podem levar a indução de apoptose (HARMAN, 1992; OZAWA, 1995; VALKO et al., 2007).

O estresse oxidativo pode afetar as funções fisiológicas normais e gerar inúmeras patologias como doenças cardiovasculares (STOCKER; KEANEY, 2004); doença de Alzheimer (ALIEV et al., 2013); diabetes (BONNEFONT-ROUSSELOT, 2004); doenças pulmonares (CANTIN, 2004) câncer (BERGER, 2005) e doenças reprodutivas (RIZZO et al., 2012; SHARMA; AGARWAL, 1996; WANG et al., 2003).

Para impedir a instalação do estado de estresse oxidativo existem os sistemas de defesa antioxidante enzimáticos e não enzimáticos que favorecem o reparo/defesa dos possíveis alvos biológicos alvejados (Tabela 2) (CLARKSON; THOMPSON, 2000; BERNARD; KRAUSE, 2007; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BIANCHI; ANTUNES, 1999). Os agentes antioxidantes são estabelecidos como qualquer substância que possua a capacidade de agir neutralizando as ações das ERO direta ou indiretamente e de modo eficaz (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Tabela 2.: Ações dos agentes antioxidantes.

Antioxidantes	Ação	Referências
Não enzimáticos (de origem dietética)		
Vitamina A (β -caroteno)	Proteção contra a oxidação de lipídeos e DNA	Rodrigo et al.
Vitamina C (ácido ascórbico)	Inibição das EROs (agente redutor). Estimula o poder antioxidante da vitamina E e selênio. Proteção contra danos causados pela LDL-ox	Rodrigo et al.
Vitamina E (α -tocoferol)	Proteção contra a peroxidação dos ácidos graxos insaturados da membrana celular e das LDL. Converte o O_2^{\bullet} e H_2O_2 em formas menos reativas	Rodrigo et al.
Cu, Zn, Mn, Se	Cofatores das enzimas antioxidantes SOD-Cu/Zn, SOD-Mn e GSH-Pox	Vicent et al.
Outros carotenóides (licopeno)	Proteção contra a oxidação de lipídeos, LDL, proteínas e DNA. Sequestra e inativa os radicais livres	Visioli et al.
Fitoquímicos (resverastrol, catequinas, quercetinas, ácidos fenólicos e outros)	Proteção contra a oxidação de lipídeos e DNA	Fito et al.
Enzimáticos		
SOD	SOD-Cu/Zn (citoplasma), SOD-Mn (mitocôndria). Catalisa a conversão do O_2^{\bullet} em H_2O_2	Vicent et al.
CAT	Catalisa a conversão do H_2O_2 em O_2 e H_2O	Vicent et al.
GPx	Catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O	Vicent et al.

DNA: ácido desoxirribonucléico; CAT: catalase; GPx: glutathione peroxidase; Cu: cobre; Zn: zinco; Mn: magnésio; Se: selênio; SOD: superóxido dismutase; EROs: espécies reativas de oxigênio; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; H_2O : água; O_2 : oxigênio; O_2^{\bullet} : radical superóxido; LDL: lipoproteína de baixa densidade; LDL-ox: Lipoproteína de baixa densidade oxidada

Fonte: Adaptado de BARBOSA, K.B.F. et al., 2008.

Dentre os agentes de defesa antioxidantes enzimáticos produzidos pelo organismo, a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) são enzimas de destaque citofisiológico (BARBOSA et al., 2008). Existem ainda as enzimas da família glutathione-S-transferases (GST), uma família de enzimas de detoxificação de fase II que comumente conjugam a glutathione reduzida com inúmeros compostos eletrofílicos endógenos e exógenos facilitando assim a excreção (COLES et al., 2002; HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005). Tradicionalmente essas enzimas protegem as células contra diversos insultos e encontram-se presentes tanto nos insetos quanto em mamíferos (YU; HUANG, 2000; RODRIGUES et al., 2013; KEATING et al., 2010).

Por outro lado, os agentes antioxidantes não-enzimáticos obtidos por meio da dieta incluem o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (vitamina A), carotenóides e fitoquímicos (BARBOSA et al., 2008). Além disso, em meio aos minerais tem-se o selênio (Se); o zinco (Zn), o cobre (Cu) e o magnésio (Mn) (BIANCHI; ANTUNES, 1999; PRASAD et al., 2007). A capacidade antioxidante *in vivo* dos agentes não-enzimáticos dependerá de algumas condições tais como a capacidade de absorção, a concentração, a biodisponibilidade em circunstância fisiológica e o tipo de ERO produzidas pelas reações oxidativas (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Além das fontes endógenas capazes de gerar os radicais livres, existem também as fontes exógenas provenientes do tabagismo, da radiação ultravioleta (UV), dos pesticidas e da exposição a compostos orgânicos voláteis (CAROCHO; FERREIRA, 2013; HERRLING; JUNG; FUCHS, 2006; BARBOSA et al., 2010). A possível relação entre o estresse oxidativo e exposição ocupacional a compostos orgânicos voláteis (VOCs) vem sendo estudada nas últimas décadas (KAO; SIPES; HOYER, 1999; PICELI, 2005; ABOLAJI et al., 2014). Dentre esses compostos orgânicos voláteis, evidencia-se o VCH e seus metabólitos por demonstrarem elevada toxicidade.

A exposição ao composto VCH pode ocasionar alterações metabólicas, induzindo o quadro de estresse oxidativo, acarretando em um desequilíbrio do estado redox celular o que compromete o funcionamento de várias enzimas antioxidantes e leva à produção excessiva de radicais livres (MAYNE, 2003; PICELI, 2005; FRANCO et al., 2009; BARBOSA et al., 2010; ABOLAJI et al., 2014; ABOLAJI et al., 2016a; ADEDARA et al., 2016a; ABOLAJI et al., 2015). As perturbações no equilíbrio da atividade e expressão das enzimas antioxidantes ocorrem devido ao envolvimento direto dos metabólitos denominados de VCM e VCD na toxicidade do VCH (ABOLAJI et al., 2014; ABOLAJI et al., 2015). Dentre os órgãos alvo afetados pelos danos oxidativos estão o fígado, o rim e mais comumente os órgãos reprodutores (ABOLAJI et al., 2014; ABOLAJI et al., 2015; ABOLAJI et al., 2016a; ADEDARA et al., 2016b).

1.1.3 Organismos modelos alternativos na pesquisa

O uso de animais para experimentação é considerado uma prática antiga datada em aproximadamente 400 a. C. por Hipócrates, o pai da medicina ocidental, que comparava órgãos humanos enfermos com o de animais (GREIF; TRÉZ, 2000). A experimentação animal envolve métodos executados em animais que visam revelar e compreender princípios ou reações desconhecidas que podem se estender direta ou indiretamente à perspectiva antrópica (PAIXÃO; SCHRAMM, 2001). Com o desenvolvimento da experimentação, teve-se um avanço no conhecimento biológico das espécies utilizadas em laboratório, além do surgimento de critérios para a escolha do modelo mais adequado, de modo a levar em consideração o porte, o período reprodutivo, o desenvolvimento rápido pelas diferentes fases de vida, fácil manuseio, criação e nutrição diversificada (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002). Dessa forma, entende-se por modelo animal uma espécie de animal que poderá ser usada em um dado procedimento experimental considerando a ação desejada do estudo que se quer realizar (PRESGRAVE, 2002).

Modelos animais na pesquisa são amplamente utilizados para a avaliação toxicológica de um determinado composto e incluem principalmente roedores de pequeno porte como ratos (*Rattus norvegicus*) e camundongos (*Mus musculus*).

Entretanto, várias discussões surgem sobre a quantidade de animais utilizados, especialmente nos estudos envolvendo dor, estresse ou sofrimento (PRESGRAVE, 2002). Notoriamente, o uso de animais de laboratório nos estudos científicos é alvo de discussão bioética. Apenas em 1876 no Reino Unido, surgiu a primeira lei que regulamenta o uso de animais na pesquisa por meio do 'British Cruelty to Animal Act'. Este ato sofreu uma reformulação em 1986, mas está em vigência até os dias de hoje (PARODI, 2009). Em meio aos debates internacionais frente às diretrizes e legislação sobre do uso de animais de experimentação, o Brasil concedeu a aprovação da lei conhecida como "Lei Arouca" (Lei 11. 794 de 8 de outubro de 2008) que visa regulamentar no país a utilização de animais em estudos científicos (BONELLA, 2009).

De fato, muito tem se discutido sobre métodos alternativos que serviriam para substituir o modelo animal de pesquisa, que para algumas áreas já pode ser considerada uma prática obsoleta (ARAÚJO et al., 2014). Por esse motivo, comumente tem-se dado incentivos para o uso de testes *in vitro* por meio de cultura de células ou *in silico* (KANDÁROVÁ; LETASIOVÁ, 2011; HARTUNG, 2011; SACHANA; HARGREAVES, 2018). Dentre os motivos que originaram a procura por modelos alternativos aos experimentais está a intencionalidade reducionista do meio científico diante da utilização de mamíferos nos ensaios toxicológicos (PETERSON et al., 2008).

Contudo, a concepção que se tem não é de extinguir completamente a utilização de animais nos estudos, mas sim reduzi-lo. A extinção, de fato, representaria um risco para o progresso do conhecimento biológico e desenvolvimento de novos fármacos, métodos cirúrgicos, comprometendo inclusive a produção de vacinas (MORALES, 2008). Assim, surge métodos que se insiram na diretriz dos três erres (3 Rs), denominada no inglês de 'reduction' (redução), 'refinement' (refinamento) e 'replacement' (substituição) (HARTUNG, 2011). O primeiro princípio, recomenda a redução no número de animais usados nos experimentos. O segundo princípio está diretamente relacionado ao aprimoramento das técnicas que visam evitar a dor e o sofrimento considerados desnecessários. E, por fim, a substituição diz respeito a substituição das experimentações com animais frente a organismos modelos alternativos, diferentes de mamíferos e com sistema nervoso difuso, como os insetos e outros invertebrados.

Os organismos modelos alternativos de pesquisa são utilizados em várias áreas, incluindo pesquisas científicas, ensino, diagnóstico de enfermidades e até mesmo na produção de medicamentos (ALVES; COLLI, 2006; DANIELSKI). Quanto aos

invertebrados, estima-se que compreendam cerca de 95% de todas as espécies de animais do Planeta Terra, e tem nos insetos os exemplares predominantes (MORALES 2008; LEWBART, 2011).

Para a pesquisa científica, ambos o verme *Caenorhabditis elegans* e a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* destacam-se por ser organismos modelos consolidados. Entretanto, outros invertebrados surgem complementares aos estudos toxicológicos como é o caso das baratas, em especial da espécie *Nauphoeta cinerea* (RODRIGUES et al., 2013; ABOLAJI et al., 2014; ADEDARA et al., 2015).

1.1.4 *Nauphoeta cinerea*

Estima-se que existam mais de 4.000 espécies de baratas amplamente distribuídas em todo o mundo (RAFAEL; SILVA; DIAS, 2008) e em várias estações do ano (FAKOORZIBA et al., 2010). Estes organismos possuem uma alimentação bastante heterogênea (RAFAEL; SILVA; DIAS, 2008) e vivem em ambientes muitas vezes considerados hostis ou insalubres para a sobrevivência de outras espécies (SEGATTO et al., 2018). Por esse motivo, algumas poucas espécies de baratas, principalmente as cosmopolitas como é o caso da *Periplaneta americana*, são consideradas disseminadoras de agentes infecciosos ao contaminar alimentos para ingestão humana ou por animais domésticos (PAI; CHEN; PENG, 2004; PAI; CHEN; PENG, 2005).

O uso de baratas como organismos modelos alternativos em pesquisa apresentam diversas vantagens em comparação com roedores. Destaca-se, por exemplo, a facilidade e o baixo custo de manutenção, o tamanho pequeno e o amplo potencial reprodutivo (HARRIS A MOORE, 2005; RODRIGUES et al., 2013). Além disso, muitas espécies de baratas apresentam respostas a contaminantes semelhante à resposta de roedores (AHMAD, 1995). Ainda, tem-se enfatizado na literatura a sua alta sensibilidade aos xenobióticos (ADEDARA et al., 2016a). Dessa forma, as baratas vêm sendo consideradas um organismo modelo não-mamífero promissor para estudos toxicológicos (BENZIDANE et al., 2010; RODRIGUES, et al., 2013; STÜRMER et al., 2014; ZEMOLIN et al., 2014; HUBER et al., 1990; ADEDARA et al., 2015).

Dentre as espécies de baratas, destaca-se a barata da espécie *Nauphoeta cinerea* (OLIVEIRA et al., 2017b). Essa espécie pertence à classe Insecta, da ordem Blattodea, da família Blaberidae, oriunda da região Leste da África e é encontrada em ambientes de clima tropical e temperado (CLOPTON, 2012). É considerada um inseto ovovivíparo e caracteriza-se por apresentar tonalidade escura dos segmentos e corpo ovoide (Figura 3). (CLOPTON, 2012; TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011; RUPPERT; BARNER, 1996).



Figura 3: Barata *Nauphoeta cinerea*

Fonte: Autor, (2019)

Sendo insetos de metamorfose hemimetábola, as baratas passam por uma fase de ovo durante um período de 30 a 45 dias que logo, após a eclosão, adquirem fase de ninfa, considerada uma forma jovem, imatura, sem asas e órgãos reprodutores desenvolvidos. Os ovos estão presentes na forma de ootecas com 25 a 35 ovos. Em seguida, passam por sucessivas mudas até atingirem, depois de 3 meses, a fase adulta propriamente dita, com órgãos reprodutores desenvolvidos e asas (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011). Importante destacar que o aparelho reprodutor das fêmeas possui um par de ovários e ovidutos laterais, um oviduto comum que liga o poro genital, duas glândulas acessórias e espermateca (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011; RUPPERT; BARNER, 1996). O aparelho reprodutor do macho é formado por dois testículos, vasos deferentes, vesículas seminais, glândulas acessórias, canal ejaculador e o edeago (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011; RUPPERT; BARNER, 1996). Em geral, no que diz respeito ao tamanho as baratas fêmeas dessa espécie quando adultas são maiores que os machos e não existe nenhuma evidência que o tamanho do corpo esteja correlacionado com a fecundidade, e está por sua vez dependerá das condições da vida adulta (Figure 4).

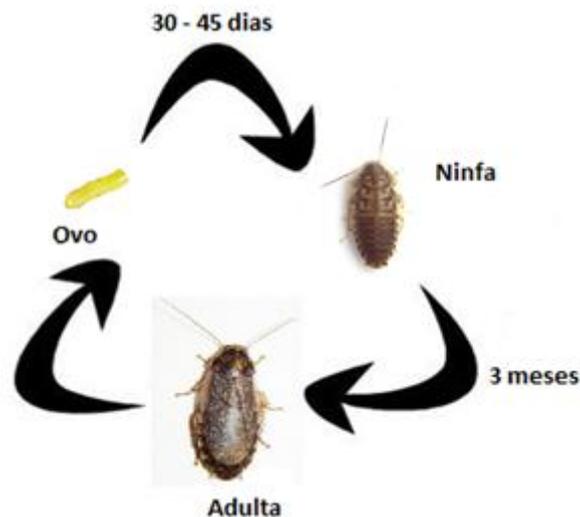


Figura 4: Ciclo de vida da barata *Nauphoeta cinerea*

Fonte: Autor, (2019)

O sistema nervoso do inseto possui três gânglios fusionados denominados protocérebro (inerva os olhos), deutocérebro (inerva as antenas) e o tritocérebro (inerva o intestino anterior). Os gânglios que compõem a estrutura do cordão nervoso que atravessam todo o corpo do inseto ventralmente são ligados por conexões axoniais. Dentre os neurotransmissores utilizados pelo sistema nervoso do inseto, destaca-se a acetilcolina (ACh) que também age como neurotransmissor no sistema nervoso central em vertebrados (HAREL et al., 2000). De modo comparativo, existem mais moléculas de ACh no SNC de insetos do que em roedores (SATTELLE; BREERT, 1990). A acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela degradação da ACh e é importante para funcionamento do SNC (LEIBSON; LIFSHITZ, 2008). Ensaio envolvendo a avaliação da atividade da enzima AChE são utilizados como biomarcadores frente a exposição a inúmeros agentes tóxicos (ABOLAJI et al., 2014; KIM et al., 2014; ABOLAJI et al., 2015). Importante ressaltar que, muitas baratas possuem resistência intrínseca contra pesticidas de ação neurotrópica (HEMINGWAY; SMALL; MONRO, 1993), fenômeno esse concedido a níveis elevados da atividade da enzima glutatona s-transferase (GST) nesses insetos (MA; CHANG, 2007). Outras defesas antioxidantes também ganham destaque em baratas, como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPX) e ascorbato peroxidase ganham destaque (BARBEHENN, 2002).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos toxicológicos da inalação crônica do composto 4-vinilciclohexeno (VCH) no modelo experimental de barata ninfa *Nauphoeta cinerea*, a fim de auxiliar na compreensão dos efeitos desse subproduto industrial na saúde humana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Construir uma caixa metabólica e padronizar a exposição pela via inalatória em ninfas de ambos os sexos;
- II. Quantificar o nível de VCH volatilizado no ambiente das caixas metabólicas por cromatografia gasosa equipada com Detector de Ionização de Chama (CG/DIC);
- III. Avaliar a taxa de sobrevivência das baratas ninfas frente a exposição do VCH por inalação;
- IV. Quantificar o peso das baratas ninfas, bem como dos órgãos/tecidos dissecados (cabeça, corpo gorduroso, ovários e testículos);
- V. Avaliar a atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST) e quantificar os níveis de espécies reativas nos diferentes tecidos selecionados das baratas ninfas expostas por inalação ao VCH espontaneamente volatilizado;

3 RESULTADOS

Os resultados da tese estão apresentados na forma de um artigo publicado e formatado conforme as normas da revista *Environmental Toxicology and Pharmacology*, intitulado “Assessing the toxicant effect of spontaneously volatilized 4-vinylcyclohexene exposure in nymphs of the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*”.



Environmental Toxicology and Pharmacology

Volume 72, November 2019, 103264



Assessing the toxicant effect of spontaneously volatilized 4-vinylcyclohexane exposure in nymphs of the lobster cockroach *nauphoeta cinerea*

Emily Pansera Waczuk ^a, Roger Wagner ^b, Klein, Bruna ^b, João Batista Teixeira da Rocha ^a, Daniel M.P. Ardisson-Araújo ^a  , Nilda Vargas Barbosa ^a  

 [Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103264>

[Get rights and content](#)



Assessing the toxicant effect of spontaneously volatilized 4-vinylcyclohexane exposure in nymphs of the lobster cockroach *nauphoeta cinerea*



Emily Pansera Waczuk^a, Roger Wagner^b, Klein Bruna^b, João Batista Teixeira da Rocha^a, Daniel M.P. Ardisson-Araújo^{a,*}, Nilda Vargas Barbosa^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

^b Departamento: Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Vinylcyclohexene
Nauphoeta cinerea
Glutathione S-transferase
Oxidative stress

ABSTRACT

Vinylcyclohexene (VCH) is an environmental contaminant well known for its ovotoxicant effects in several organisms. However, the mechanisms underlying the toxicity of VCH as well as its harmful effects toward other organs are until unclear. In this work, we assess some endpoint signals of toxicity induced by volatilized VCH exposure using nymphs of the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*. Nymphs were exposed to VCH via inhalation for 70 days. The levels of volatilized VCH were quantified by headspace gas chromatography and the concentration varied between 3.41 and 7.03 nmol/μl. VCH inhalation caused a reduction of 35% in the survival rate of the exposed animals. Nymphs exposed to volatilized VCH for 35 and 70 days had a reduction in the body weight gain of 1.8- and 2.6-fold, respectively with a reduction in dissected head, fat body, and maturing reproductive organs. The exposure did not change water consumption, excepting on the 20th day (with a 3-fold change) and decreased the food intake significantly. Regarding biochemical markers, we found that the activity of GST from the dissected organs was increased by volatilized VCH after both 35 and 70 days of exposure. The fat body presented the most prominent GST activity especially after 35 days of exposure with 1.6-fold higher than the control group. Exposure also caused an increase in RS levels in the fat body of 1.35-fold and 1.47-fold after 35 and 70 days, respectively and did not affect the activity of the AChE from the head. Our findings support the harmful impact of volatilized VCH inhalation, highlighting the cockroach *N.cinerea* as a valuable insect model to investigate environmental toxicants.

1. Introduction

Many volatile compounds derived from organic solvents and industrial processes are powerful pollutants (EPA, 1989, 1991) that commonly associate itself with neurological, immunological, and reproductive dysfunctions in humans. The occupational chemical 4-vinylcyclohexene (VCH) is widely employed as a diluent for epoxy resins and a by-product of plastic, pesticides, and rubber in industries (National Toxicology Program (NTP), 1986). Exposure to VCH may occur through ingestion, dermal contact, and inhalation (Dhillon and Von Burg, 1996). The metabolism occurs in liver and ovary and involves the action of cytochromes P450 isoforms that convert VCH to epoxide metabolites potentially toxics including 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) and 4-vinylcyclohexene-1,2-monoepoxide (VCM)

(Doerr-Stevens et al., 1998; Hoyer et al., 2012; Rajapaksa et al., 2007; Keating et al., 2008).

VCH targets mainly the reproductive organs of the exposed animal. In rodents, the exposure of female causes death of ovary follicles (Flaws et al., 1994; Dhillon and Von Burg, 1996; Springer et al., 1996; Abolaji et al., 2016ba). In the male, VCH induces testicular toxicity by decreasing testis weight and provoking necrosis of germ cells (Adedara et al., 2017). Therefore, the United States Environmental Protection Agency and many industries have focused special attention on the human inhalation exposure to VCH due to its potential to induce ovarian failure in women (EPA 1989, 1991). Although the ovotoxicant effects of VCH are well known and commonly used to prompt ovarian failure in experimental protocols, the exact mechanisms underlying its toxicity remain unclear (Kappeler and Hoyer, 2012). Moreover, the

* Corresponding authors at: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

E-mail addresses: daniel.lamujo@ufsm.br (D.M.P. Ardisson-Araújo), nvbarbosa@yahoo.com.br (N.V. Barbosa).

<https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103264>

Received 27 May 2019; Received in revised form 16 August 2019; Accepted 12 September 2019

Available online 16 September 2019

1382-6689/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

knowledge regarding the deleterious effects elicited by VCH toward other tissues are incipient and seem to include in the targeted cell oxidative stress and apoptosis (Springer et al., 1996; Abolaji et al., 2015, 2016b; Adedara et al., 2017).

The lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* (Blattodea: Blaberidae) is an ovoviviparous cockroach from East Africa that has been used as an organism model in toxicological studies (Springhetti and Cioci, 1961; Rodrigues et al., 2013; Adedara et al., 2017; Afolabi et al., 2018; da Silva et al., 2018d). Many similar features found between cockroach systems and vertebrates make its use relevant to characterize novel experimental approaches in the toxicological researches (Springhetti, 1962; Shambaugh et al. 1969; Huber et al. 1990). Moreover, the insects present several advantages for the development of basic research such as easy handling and maintenance, simple anatomy, small size, and short life cycle (Wüest, 1978; Sattelle and Breert, 1990).

In this work, we used nymphs of the lobster cockroach to explore whether, along with reproductive organs, other tissues could be impacted by VCH intoxication, which would affect enzymes functioning and oxidative balance. Therefore, our findings suggest *N. cinerea* as an alternative organism model to access toxicant effects of anthropic xenobiotics. We found that volatilized VCH, when inhaled, caused a reduction in the survival rate over 70 days of exposure. The insects presented a decrease in total body weight gain including a reduction in fat body content, the head, and reproductive organs when compared to the not exposed insects. Moreover, detoxifying activities involving the GST were increased in the head, fat body, and immature reproductive organs. The most noticeable difference was found in the fat body that led to imbalanced reactive species level.

2. Materials and methods

2.1. Cockroaches colony

The *Nauphoeta cinerea* cockroaches were raised in the Laboratory of Toxicological Biochemistry, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brazil. Cockroaches were housed in VCH-free plastic boxes (40 × 40 × 30 cm) with filtered water and an artificial diet (Adedara et al., 2016) offered *ad libitum*. The insects were maintained at a controlled condition of 25 ± 1 °C, humidity 60%, 12 h light/12 h dark.

2.2. Cockroach nymphs exposure to 4-Vinylcyclohexene (VCH)

In order to evaluate the toxicity of VCH (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) via inhalation, cockroach nymphs (280–300 mg) were placed in twelve adapted boxes containing 30 subjects each. We adapted the metabolic boxes to allow the collection and measure of feces and water/food intake. Six boxes were exposed to VCH for 70 days and six boxes were maintained as control. VCH (1 ml) was placed inside 2 ml opened small flask and allowed for spontaneous volatilization inside the boxes. We replaced the vials every other two days. To avoid inhalator contamination, the boxes were maintained into a horizontal laminar flow chamber containing a partition to separate the groups. The levels of volatilized VCH in the system was monitored at 10, 20, 30, and 70 days of exposure by headspace gas chromatography with flame-ionization detection (HS-CG-FID). The experiments were carried out in triplicate for each group (n = 3 replicates with 60 individuals per group, separated in 2 boxes that were considered one to count dead insects).

2.3. VCH quantification by headspace gas chromatography with flame-ionization detection (HS-CG-FID)

Volatilized VCH levels in the treated boxes air were determined using a gas chromatograph VARIAN 3400 equipped with flame ionization detector (FID). 1 ml aliquots of headspace gas were sampled from the metabolic boxes using a gas-tight syringe of 2.5 ml capacity for the chromatographic analysis. We operated the injector in a splitless mode

(30 psi, 250 °C) with hydrogen as the carrier gas in Equity[™]-5 capillary column (L × I.D. 60 m × 0.2 mm, d_i 0.2 μm) (Supelco, St. Louis, MO, USA). Operating conditions were programmed as follows: 60 °C for 1 min, 15 °C/min until 250 °C, holding for 13 min. To determine the concentration of VCH from samples, calibration curves were constructed using standard solutions of VCH dissolved in hexane at concentrations that ranged from 0.18 to 22.8 nmol/μl. Quantifications were performed in triplicates.

2.4. Survival rate, weight, food/water intake, and feces production

The survival rate was evaluated by counting daily the number of living nymphs until the end of the experimental period (70 days). Nymphs from each box were pooled and weighed once a week as well as the consumption of food and water and the production of feces.

2.5. Tissue preparation for biochemical assays

We collected tissues from the nymphs at 35 and 70 days of exposure. Nymphs were anesthetized on ice for 10 min and after that, head, fat body, and reproductive organs were isolated, weighed, and homogenized in cold 0.1 M potassium phosphate buffer (PPB), pH 7.4 in a homogenizing potter. The homogenate was centrifuged at 13,000 × g for 10 min at 4 °C. Total protein was quantified in the supernatant by the Bradford assay using bovine serum albumin as the standard. The protein concentration was adjusted to 1 mg/ml with 0.1 M phosphate buffer and each sample was individually used for biochemical assays.

2.6. Acetylcholinesterase activity in nymph heads

The acetylcholinesterase (AChE) in the nymph head was determined according to the method described by Ellman et al. (1961), with minor modifications. Briefly, the enzymatic reaction contained 10 mM PPB (pH 7.4), 2.4 mM 5,5'-dithiobis(2-nitro-benzoic acid) (DTNB, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0.8 mM acetylthiocholine iodide (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 20 μl of sample (1 mg/ml of protein). The enzyme activity was monitored for 30 min with interval of 1 min. Absorbance was determined at 412 nm in a spectrophotometer Spectra Max plate reader and results were expressed as units/mg protein.

2.7. Glutathione-S-transferase activity in head, fat body, and reproductive organs

Glutathione-S-transferase (GST) enzyme activity was determined in homogenates of the head, fat body, and immature reproductive organs adapted from Habig et al. (1981). The enzymatic reaction contained 50 mM phosphate buffer (pH 7.4), 1 mM reduced glutathione, 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and 40 μl of the sample (1 mg/ml). Enzyme activity was assessed for 30 min with intervals of 1 min. Absorbance was determined at 340 nm in a spectrophotometer Spectra Max plate reader and results were expressed as mmol/min/mg protein for the formation of formation of the thioether S-2, 4-dinitrophenyl glutathione.

2.8. Reactive species (RS) levels in head, fat body, and immature reproductive organs

RS levels were indirectly measured according to Pérez-Severiano et al. (2004). The method is based on the deacetylation of the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and its oxidation by RS to dichlorofluorescein (DCF). Briefly, 75 mM phosphate buffer (pH 7.4) and 5 μM DCFH-DA were mixed with 20 μl of each sample. The fluorescence was monitored at 488 nm of emission and 525 nm excitation, for 30 min with intervals of 1 min using a spectrophotometer Spectra Max plate reader. Results were expressed as delta of arbitrary fluorescence units (ΔAFU), using a standard curve with DCF.

Table 1
Determination of VCH levels of air samples during the treatment.

Days	VCH levels \pm SD (nmol/ μ l)
10	7.03 \pm 0.35
20	4.78 \pm 0.27
30	4.70 \pm 0.15
70	3.41 \pm 0.07

2.9. Statistical analysis

Survival rate curve was performed using the Kaplan-Meier survival plot and calculated by the log-rank (Mantel-Cox) test while the other *in vivo* parameters by two-way ANOVA-Repeated measures followed by Bonferroni's *post hoc* test when appropriate. The *in vitro* assays were performed using unpaired *t*-test. Results were expressed as mean \pm standard deviation and analyzed using the Graph Pad Prism software version 6.0. Significant levels were considered when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Spontaneously volatilized 4-Vinylcyclohexene (VCH) quantification and survival rate of lobster cockroach nymphs exposed

The levels of volatilized VCH were quantified at 10, 20, 30, and 70 days of exposure and varied among 3.417 and 7.030 nmol/ μ l (Table 1). In order to evaluate the inhalation toxicity of VCH, we carried out a survival analysis to compare exposed and non-exposed animals during 70 days of lifespan. We found that the inhalation of volatilized VCH by the cockroaches reduced the survival rate (Fig. 1) with a significant difference when compared to the control groups ($p = 0.0161$). The highest mortality took place up to 30 days of exposure and no more nymphs died afterward (Fig. 1, red line). This observation endured up to the 70th days of exposure, indicating likely a long-term tolerance for volatilized VCH by the insects. At the end of the experiment, the reduction in survival rate was 35% for the exposed group besides residual death has been observed for the control group (16% of reduction; Fig. 1, black line).

Air samples (1 ml) were collected every 10 days from boxes for VCH quantification by HS-CG-FID. Each quantification was performed in triplicate using a calibration curves with standard solutions of VCH dissolved in hexane at concentrations from 0.18 to 22.8 nmol/ μ l.

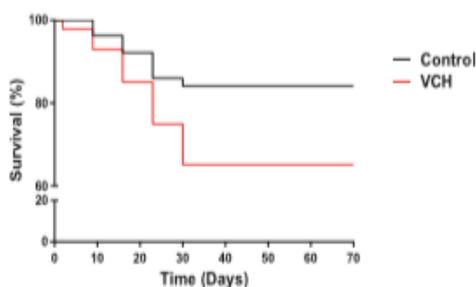


Fig. 1. Kaplan-Meier survival curves for 70 days cockroach nymphs lifespan when exposed by inhalation (red line) or not (control) to 4-Vinylcyclohexene (VCH). Survival rate curve was performed in a Kaplan-Meier survival plot and calculated by the log-rank (Mantel-Cox) test. The experiments were carried out in triplicate ($n = 60 \times 3$ for each replicate).

Table 2

Impact of volatilized VCH inhalation in nymphs of *Nauphoeta cinerea* after 35 and 70 days of exposure on weight gain of total insect body, head, fat body, and maturing reproductive organs.

Groups	Body weight gain (mg)	Tissues		
		Head (mg)	Fat body (mg)	Reproductive organs (mg)
35 days				
Control	340.7 \pm 0.05	24.8 \pm 0.02	62.9 \pm 0.01	3.0 \pm 0.04
VCH	180.3 \pm 0.10**	21.3 \pm 0.03**	41.0 \pm 0.01*	2.4 \pm 0.03*
70 days				
Control	672.2 \pm 0.09	26.4 \pm 0.05	35.6 \pm 0.06	3.0 \pm 0.05
VCH	258.1 \pm 0.07**	23.3 \pm 0.04*	30.6 \pm 0.05*	2.0 \pm 0.03**

* $p < 0.05$ for VCH compared with the control group by Student's *t*-test.

** $p < 0.001$ for VCH compared with the control group by Student's *t*-test.

3.2. Weight gain reduction of total body, head, fat body, and maturing reproductive organs

We evaluate the impact of volatilized VCH inhalation in the cockroach body weight gain at 35 and 70 days of exposure (Table 2). Nymphs exposed to VCH had a significant reduction in body weight gain when compared to the control group. The inhalation of volatilized VCH for 35 days reduced in about 1.8-fold the weight gain compared to the control group. On the other hand, inhalation of volatilized VCH for 70 days reduced in about 2.6-fold the nymph weight gain compared to the control group. We also measured the weight gain for three individual tissues that hypothetically seem to be impacted by exposure to VCH including head, fat body, and maturing reproductive organs. Interestingly, 35 days of volatilized VCH exposure reduced the gain of the fat body. We found a reduction of 1.16-, 1.53-, and 1.25-fold of the weight gain for the head, fat body, and maturing reproductive organs respectively. At 70 days of exposure, volatilized VCH reduced the weight gain of maturing reproductive organs in 1.5-fold when compared to the control group. We found a reduction of 1.13- and 1.16-fold of the weight gain for head and fat body respectively.

3.3. Consumption of food and water and feces content

Nymphs exposed to volatilized VCH had a significant reduction in food consumption compared to the control group (Fig. 2). This is consistent with the fact that VCH inhalation caused a decrease in body weight gain during 35 and 70 days of exposure (Table 2). The food intake was reduced significantly during the first ten days of exposure to VCH (Fig. 2, continued lines). We did not find any significant difference during 20 and 30 days of exposure. However, after 40 days of exposure, the food intake was markedly reduced and that endured until the end of the experiment. Statistical analysis also revealed a significant VCH \times time interaction ($F_{6,24} = 4.91$, $p = 0.0021$), and a main effect of time ($F_{6,24} = 7.98$, $p < 0.0001$) and VCH ($F_{1,4} = 6.78$, $p = 0.0059$).

As expected based on the fact that cockroaches had eaten less food during long-term exposure, we found less feces production after 40 days of exposure (Fig. 2C). That reduction lasts until the end of the experiment with significant difference compared to the control group (Fig. 2B). Importantly, food intake seems to decrease as cockroaches mature even though the reduction for exposed animals was significant discrete (Fig. 2A, dashed lines marked with asterisks). Here there is also a significant VCH \times time interaction ($F_{6,24} = 7.64$, $p < 0.0001$) and a main effect of VCH ($F_{1,4} = 5.092$, $p < 0.0087$) and time exposure ($F_{6,24} = 4.48$, $p < 0.0035$).

In the opposite way to that trend, on the 20th day of exposure, nymphs significantly increased water consumption in more than 3-fold when compared to the control group (Fig. 2C). This observation was maintained for no longer exposure times. Two-way analysis indicated a significant interaction between VCH \times time exposure ($F_{6,24} = 9.028$,

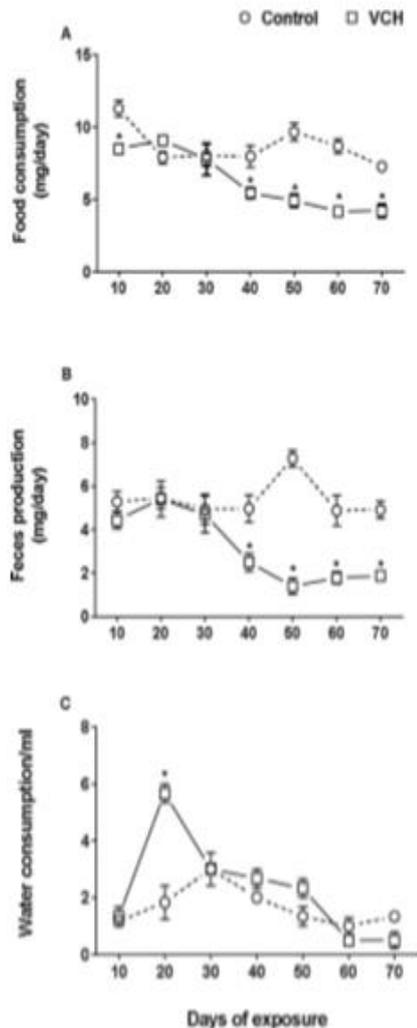


Fig. 2. Water/food consumption and feces production of nymphs exposed to volatized VCH measured every 10 days for 70 days of exposure. (A) Food consumption. (B) Feces production. (C) Water consumption. Data are presented as mean and error bars as standard deviation. * $p < 0.05$ indicates statistical difference from control group by Two-way ANOVA Repeated measures. Circle: not exposed groups; square: VCH exposed groups. The experiments were carried out in triplicate ($n = 60 \times 3$ for each replicate).

$p < 0.0001$, and a main for the time ($F_{6,24} = 31.55$, $p < 0.0001$).

3.4. Glutathione-S-transferase activity in head, fat body, and reproductive organs

Glutathione-S-transferase (GST) enzyme activity was individually determined in homogenates of the head, fat body, and dissected maturing reproductive organ of nymphs exposed to volatized VCH on both 35th and 70th day of exposure (Fig. 3). Volatized VCH caused a significant increase in the GST activity in homogenates from head (Fig. 3A), fat body (Fig. 3B), and immature reproductive organ (Fig. 3C) in all tested time of exposure. The increase measured in the fat body was the most prominent especially after 35 days of exposure with 1.6-fold higher than the control group (Fig. 3B). On the other hand, the activity found in maturing reproductive organs homogenate had a

slight increase of 1.4-fold for GST activity after 35 days of exposure when compared to the control group (Fig. 3 C). Fat body and head presented a basal GST activity markedly higher than reproductive organs considering 35 and 70 days of experiment for both control group and exposure.

3.5. Reactive species (RS) levels in head, fat body, and immature reproductive organs

RS levels in the organ homogenates were measured on both 35th and 70th day of exposure to volatized VCH (Fig. 4). The fat body homogenate presented increased levels of reactive species (RS) when compared to the control group (Fig. 3). This difference was small on the 35th with an increase of 1.35-fold whereas on the 70th the RS levels were 1.47-fold higher than that observed in the control group. Both head and maturing reproductive organs presented no significant difference in RS levels during volatized VCH exposure when compared to the control (data not shown).

3.6. Acetylcholinesterase activity in nymph heads

Nymphs present a high concentration of neural tissue in the head due to the presence of three brain regions directly responsible for specific sensorial processing including vision, tasting, and olfaction. We found no difference in the AChE activity in the head homogenate of nymphs exposed to volatized VCH even after 70 days of exposure (data not shown).

4. Discussion

Similar to other species, the prolonged inhalation exposure of VCH in nymphs of *N. cinerea* induced overt signals of toxicity including mortality, decrease in food consumption, and reduction in body mass. The toxicant inhalation also enhanced the GST activity in homogenates from the head, fat body, and maturing reproductive organs. Moreover, the levels of RS in the fat body was also increased. Although few studies have addressed VCH effects in invertebrates, similar responses have already been reported in *D. melanogaster* fed on diets containing VCH and its toxicant metabolites VCM and VCD. Exposure in flies caused a locomotor deficit, GST activity change, and redox unbalance as indicated by RS overproduction, thiol depletion, and transcriptional disruption in antioxidant enzymes-coding genes (Abolaji et al., 2016a; 2015).

Experimental studies with rodents have demonstrated that VCH and its metabolites induced ovarian toxicity by triggering death of germinal cells and severe damage of reproductive organs such as oocytes destruction, induction of ovarian tumors, and testicular/epididymal abnormalities (Flaws et al., 1994; Hooser et al., 1995; Abolaji et al., 2016a; Adedara et al., 2017). The susceptibility of different organisms to VCH ovotoxicity appears to be associated with the ability in bioactivating VCH to VCH epoxides (Bevan et al., 1996). In mammals, liver and reproductive organs are the main sites of bioactivation of VCH. VCH metabolism comprises the action of cytochrome P-450 that converts it to the epoxide metabolites VCM and VCD (Smith et al., 1990; Doerr-Stevens et al., 1998). The major cytochrome P-450 isoforms involved in the epoxidation of VCH are the cytochromes P-450 2A and 2B (CYP2A and CYP2B, respectively) (Smith et al., 1990; Fontaine et al., 2001; Rajapaksa et al., 2007). CYP2A transforms VCH in VCM that by the action of CYP2B is metabolized to VCD, the most potent ovotoxicant form. The metabolites may be inactivated by microsomal epoxide hydrolase (mEH) and glutathione-S-transferase (GST), enzymes that have a critical impact on ovotoxicity mediated by VCH (Gervasi et al., 1980; Giannarini et al., 1981; Keating et al., 2008; Bhattacharya et al., 2013). Importantly, commensal microorganism metabolism may enhance or even protect from toxicant effects of some xenobiotics as previously observed (Sepehri and Sarrafzadeh, 2019).

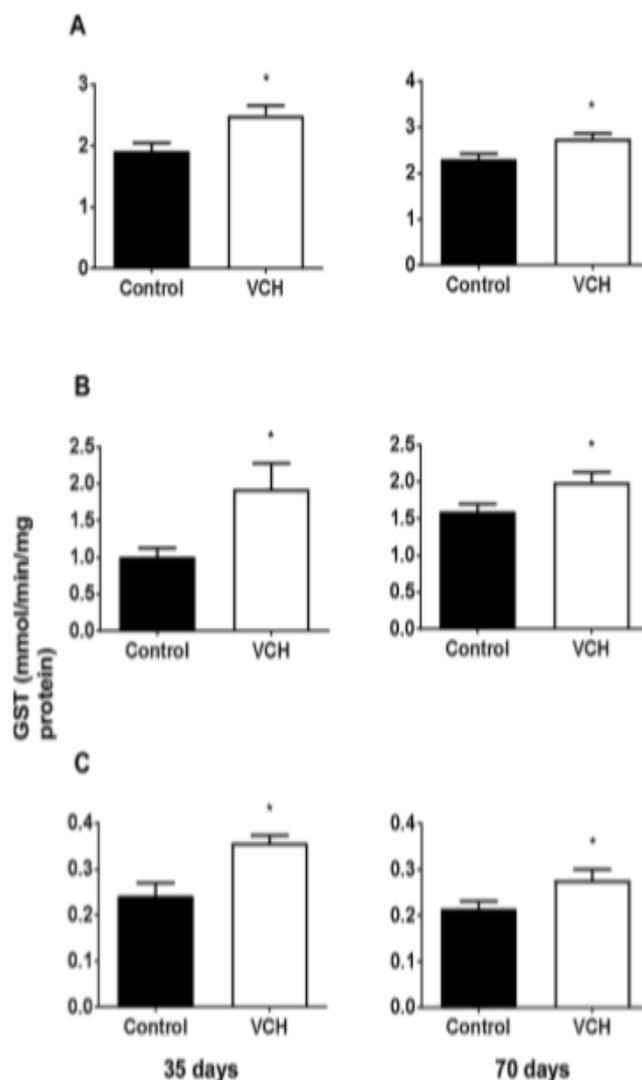


Fig. 3. Glutathione S-transferase activity of nymphs exposed to volatilized VCH during 35 ($n = 12$ individuals) and 70 days ($n = 28$ individuals). GST activity was measured in homogenate from (A) head, (B) fat body, and (C) reproductive organs tissues of cockroach nymphs. Results were expressed as mmol/min/mg and standard deviation are presented as error bars. * $p < 0.05$ indicates statistical difference from control group by Student's t-test.

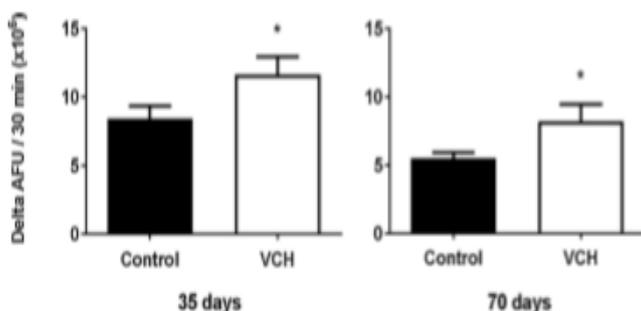


Fig. 4. Reactive species levels in nymphs exposed to volatilized VCH during 35 and 70 days. RS levels were determined using the fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) and assessed in homogenate of fat body. Results are expressed as delta of arbitrary fluorescence units (Δ AFU) and standard deviation are presented as error bars. * $p < 0.05$ indicates statistical difference from control group by Student's t-test ($n = 12$ individuals).

Corroborating with data from literature in other organisms, the maturing reproductive organs from nymphs of *N. cinerea* seemed to be targeted by VCH, presenting a marked reduction of size. Indeed, VCH have likely been metabolized to the ovotoxicant forms in the

reproductive organs or in the fat body that has a metabolic role analogous to the vertebrate liver (Gutierrez et al., 2007). This assumption is sustained by findings from a recent work comparing the transcriptome of two tissues of *N. cinerea* including the fat body and head (Segatto

et al., 2018): almost 400 transcripts classified into those genes related to detoxification and stress-balancing pathways were found. The transcripts assigned into the cytochrome P-450 family were the most abundant. By specific gene analyses, the authors found that the top hit species to *N. cinerea* transcripts were *Zootermopsis nevadensis*, *Blattella germanica*, and *Periplaneta americana*. These results are in accordance with the recent paper describing the complete genome of the American cockroach *P. americana* (Sheng et al., 2018). Gene families associated with environmental adaptation, such as chemoreception and detoxification seemed to be expanded in *P. americana* and other associated blattodean species when compared to the fruit fly *Drosophila*. Interestingly, these expansions presented genes related to olfactory receptors, gustatory receptors, ionotropic receptors, odorant-binding proteins, carboxyl/choline esterases and, especially for this work, expansions involving glutathione S-transferases, and P-450 cytochromes.

GSTs are classified according to their cellular localizations into three major families cytosolic, mitochondrial/peroxisomal, and microsomal enzymes. In insects, GSTs are cytosolic and subdivided into at least six classes including delta, epsilon, omega, sigma, theta, and zeta, based on phylogenetic analyses (Sheehan et al., 2001; Sookkrung et al., 2018). In addition to xenobiotic detoxification, GST is also an indirect antioxidant defense by catalyzing reactions toward neutralization of products from lipid peroxidation. We found a significant increase in the enzyme activity in the tissues evaluated, pointing GST activation as an important pathway for VCH detoxification in nymphs of *N. cinerea*. Studies with rodents have highlighted the role of GST as a central ovarian/testicular response to VCD, contributing to both VCD detoxification and prevention of apoptosis (Bhattacharya et al., 2013; Adedara et al., 2017). The cockroaches are known for their prominent resistance against insecticide, a phenomenon that has been attributed to elevated expression of GST (Sookkrung et al., 2018). This feature may also be responsible for the not so drastic effects of VCH upon nymphs when compared to other invertebrates such as *D. melanogaster* (Abolaji et al., 2015). Interestingly, in nymphs of *Blattella dubia* (Blattodea: Blaberidae), GST along with antioxidant enzymes have already been highlighted as biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) pollution (Mrdaković et al., 2019).

Acetylcholine (ACh) is an essential neurotransmitter selected during the evolution of the insect nervous system and has been shown to be the main excitatory neurotransmitter in brain (Sattelle et al., 1990; Stankiewicz et al., 2012; Thapa et al., 2017). ACh is required for a wide range of processes, including locomotion, visual processing, mating, and olfactory learning (Nichols, 2006; Casida and Durkin, 2013). For instance, the ACh-binding nicotinic receptors are widely distributed in the insect central nervous system and constitute one of the major targets for many toxicants such as pesticides. In the cockroach *P. americana* the cholinergic systems have both excitatory and inhibitory effect. Nicotinic receptors play a critical role in the excitatory transmission and may be involved in inhibitory signaling as well (Pedin, 1980). AChE, responsible for the ACh breaking down, is a target enzyme for many insecticides. The structure of insect AChE is similar to the vertebrates, and the isoforms of the enzyme are primarily found in nerve cells of the brain and thoracoabdominal region (Smallman and Mansingh, 1969; Thapa et al., 2017). We assessed the possible neurotoxicity of VCH in nymphs by measuring AChE activity in the head. Although the exposure to VCH had caused a decrease of head weight, the AChE activity from the nymph head was not affected. On the other hand, a study using *D. melanogaster* as target invertebrate showed that the activity of AChE was inhibited after exposure to VCM and VCD for 5 days (Abolaji et al., 2015).

In insects the oxidative stress is a phenomenon triggered by a wide range of occupational toxicants (Sudati et al., 2013; Rodrigues et al., 2013; Adedara et al., 2016; Klimaczewski et al., 2018; Mrdaković et al., 2019). Regarding VCH intoxication, mechanistic findings have demonstrated that the reproductive toxicity mediated by the compound and its metabolites involve oxidative damage along with tissue

inflammation and cell apoptosis (Abolaji et al., 2016a, 2016b; Adedara et al., 2017). These effects have already been observed in liver and kidney of rodents exposed to VCH metabolites (Abolaji et al., 2016b). Interestingly, we found an increased production of RS in the fat body of nymphs intoxicated with volatilized VCH, an effect that was not verified in the head and maturing reproductive organs. In cockroaches the fat body mimics hepatic functions, the most critical tissue for VCH metabolism (Gutierrez et al., 2007).

In summary, the findings from the present study demonstrated for the first time that nymphs of *N. cinerea*, when exposed to spontaneously volatilized VCH, developed alterations in the maturing reproductive organs, head, and fat body weight along with other signals underlying intoxication including biochemical changes. In addition, our data indicated that GST plays a central role in VCH-induced toxicity in cockroach nymphs.

Funding

This work was supported by FAPERGS/Pronem, CAPES/PROEX (23038.005848/2018-31), FINEP(CTINFRA), FAPERGS-CAPES (DOCFIX: 33581.466.15808.03042018), FAPERGS-CNPq (12/2014), PRONEX (16/255100044994), CNPq (INCT: 465671/20144).

Declaration of Competing interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgments

The financial support by FAPERGS/Pronem, CAPES and CNPq is gratefully acknowledged. J.B.T.R, R.F and N.V.B are recipients of CNPq fellowships.

References

- Abolaji, A.O., Adedara, I.A., Abajingin, A.O., Fatumibi, O.J., Ladipo, E.O., Farambi, E.O., 2016a. Evidence of oxidative damage and reproductive dysfunction accompanying 4-vinylcyclohexene dioxide exposure in female Wistar rats. *Reprod. Toxicol.* 66, 10–19.
- Abolaji, A.O., Toloyai, P.E., Odeleye, T.D., Akinduro, S., Rocha, J.B.T., Farambi, E.O., 2016b. Hepatic and renal toxicological evaluations of an industrial organic chemical, 4-vinylcyclohexene dioxide, in both sexes of Wistar rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 45, 28–40.
- Abolaji, A.O., Kamdem, J.P., Lugokembi, T.H., Farambi, E.O., Souza, D.O., da Silva Lareto, E.L., Rocha, J.B., 2015. Oestrogenic 4-vinylcyclohexene 1,2-epoxide and 4-vinylcyclohexene dioxide disrupt redox status and modify different electrophile sensitive target enzymes and genes in *Drosophila melanogaster*. *Redox. Biol.* 5, 328–339.
- Adedara, I.A., Abolaji, O., Ladipo, E.O., Fatumibi, O.J., Abajingin, A.O., Farambi, E.O., 2017. 4-Vinylcyclohexene dioxide disrupts sperm characteristics, endocrine balance and redox status in testes and epididymis of rats. *Reprod. Report.* 22 (6), 988–998.
- Adedara, I.A., Eisenberg, D.B., de Souza, D., Farambi, E.O., Aschner, M., Souza, D.O., Rocha, J.B.T., 2016. Neurobehavioral and biochemical changes in *Nauphoeta cinerea* following dietary exposure to chlorpyrifos. *Pestic. Biochem. Physiol.* 130, 23–30.
- Afolabi, B.A., Adedara, I.A., Souza, D.O., Rocha, J.B.T., 2018. Dietary co-exposure to methylmercury and monosodium glutamate disrupts cellular and behavioral responses in the lobster cockroach, *Nauphoeta cinerea* model. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 64, 70–77.
- Bevan, C., Stadler, J.C., Elliott, G.S., Frame, S.R., Baldwin, J.K., Lesog, H.W., Muras, F., Panepinto, A.S., 1996. Subchronic toxicity of 4-vinylcyclohexene in rats and mice by inhalation exposures. *Fundam. Appl. Toxicol.* 3, 1–10.
- Bhattacharya, P., Madden, J.A., Sen, N., Hoyer, P.B., Keating, A.J., 2013. Glutathione S-transferase class mu regulation of apoptosis signal-related kinase 1 protein during VCD-induced oostomaticity in neonatal rat ovaries. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 267, 49–56.
- Casida, J.E., Durkin, K.A., 2013. Anticholinesterase insecticide retrospective. *Chem. Biol. Interact.* 203, 221–225.
- da Silva, C.S., Gonçalves de Lima, R.C., Elekofehinti, O.O., Ogumolade, Y., Duarte, A.K., Rocha, J.B.T., Alencar de Menezes, L.R., Barros, L.M., Tsoposo, A., Lakoag, K.K., Kamdem, J.P., 2018b. Caffeine-supplemented diet modulates oxidative stress markers and improves locomotor behavior in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Chem. Biol. Interact.* 282, 77–84.
- Dhillon, S., Von Burg, R., 1996. Toxicology update. *J. Appl. Toxicol.* 16, 465–468.
- Doerr-stevens, J.K., Liu, J., Stevens, G.J., Kramer, J.C., Fontaine, S.M., Halpert, J.R., Sipod,

- G., 1998. Induction of cytochrome p-450 enzymes after repeated exposure to 4-vinylcyclohexene in b6c3f1 mice. *Drug Metab. Dispos.* 27, 2.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, Jr., V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7 (88), 88.
- EPA, U.S., 1989. Environmental Protection Agency. Toxic Substances Control Act Good Laboratory Practice (GLP), Final Rule. Fed. Regist. 54 34033-34033.
- EPA, U.S., 1991. Testing consent order for 4-vinylcyclohexene; final rule. Fed. Regist. 56, 47912-47915.
- Flaws, J.A., Doerr, J.K., Sipes, G., Hoyer, P.B., 1994. Destruction of preantral follicles in adult rats by 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide. *Reprod. Toxicol.* 8, 509-514.
- Fedtu, A.N., 1980. Role of cholinergic mechanisms in central regulation of respiratory activity in *Periplaneta americana* cockroaches. *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.* 6, 266-272.
- Fontaine, P., Hoyer, B., Halpert, R., Sipes, G.L., 2001. Role of induction of specific hepatic cytochrome p450 isoforms in epoxidation of 4-vinylcyclohexene. *Drug Metab. Dispos.* 29, 1236-1242.
- Gervasi, P.G., Abbonadolo, A., Citi, L., Turchi, G., 1980. Microsomal 4-vinylcyclohexene monooxygenase and mutagenic activity of metabolic intermediates. In: *Proc. Int. Conf. Indust. Environ. Xeno-Nobiotics: Biotransformation and Pharmacokinetics*. (I. Gut, Ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 205-210.
- Giamarini, C., Citi, L., Gervasi, P.G., Turchi, G., 1981. Effects of 4-vinylcyclohexene and its main estrane metabolite on mouse hepatic microsomal enzymes and glutathione levels. *Toxicol. Lett.* 8, 115-121.
- Gutiérrez, F., Wiggins, D., Fielding, B., Gauld, A.P., 2007. Specialized hepatocyte-like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism. *Nature* 445, 275-280.
- Hahig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods. Enzymol.* 77, 398-405.
- Houser, S.B., Demerell, D.G., Douds, D.A., Hoyer, P.G.I., 1995. Testicular germ cell toxicity caused by vinylcyclohexene diepoxide in mice. *Reprod. Toxicol.* 9, 359-367.
- Kappeler, C.J., Hoyer, P.B., 2012. 4-Vinylcyclohexene diepoxide: a model chemical for ovotoxicity. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 58, 57-62.
- Keating, A.F., Rajapaksa, K.S., Sipes, I.G., Hoyer, P.B., 2008. Effect of CYP2E1 gene deletion in mice on expression of microsomal epoxide hydrolase in response to VCD exposure. *Toxicol. Sci.* 105, 351-359.
- Klimaczewski, C.V., Ecker, A., Piccoli, B., Aschner, M., Barbosa, N.V., Rocha, J.B.T., 2018. *Pomus bolus attenuatus* copper-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Biomed. Pharmacother.* 97, 1-8.
- Mrlaković, M., Ilija, I., Vlahović, M., Filipović, A., Grčić, A., Todonović, D., Perić-Mataruga, V., 2019. Effects of dietary fluoranthene on nymphs of *Blattella dubia* S. (Blattodea: blattellidae). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 26, 6216-6222.
- National Toxicology Program (NTP), 1996. Toxicology and Carcinogenesis Studies of 4-vinylcyclohexene in F344/N Rats and B6C3F1 Mice. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC Technical Report, pp. 303.
- Nichols, C.D., 2006. *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. *Pharmacol. Ther.* 112, 677-700.
- Pérez-Severiano, F., Santamaría, A., Pedraza-Chaverri, J., Medina-Campos, O.N., Ríos, C., Segovia, J., 2004. Increased formation of reactive oxygen species, but no changes in glutathione peroxidase activity, in striata of mice transgenic for the huntington's disease mutation. *Neurochem. Res.* 29, 729-733.
- Rajapaksa, E.S., Cannady, E.A., Sipes, I.G., Hoyer, P.B., 2007. Involvement of CYP 2E1 enzyme in ovotoxicity caused by 4-vinylcyclohexene and its metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 221, 215-221.
- Rodrigues, N.R., Nunes, M.E., Silva, D.G., Zemolin, A.P., Meiners, D.F., Cruz, L.C., Pereira, A.B., Rocha, J.B., Posser, T., Franco, J.L., 2013. In the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* a valuable model for evaluating mercury induced oxidative stress? *Chemosphere* 92, 1177-1182.
- Sepehri, A., Sarrafzadeh, M.H., 2019. Activity enhancement of ammonia oxidizing bacteria and nitrite oxidizing bacteria in activated sludge process: metabolite reduction and CO2 mitigation intensification process. *Appl. Water Sci.* 9, 131.
- Sanzelle, D.B., Brest, H., 1990. Cholinergic nerve terminals in the central nervous system of insects. *J. Neuroendocrinol.* 2, 241-256.
- Segatto, A.L.A., Diesel, J.F., Loreto, E.L.S., da Rocha, J.B.T., 2018. De novo transcriptome assembly of the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* (Blaberidae). *Genet. Mol. Biol.* 41, 713-721.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1-16.
- Sheng, L.I., Shining, Z., Qiangqiang, J., Dongwei, Y., Chonghua, R., Kang, L., Suning, L., Yingying, C., Haigang, Z., Yanghui, C., Gangqi, F., Daqi, L., Xiaoming, Z., Jianzhen, Z., Qiaoyan, Y., Yongliang, F., Xianqiang, Y., Qili, F., Shuai, Z., 2018. The genomic and functional landscapes of developmental plasticity in the American cockroach. *Nat. Commun.* 9, 1008.
- Smallman, B.N., Mansingh, A., 1969. The cholinergic system in insect development. *Annu. Rev. Entomol.* 14, 387-408.
- Smith, R.J., Mattison, D.R., Sipes, I.G., 1990. Hepatic bioactivation of 4-vinylcyclohexene to ovotoxic epoxides. In: *Snyder, cWitmer, Sipes, IG (Eds.), In Biological Reactive Intermediates, II. Implications in Human Health*. Plenum press in press.
- Sookring, N., Reantong, O., Poolphol, R., Indrawattana, N., Sessay, W., Saedim, N., Tantipikura, P., Bunsag, C., Chaicumpa, W., Yungtrongsit, A., 2018. Glutathione S-transferase (GST) of american cockroach, *Periplaneta americana*: class, isoforms, and allergenicity. *Sci. Rep.* 8, 484.
- Springer, L.N., McAssey, M.E., Flaws, J.A., Tilly, J.L., Sipes, I.G., Hoyer, P.B., 1996. Involvement of apoptosis in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139, 394-401.
- Springhetti, A., Cioci, M., 1961. Sulllo sviluppo larvale della *Nauphoeta cinerea* Oliver (Blattodea, Epilamprinae). *Ital. J. Zool.* 28, 321-330.
- Springhetti, A., 1962. Sul controllo dell'attività dell'ovario in *Nauphoeta cinerea*. *Ital. J. Zool.* 29, 805-820.
- Stankiewicz, M., Drowski, M., De Lima, M.E., 2012. Nervous system of *Periplaneta americana* cockroach as a model in toxicological studies: a short historical and actual view. *J. Toxicol.* 2012, 143740.
- Sadati, J.H., Vieira, F.A., Pavin, S.S., Dias, G.R., Seeger, R.L., Golombinski, R., Athayde, M.L., Soares, F.A., Rocha, J.B., Barbosa, N.V., 2013. *Valeriana officinalis attenuatus* the rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Neurotoxicol.* 37, 118-126.
- Thapa, S., Lv, M., Xu, H., 2017. Mini. *Rev. Mod. Chem.* 17, 1665-1676.
- Wüest, J., 1978. Histological and cytological studies on the fat body of the cockroach *Nauphoeta cinerea* during the first reproductive cycle. *Cell. Tissue. Res.* 188, 481-490.

4 DISCUSSÃO

Compostos voláteis aóres em concentrações variáveis e/ou duradouras no ambiente e podem causar danos aos organismos, desencadeando doenças crônicas severas e morte (SMITH et al., 1997; TUNNICLIFFE et. al., 1999; YANG et al., 2003; EPA, 2008; BHATTACHARYA; KEATING, 2012a,b; COLLINS; MONTALI; MANUS, 1987a). Neste trabalho, foi demonstrado que a exposição crônica ao VCH espontaneamente volatilizado induziu sinais de toxicidade no inseto que incluíram, além de elevada mortalidade, redução significativa no consumo de alimentos e água, diminuição da massa corporal e do peso de alguns tecidos alvos, bem como alteração de parâmetros bioquímicos associados a controle anti-oxidante (HOOSER, et al., 1994; BEVAN et al., 1996; MUHAMMAD et al., 2009). O método de cromatografia com detector de ionização de chama empregado para verificar a concentração do VCH nas caixas metabólicas, permitiu estabelecer os níveis de VCH aos quais o inseto foi exposto. De fato, fatores como temperatura e quantidade de animais experimentais presentes nas caixas metabólicas podem explicar alterações observadas ao longo dos dias na quantidade de composto volatilizado.

O presente trabalho confirma o uso da barata *N. cinerea* como organismo modelo não-mamífero para avaliações dos efeitos toxicológicos de inúmeros xenobióticos, incluindo o composto VCH, similar ao apresentado previamente em outros estudos (RODRIGUES et al., 2013; ZEMOLIN et al., 2014; ABOLAJI et al., 2014, ADEDARA et al., 2015). Destaca-se o uso de baratas de ambos os sexos expostas ao VCH espontaneamente volatilizado como uma novidade do presente estudo. O uso de ninfas ao invés de adultos parece não ser um fato restritivo ou limitante grave para as conclusões aqui encontradas. O estágio imaturo se assemelha ao estágio adulto no funcionamento do organismo, com destaque apenas na ausência de asas e de órgãos reprodutores maduros (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011; RUPPERT; BARNES, 1996). Entretanto, o impacto em indivíduos imaturos a agentes químicos e contaminantes ambientais é maior quando comparados com adultos, incluindo humanos (LLOYD-SMITH et al., 2008; DOMÍNGUEZ-CORTINAS et al., 2013).

Na presente investigação, as ninfas expostas ao VCH espontaneamente volatilizado variando entre 3,417 e 7,030 nmol/μL apresentaram uma diminuição significativa na taxa de sobrevivência quando comparado com os grupos controles não expostos ao longo dos 70 dias de exposição. Abolaji e seus colaboradores (2015) demonstraram também uma diminuição significativa na taxa de sobrevivência de *D. melanogaster*, nas concentrações de 10-1.000 μM dos metabólitos VCD e VCM, após cinco dias de exposição oral. A maior parte dos estudos toxicológicos usam organismos

modelos murinos para análise dos impactos advindos da exposição. Bevan e seus colaboradores (1996) relataram um aumento na mortalidade pela exposição subcrônica por inalação ao VCH, de seis horas por dia, cinco dias por semana durante 13 semanas em camundongos na concentração de 1.000 ppm. Resultados semelhantes foram observados por Collins e Manus (1987b) por via de exposição oral na dose \geq 1250mg/kg de VCH durante 14 dias (précrônico) e na dose de 1200 mg/kg por 13 semanas (subcrônico) em ratos.

Já os efeitos significativos na redução do ganho de peso corporal, e em especial no corpo gorduroso e no peso de outros tecidos-alvo foram observados nas ninfas das baratas no presente estudo. Bevan e seus colaboradores (1996) também observaram essas alterações em roedores, onde a exposição subcrônica por inalação na dose de 1500 ppm além de causar uma diminuição significativa no peso corporal de machos, gerou sinais clínicos de toxicidade. Já em camundongos os mesmos sinais foram observados, mas na dose de 1.000 ppm (BEVAN et al., 1996). E, ainda no mesmo estudo os roedores machos e fêmeas na dose de 1.500 ppm apresentaram ganho de peso corporal significativamente menores (BEVAN et al., 1996). Em roedores, a redução no ganho de peso corporal foi observada nos estudos de Collins e Manus (1987b) nas concentrações de 50-1200 mg/kg do VCH pela via oral durante 13 semanas.

Por outro lado, no estudo de Adedara e seus colaboradores (2016b) envolvendo o uso de ratos, houve além da redução do peso corporal, a redução do peso dos testículos e número de espermatozoides quando expostos ao metabólito VCD, nas concentrações de 100-500mg/kg durante 28 dias consecutivos.

Efeitos tóxicos observados em órgãos reprodutores foi observado no estudo de Bevan e seus colaboradores (1996) onde a exposição subcrônica do VCH por inalação na dose de 1000 ppm em ratas e camundongas causou atrofia ovariana (BEVAN et al., 1996). Já na administração oral de 160mg/kg do VCD durante 20 dias em camundongas levou a redução do peso dos ovários e útero (LOHFF et al., 2006). E injeções intraperitoneais diárias por 15 dias levou a redução do peso dos ovários em camundongas expostas ao VCD na dose de 160mg/kg. A ovotoxicidade observada parece estar diretamente associada aos metabólitos mono e diepóxidos oriundos da metabolização do VCH.

A exposição ao metabólito mais ovotóxico do VCH, o VCD, leva a diminuição do peso dos órgãos reprodutores em roedores, podendo levar a alteração dos ciclos estrais e em alguns casos levar a insuficiência ovariana (FLAWS et al.; 1994b; HOOSER et al.; 1994; MAYER et al., 2001). Os principais órgãos envolvidos na metabolização do VCH são fígado e os ovários (CANNADY et al., 2003; ABOLAJI et al., 2014). Durante o metabolismo, tem-se o envolvimento da família de citocromos P450 que converte o VCH

em seus metabólitos momo (VCM) e diepóxidos (VCD) (ABOLAJI et al., 2014). Um dos pontos cruciais na ovotoxicidade mediada pelo VCH ocorre através da inativação desses metabólitos por meio das enzimas epóxido hidrolase microsomal (mEH) e pela glutationa-S-transferase (GST) (CANNADY et al., 2002; ABOLAJI et al., 2014; FLAWS et al., 1994a).

A GST é uma enzima responsável pela detoxificação intracelular de inúmeros xenobióticos e endobióticos (CHELVANAYAGAM et al., 2001; RINALDI et al., 2002; HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005; LUSHCHAK, 2012). Nos insetos, existem seis classes de GSTs presentes no citosol denominadas de delta, epsilon, ômega, sigma, teta e zeta (BOARD et al., 1997; SOOKRUNG et al., 2018). Alterações enzimáticas relacionadas principalmente a GST também foram descritas como alvo molecular da toxicidade do VCH em diferentes modelos experimentais (ABOLAJI et al., 2014; ADEDARA et al., 2015).

No presente estudo, observou-se um aumento significativo na atividade enzimática da GST em diferentes tecidos avaliados, indicando uma importante via de detoxificação do VCH na barata. Isso, hipoteticamente pode ocorrer devido ao envolvimento enzimático da GST na inativação dos metabólitos potencialmente tóxicos gerados pela exposição ao VCH por inalação (CANNADY et al., 2002; KAJAPAKSA, 2007).

Entretanto, até o presente momento não se sabe se os metabólitos gerados durante a metabolização do VCH são os mesmos encontrados nas ninfas de *N. cinerea* nos diferentes tecidos avaliados. Aumento na atividade do GST, incluindo outros biomarcadores do estresse oxidativo, também foi observado no estudo de Adedara e colaboradores (2017) envolvendo administração oral do metabólito VCD por 28 dias nas doses de 100, 250 e 500 mg / kg no testículo e epidídimo de roedores.

É notório, que a exposição de organismos a agentes tóxicos leva ao aumento de espécies reativas que, em alguns casos, reagem com lipídios, proteínas e/ou ácidos nucléicos podendo, assim, causar elevação de enzimas importantes como a GST (ATLI; CANLI, 2007; MONSERRAT et al., 2008).

Os resultados obtidos no presente estudo podem ser parcialmente explicados pelos níveis de espécies reativas (ER) estarem elevadas no corpo gorduroso das ninfas expostas ao VCH espontaneamente volatilizado.

Sabe-se que o corpo gorduroso atua como reserva de energia, principalmente durante a fase imatura (ninfas) e como uma estrutura semelhante ao fígado dos vertebrados (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011). Assim, o presente estudo corrobora com a hipótese de que o VCH induziu a superprodução de ER no corpo gorduroso e possivelmente sobrecarregou a capacidade antioxidante em ninfas, semelhante ao

observado em estudos anteriores (ABOLAJI et al., 2015; RIZZO et al., 2012). Portanto, mais estudos são necessários para elucidar os possíveis mecanismos e metabólitos envolvidos na toxicidade do VCH.

5 CONCLUSÕES

- A técnica para a quantificação do VCH foi eficaz na quantificação do coposto volatilizado.
- A inalação crônica do VCH reduziu a taxa de sobrevivência, o consumo alimentar e produção de fezes das ninfas da espécie *N. cinerea*.
- As ninfas expostas ao VCH volatilizado apresentaram diminuição no ganho de peso corporal, no peso da cabeça, no corpo gorduroso e nos órgãos reprodutivos em maturação.
- Em nenhum dos períodos avaliados a atividade da enzima AChE da cabeça das ninfas foi afetada;
- A exposição ao VCH aumentou os níveis das espécies reativas no corpo gorduroso das ninfas.
- O VCH aumentou a atividade da glutathione-S-transferase (GST) na cabeça, no corpo gorduroso e nos órgãos reprodutivos em maturação das ninfas.
- A GST parece desempenhar um papel central na toxicidade induzida pelo VCH em baratas ninfas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOLAJI, A. O.; KAMDEM, J. P.; LUGOKENSKI, T. H.; NASCIMENTO, T. K.; WACZUK, E. P.; FAROMBI, E. O.; LORETO, E. S.; ROCHA, J. B. Involvement of oxidative stress in 4-vinylcyclohexene-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Free. Radic. Biol. Med.*, v.71, p. 99-108, 2014.

ABOLAJI, A. O.; KAMDEM, P. J.; LUGOKENSKI, T. H.; FAROMBI, E. O.; SOUZA, D. O.; LORETO, E. S.; ROCHA, J. B. T. Ovotoxicants 4-vinylcyclohexene 1,2-monoepoxide and 4-vinylcyclohexene diepoxide disrupt redox status and modify diferente electrophile sensitive target enzymes and genes in *Drosophila melanogaster*. *Redox. Biol.* v. 5, p. 328-339, 2015.

ABOLAJI, A. O.; TOLOYAI, P.E.; ODELEYE, T. D.; AKINDURO, S.; ROCHA, J. B. T.; FAROMBI, E. O. Hepatic and renal toxicological evaluations of an industrial ovotoxic chemical, 4-vinylcyclohexene diepoxide, in both sexes of wistar rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 45, p. 28-40, 2016a.

ABOLAJI, A. O.; ADEDARA, I. A.; ABAJINGIN, A. O.; FATUNMIBI, O. J.; LADIPO, E. O.; FAROMBI, E. O. Evidence of oxidative damage and reproductive dysfunction accompanying 4- vinylcyclohexene diepoxide exposure in female wistar rats. *Reproductive Toxicology*, v. 66, p. 10-19, 2016b.

ABRHANS, P, W. *Science of the Total Environment*. Soils: Their implications to human health, v. 209, p. 1-32, 2002.

ADEDARA, I. A.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, D. O.; KAMDEM, J. P.; FAROMBI, E. O.; ASCHNER, M.; ROCHA, J. B. T. Biochemical and behavioral déficits in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* model of methylmercury exposure. *Toxicol. Res.*, v. 4; p. 442-451, 2015.

ADEDARA, I.A.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, D. O.; FAROMBI, E. O.; ASCHNER, M.; ROCHA, J. B. T. Neuroprotection of luteolin against methylmercury-induced toxicity in lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 42, p. 243-251, 2016a.

ADEDARA, I. A.; ABOLAJI, A. O.; LADIPO, E. O.; FATUNMIBI, O. J.; ABAJINGIN, A. O.; FAROMBI, E. O. 4-Vinylcyclohexene diepoxide disrupts sperm characteristics, endocrine balance and redox status in testes and epididymis of rats. *Redox Report*, v. 22, n. 6, p. 388-398, 2016b.

ADEDARA, I. A.; ABOLAJI, A. O.; LADIPO, E.O; FATUNMIBI, O. J.; ABAJINGIN, A. O.; FAROMBI, E. O. 4-Vinylcyclohexene diepoxide disrupts sperm characteristics, endocrine balance and redox status in testes and epididymis of rats. *Redox Report*. v.22, n. 6, p. 388-398, 2017.

AHMAD, S. Oxidative stress from environmental pollutants. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* v. 29, p. 135-157, 1995.

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, p. 388, 2002. Acesso em 01/01/2019, Disponível em: books.scielo.org/id/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869.pdf

ALIEV, G.; OBRENOVICH, M. E.; TABREZ, S.; JABIR, N. R.; REDDY, V. P.; LI, Y.; BURNSTOCK, G.; CACABELOS, R.; KAMAL, M. A. Link between Cancer and Alzheimer Disease via Oxidative Stress Induced by Nitric OxideDependent Mitochondrial DNA Over proliferation and Deletion. *Oxid. Med. Cell. Longev.* v. 1, p. 1-19, 2013.

ALVES, M. J. M.; COLLI, W. Experimentação com animais: Uma polêmica sobre o trabalho científico. *Ciência Hoje*, v. 39, n. 231, p. 24-29, 2006.

APPT, S. E.; KAPLAN, J. R.; CLARKSON, T. B.; CLINE, J. M.; CHRISTIAN, J. P.; HOYER, P. B. Destruction of primordial ovarian follicles in adult cynomolgus macaques after exposure to 4-vinylcyclohexene diepoxide: a nonhuman primate model of the menopausal transition. v. 86, n. 4, p. 1210-1216, 2006.

ARAÚJO, G. L.; CAMPOS, M. A. A.; VALENTE, M. A. S.; SILVA, S. C. T.; FRANÇA, F. D.; CHAVES, M. M.; TAGLIATI, C. A. Alternative methods in toxicity testing: the current approach. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 50, n. 1, 2014.

ARNOLD S. M.; ANGERER J.; BOOGAARD P. J.; HUGHES M. F.; O'LONE, R. B.; ROBISON S. H. The use of biomonitoring data in exposure and human health risk assessment: benzene case study. *Crit. Ver. Toxicol.* v. 43, n. 2, p. 119-153, 2013.

ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. v. 145, p. 282-287, 2007.

BARBOSA, K. B. F.; BRESSAN, M. A.; ZULET, M. A.; MARTÍNEZ, J. A. Influencia de la dieta sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en humanos. *Anales Sis San Navarra*, v. 31, n. 3, p. 259-280, 2008.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARBEHENN, R. V. Gut-based antioxidant enzymes in a polyphagous and a graminivorous grasshopper. *J. Chem. Ecol.* v. 28, p. 1329-1347, 2002.

BARROS, S. G. S.; GHISOLFI, E. S.; LUZ, L. P.; BARLEM, G. G.; VIDAL, R. M.; WOLFF, F. H.; MAGNO, V. A.; BREYER, H. P.; DIETZ, J.; GRÜBER, A. C.; KRUEL, C. D. P.; PROLLA, J. C. Mate (chimarrão) é consumido em alta temperatura por população sob risco para o carcinoma epidermóide de esôfago. *Arq. Gastroenterol.*, v. 37, n. 1, p. 25-30, 2000.

BENZIDANE, Y.; TOUINSI, S.; MOTTE, E.; JADAS-HÉCART, A.; COMMUNAL, P. Y.; LEDUC, L.; THANY, S. H. Effect of thiamethoxam on cockroach locomotor activity is associated with its metabolite clothianidin, *Pest. Manage Sci.* v. 66, p. 1351-1359, 2010.

BEVAN, C.; STADLER, J. C.; ELLIOT, G. S.; FRAME, S. R.; BALDWIN, J. K.; LEUNG, H. W.; MORAN, E.; PANEPINTO, A. S. Subchronic toxicity of 4-vinylcyclohexene in rats and mice by inhalation exposure. *Fundam. Appl. Toxicol.* v. 32, p. 1-10, 1996.

BEVAN, C.; KELLER, D. A.; PANEPINTO, A. S.; BENTLEY, K. S. Effect of 4-vinylcyclohexene on micronucleus formation in the bone marrow of rats and mice. *Drug and Chemical Toxicology*, v. 24, n. 3, p. 273-285, 2001.

BERGER, M. M. Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clin Nutr*, v. 24, p. 172-183, 2005.

BERNARD, K; KRAUSE, K. H. The NOX Family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* v. 87, n. 1, p. 245-313, 2007.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Ver. Nutr.*, v. 12, n. 12, p. 123-130, 1999.

BOARD, P.G.; BAKER, R.T.; CHELVANAYAGAM, G.; JERMIIN, L.S. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochemical Journal*, v. 328, n. 3, p. 929-935, 1997.

BONELLA, A. E. Animais em laboratórios e a lei Arouca. *Scientle studia*, v. 7, n. 3, p. 507-14, 2009.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D. The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications. *Treat. Endocrinol*, v. 3, p. 41-52, 2004.

BORMAN, S. M.; VANDEPOL, B. J.; KAO, S. W.; THOMPSON, K. E.; SIPES, I. G.; HOYER, P. B. A single dose of the ovotoxicant 4-vinylcyclohexene diepoxide is protective in rat primary ovarian follicles. *Toxicol Appl Pharmacol* v. 158, p. 244–252, 1999.

BLAIR, A.; KAZEROUNI, N. Reactive chemicals and cancer. *Cancer Causes & Control*. v. 8, p. 473-490, 1997.

BHATTACHARYA, P.; KEATING, A. F. Impacto f environmental exposures on ovarian function and role of xenobiotic metabolism during ovotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 261, p. 227-235, 2012a.

BHATTACHARYA, P.; SEN, N.; HOYER, P. B.; KEATING, A. F. Ovarian expressed microsomal epoxide hydrolase: role in detoxification of 4-vinylcyclohexene diepoxide and regulation by phosphatidylinositol-3 kinase signaling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 258, n. 1, p. 118-123, 2012b.

CANNADY, E. A., DYER, C. A., CHRISTIAN, P. J., SIPES, I. G., AND HOYER, P. B. Expression and activity of microsomal epoxide hydrolase in follicles isolated from mouse ovaries. *Toxicol. Sci.* v. 68, n. 1, p. 24–31, 2002.

CANNADY, E. A.; DYER, C. A.; CHRISTIAN, P. J.; SIPES, I. G.; HOYER, P. B. Expression and activity of cytochromes P450 2E1, 2A, and 2B in the mouse ovary: the effect of 4-vinylcyclohexene and its diepoxide metabolite. *Toxicol. Sci.*, v. 73, n. 2, p. 423–430, 2003.

CANTIN, A. M. Potential for antioxidant therapy of cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, v. 10, p. 531-536, 2004.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, v. 51, p. 15-25, 2013.

CARPENTER, D. O.; ARCARO, K.; SPINK, D. C. Understanding the human health effects of chemical mixtures. *Environmental Health Perspectives*. v. 110, n. 1, p. 25-42, 2002.

CIBEIRA, G. H.; GUARAGNA, R. M. Lipídio: fator de risco e prevenção do câncer de mama. *Rev Nutr.* v. 19, p. 65-75, 2006.

CHHABRA, R. S.; HUFF, J.; HASEMAN J.; JOKINEN M. P.; HETJMANCEK, M. Dermal toxicity and carcinogenicity of 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide in Fischer rats and B6C3F1 mice. *Fund. Appl. Toxicol.* v. 14, p. 752-763, 1990a.

CHHABRA, R. S.; ELWELL, M. R.; PETER, A. Toxicity of 4-vinylcyclohexene diepoxide after 13 weeks of dermal or oral exposure in rats and mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* v. 14, p. 745-751, 1990b.

CHAKRABORTY, T. R.; GORE, A. C. Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function. *Exp. Biol. Med.* v. 229, p. 977-987, 2004.

CHELVANAYAGAM, G.; PARKER, M.W.; BOARD, P.G. Fly fishing for GSTs: a unique nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. *Chemico-Biological Interactions*, v. 133, n.13, p. 256–260, 2001.

COLES, B. F.; CHEN, G.; KADLUBAR, F. F.; RADOMINSKA-PANDYA, A. Inter-individual variation and organ-specific patterns of glutathione S-transferase alpha, mu, and pi expression in gastrointestinal tract mucosa of normal individuals. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 403, p. 270-276, 2002.

COLLINS, J. J., MONTALI, R. J., AND MANUS, A. G. Toxicological evaluation of 4-vinylcyclohex- ene. II. Induction of ovarian tumors in female B6C3F₁ mice by 4-vinylcyclohexene. *J. Toxicol. Environ. Health*, v. 21, p. 507-524, 1987a.

COLLINS, J. J.; MANUS, A. G. Toxicological evaluation of 4-vinylcyclohexene. I. Prechronic (14-dias) and subchronic (13-week) gavage studies in Fischer 344 rats and B6C3F₁ mice. *J. Toxicol. Environ. Health*, v.21, n. 4, p. 493-505, 1987b.

CORREIA-DEUR, J. E. M.; CLAUDIO, L.; IMAZAWA, A. T.; ELUF-NETO, J. Variations in peak expiratory flow measurements associated to air pollution and allergic sensitization in children in São Paulo, Brazil. *Am. J. Ind. Med.* v. 55, n.12, 1087-1098, 2012.

COSTA, L. G. Signal transduction in environmental neurotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* v. 38, p. 21–43, 1998.

COSTA, L. C.; MOREIRA, J. C.; BARROCAS, R. G. Avaliação da exposição ao chumbo e cádmio de jovens adultos residentes na região metropolitana do Rio de Janeiro. Tese de doutorado da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, p. 1-111, 2015.

CLAPP, R.; HOWE, G.; LEFEVRE, M. J. Environmental and occupational causes of cancer: A review of recent scientific literature. Boston University School of Public Health and the Environmental Health Initiative, University of Massachusetts Lowell, p. 1-46, 2005. Acesso em: 10/12/2018. Disponível em <http://www.sustainableproduction.org/downloads/Causes%20of%20Cancer.pdf>

CLARKSON, P. M. THOMPSON, H. S. Antioxidants: What role do they play in physical activity and health? *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 72, n 2, p. 637-646, 2000.

CLOPTON, R. E. Synoptic revision of Blabericola (Apicomplexa: Eugregarinida: Blabericolidae) Parasitizing Blaberid Cockroaches (Dictyoptera: Blaberidae), with Comments On Delineating Gregarine Species Boundaries. *Journal of Parasitology*. v. 98, p. 572-583, 2012.

DANIELSKI, J. C. R.; BARROS, D. M.; CARVALHO, F. A. H. O uso de animais pelo ensino e pela pesquisa: prós e contras. *Revista Eletrônica de Comunicação Informação & Inovação em Saúde*, v. 5, n. 1, p. 77-84, 2011.

DEVINE, P. J.; SIPES, I. G.; HOYER, P. B. Effect of 4-vinylcyclohexene diepoxide dosing in rats on GSH levels in liver and ovaries. *Toxicol. Sci.* v. 62, p. 315-320, 2001.

DEVINE, J. P.; SIPES, G.; SKINNER, M. K.; HOYER, P. B. Characterization of a rat in vitro ovarian culture system to study to ovarian toxicant 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 184, n. 2, p. 107-115; 2002.

DEVINE, J. P.; SIPES, I. G.; HOYER, P. B. Initiation of delayed ovotoxicity by in vitro and in vivo exposures of rat ovaries to 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reprod Toxicol*, v. 19, p. 71-77, 2004.

DIVISI, D.; TOMMASO, S. D.; SALVEMINI, S. Diet and cancer. *Acta Biomed.* v. 77; p. 118-123, 2006.

DOBSON, R. L., AND FELTON, J. S. Female germ cell loss from radiation and chemical exposures. *Amer. J. Indust. Med.* v. 4, p. 175- 190, 1983.

DOERR, J.; HOOSER, S.; SMITH, B.; SIPES, I. Ovarian toxicity of 4-vinylcyclohexene and related olefins in B6C3F1 mice: role of diepoxides. *Chem. Res. Toxicol.* v.8, p. 963-969, 1995.

DOMÍNGUEZ-CORTINAS, G.; DÍAZ-BARRIGA, F.; MARTINEZ-SALINAS R. I.; COSSÍO, P.; PÉREZ-MALDONADO I. N. Exposure to chemical mixtures in Mexican Children: high-risk scenarios. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* v. 20, n. 1, p. 351-357, 2013.

DUUREN B. L.; VAN, LONGSETH, L.; GOLDSCHMIDT, B. M.; ORRIS, L. Carcinogenicity of epoxides, lactones, and peroxy compounds. VI, Structure and carcinogenic activity. *J Natl Cancer Inst.* v. 39, p. 1217–1225, 1967.

DHILLON, A. S.; HAGAN, S.; RATH, O.; KOLCH, W. Map kinase signalling pathways in câncer. *Oncogene*, v. 26, p. 3279-3290, 2007.

EUROPEAN CHEMICALS AGENCY – ECHA. Background document to the opinion proposing harmonised classification and labelling at community level of 4-vinylcyclohexene (VCH). 2012.

EL-TANTAWY, M., HAMMOCK, B. The effect of hepatic microsomal and cytosolic subcellular fractions on the mutagenic activity of epoxide-containing compounds in the Salmonella assay. *Mutat. Res.* v. 79, p. 59-71, 1980.

EPA – Environmental Protection Agency – About air toxics. 2008. Disponível em <http://www.epa.gov.br> . Acesso em 10/12/2017

FAKOORZIBA, M. R.; EGHBAL, F.; HASSANZADEH, J.; MOEMENBELLAH-FARD, M. D. Cockroaches (*Periplaneta americana* and *Blattella germânica*) as potential vectors of the pathogenic bacteria found in nosocomial infections. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* v. 104, p. 521-528, 2010.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. *RAMB*, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, J. D.; COUTO, A. C.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S.; KOIFMAN, S. In utero pesticide exposure and leucemia in Brazilian children <2 years of age. *Environ. Health Perspect.* v. 121, n. 2, p. 269-275, 2012.

FLAWS, J. A.; SALYERS, K. L.; SIPES, I. G.; HOYER, P. B. Reduced ability of rat preantral ovarian follicles to metabolize 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* v. 126, p. 286-294, 1994a.

FLAWS J. A.; DOERR, J. K.; SIPES, J. G.; HOYER, P. B. Destruction of preantral follicles in adult rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reprod. Toxicol.* v. 8, n. 6, p. 509-514, 1994b.

FRANCO, R.; SÁNCHEZ-OLEA, R.; REYES-REYES, E. M.; PANAYIOTIDIS, M. I. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: ménage à trois. *Mutat. Res.* v. 674, n. 1-2, p. 3-22, 2009.

GARCÍA-PÉREZ, J.; LOPE, V.; ABENTE, G. L.; SÁNCHEZ, M. G.; NAVARRO, P. F. Ovarian cancer mortality and industrial pollution. *Environmental Pollution*, v. 205, p. 103-110, 2015.

GARDNER, R. M.; NYLAND, J. F.; SILVA, I. A.; VENTURA, A. M.; SOUZA, J. M. & SILBERGELD, E. K. Mercury exposure, serum antinuclear/antinucleolar antibodies, and serum cytokine levels in mining populations in Amazonian Brazil: A cross-sectional study. *Environ. Res.*, v. 110, n. 4, p. 345-354, 2010.

GIANNARINI, C., CITTI, L., GERVASI, P.G., TURCHI, G., 1981. Effects of 4-vinylcyclohexene and its main oxirane metabolite on mouse hepatic microsomal enzymes and glutathione levels. *Toxicol. Lett.* v.8, p. 115–121, 1981.

GIOVANNUCCI, E.; RIMM, E. B.; ASCHERIO, A.; STAMPFER, M. J.; COLDITZ, G. A.; WILLETT, W. C. Alcohol, methyl-deficient diets and risk of colon cancer in men, *J Natl Cancer Inst*, v. 87, p. 265–273, 1995.

GILBERT, S. G. *A Small Dose of Toxicology*, 2ª Edição, 2012.

GOLDITZ, G. A.; STAMPFER, M. J.; WILLETT, W. C.; HUNTER, D. J.; MANSON, J. E.; HENNEKENS, C. H.; ROSNER, B. A.; SPEIZER, F. E. Type of postmenopausal hormone use and risk of breast cancer: 12-year follow-up from the Nurses' Health Study. *Cancer Causes & Control*, v. 3, p. 433–439, 1992.

GOSDEN, R. Follicular status at the menopause. *Hum. Reprod.*, v. 2, p. 617-621, 1987.

GOUGH, M. How much cancer can EPA regulate anyway?, *Risk Anal*, v. 10, p. 1–6, 1990.

GUYTON, A. C.; HALL, J.E. *Tratado De Fisiologia Médica*. 10ª Edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*. v. 53, n.1, p. 110-118, 2004.

GREIF, S.; TRÉZ, T. A verdadeira face da experimentação animal, 2ª edição, Rio de Janeiro: Sociedade Educacional “Fala Bicho”, 2000.

GRIZZLE, T. B.; GEORGE, J. D.; FAIL, P. A.; SEELY, J. C.; HEINDEL, J. J. Reproductive effects of 4-vinylcyclohexene in Swiss mice assessed by a continuous breeding protocol. *Fundam. Appl. Toxicol.* v. 22, p. 122-129, 1994.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, v. 344, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M.. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* v.142, n.2, p. 231-255, 2004.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant. Physiology*, v. 141, p. 312-322, 2006.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of câncer: the next generation. *Cell*, v. 144, p. 646-674, 2011.

HANKINSON, S. E.; WILLETT, W. C.; COLDITZ, G. A.; SEDDON, J. M.; ROSNER, B.; SPEIZER, F. E.; STAMPFER, M. J. A prospective study of cigarette smoking and risk of cataract surgery in women, *JAMA*, v. 268, p. 994–998, 1992.

HAREL, M. KRYGER, G.; ROSENBRRY, T. L.; MALLENDER, W. D.; LEWIS, T.; FLETCHER, R. J.; GUSS, J. M.; DILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Three-dimensional structures od *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase ando f its complexes with two potente inhibitors, *Protein Sci.* v.9, p. 1063-1072, 2000.

HARTUNG, T. From alternative methods to a new toxicology. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.77, p.338-349, 2011.

HARRIS, W. E.; MOORE, P. J. Sperm competition and male ejaculate investment in *Nauphoeta cinerea*: effects of social environment during development. *J. Evol. Biol.* v.18, n. 474-480, 2005.

HARMAN, D. Role of free radicals in aging and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v. 673, p. 126-141, 1992.

HAAS, J. R.; CHRISTIAN, P. J.; HOYER, P. B. Effects of impending ovarian failure induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide on fertility in C57BL/6 female mice. *Comp Med.* v. 57, n. 5, p. 443-449, 2007.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* v. 45, p. 51-88, 2005.

HELBOCK, H. J.; BECKMAN, K. B.; SHIGENAGA, M. K.; WALTER, P. B.; WOODALL, A. A.; YEO, H. C.; AMES, B. N. DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxodeoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 95, p. 288–293, 1998.

HEMINGWAY, J.; SMALL, G. J.; MONRO, A. G. Possible mechanisms of organophosphorus and carbamate insecticide resistance in German cockroaches (*Dictyoptera: Blattelidae*) from different geographical areas. *J. Econ. Entomol.* v. 86, p. 1623-1630, 1993.

HENDERSON, B. E.; ROSS, R. K.; PIKE, M. C. Toward the primary prevention of cancer, *Science*, v. 254, p. 1131–1138, 1991.

HEKIMI, J. L.; LAPOINTE, J.; YANG, W. Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends in Cell Biology*, v. 21, n. 10, p. 569-576, 2011.

HERRLING, T.; JUNG, K.; FUCHS, J. Measurements of UV-generated free radicals/ reactive oxygen species (ROS) in skin. *Spectrochimica Acta Part A*, v. 63, n. 4, p. 840-845, 2006.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int. Ver. Cytol.*, v.124, p. 43-101, 1991.

HISLOP, T. G. Mutagens and carcinogens in foods. *Can. Fam. Physician*, v. 39, p. 1169-1180, 1993.

HOOSER, S. B.; PAROLA, L. R.; VAN, E. M. D.; SIPES, I. G. Differential ovotoxicity of 4-vinylcyclohexene and its analog, 4-phenylcyclohexene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* v. 119, p. 302-305, 1993.

HOOSER, S. B.; DOUDS, D. P.; DEMERRELL, D. G.; HOYER, P. B.; SIPES, I. G. Long-term ovarian and gonadotropin changes in mice exposed to 4-vinylcyclohexene. *Reprod. Toxicol.* v.8, p. 315-323, 1994.

HOOSER, S. B.; DEMERRELL, D. G.; DOUDS, D. A.; HOYER, P.; SIPES, I. G. Testicular germ cell toxicity caused by vinylcyclohexene diepoxide in mice. *Reproductive Toxicology*, v. 9, n.4, p. 359-367, 1995.

HOYER, P. B.; DEVINE, P. J.; HU, X.; THOMPSON, K. E., SIPES, I. G. Ovarian toxicity of 4-vinylcyclohexene diepoxide: a mechanistic model. *Toxicol. Pathol.* v. 29, p. 91-99, 2001.

HOYER, P. Damage to ovarian development and function. *Cell Tissue Res.* v. 322, p. 99-106, 2005.

HOYER, P. B.; DAVIS, J. R.; BEDRNICEK, J. B.; MARION, S. L.; CHRISTIAN, P. J.; BARTON, J. K.; BREWER, M. A. Ovarian neoplasm development by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) in a chemically-induced rat model of ovarian failure. *Gynecologic Oncology*, v. 112, p. 610-615, 2009.

HU, X; CHRISTIAN, P. J.; THOMPSON, K. E.; SIPES, I. G.; HOYER, P. B.; Apoptosis induced in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxides is associated with activation of the caspase cascade. *Biol. Reprod.*, v. 65, p. 87-93, 2001a.

HU, X.; CRINSTIAN, P.; SIPES, I. G.; HOYER, P. B. Expression and redistribution of cellular Bad, Bax and Bcl-xL protein with VCD-induced ovotoxicity in rats. *Biology of reproduction*, v. 65, n. 5, p. 1489-1495, 2001b.

HUBER, I, MASLER, E. P.; RAO, B. R. *Cockroaches as models for neurobiology: Applications in biomedical research*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1990.

HUFF, J. Carcinogenicity bioassays of bisphenol A, 4-vinylcyclohexene diepoxide and 4-vinylcyclohexene. *Toxicological Science*, v. 64, n. 2, p. 282-283, 2001.

HULLEY, S.; GRADY, D.; BUSH, T.; FURBERG, C.; HERRINGTON, D.; RIGGS, B.; VITTINGHOFF, E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and estrogen/progestin replacement study (HERS) Research group. JAMA, v.280, n. 7, p. 605-613, 1998.

JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D.. Exposição humana a substâncias potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para a saúde. Química Nova, v. 32, n. 7, p. 1898-1909, 2009.

IARC-INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 60, Some Industrial Chemicals, p. 347-359, 1994.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil. Rev. Bras. Cancerol. v. 60, n. 1, p. 63-64, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, p. 1-128, 2017. Acesso em 03/02/2019, Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/oncoguia-material/estimativa-2014-incidencia-de-cancer-no-brasil/108/22/> .

JARUP, L. Hazards of heavy metal contamination. British Medical Bulletin. v. 68, p. 167-182, 2003.

JULL, J. W. Ovarian tumorigenesis. Methods Cancer Res. v.7, p. 131-186, 1973.

KAJAPAKSA, K. S. The role of ovarian metabolism in 4-vinylcyclohexene metabolites and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced ovotoxicity in mice. Department of Physiology, University of Arizona. Dissertation, 2007.

KAO, K. S.; SIPES, I. G.; HOYER, P. B. Early effects of ovotoxicity induced by 4 vinylcyclohexene diepoxide in rats and mice. Reproductive Toxicology. v.13, n. 1, p. 67-75, 1999.

KANDÁROVÁ, H; LETASIOVÁ, S. Alternative methods in toxicology: re-validated and validated methods. Interdiscip. Toxicol., v.4, p.107-113, 2011.

KATO, M.; GARCIA, E. G.; WUNSCH, V. F. Exposição a agentes químicos e a saúde do trabalhador. Rev. Bras. Saúde ocup., v.32, n. 116, p. 06-10, 2007.

KAPPELER, C. J.; HOYER, P. B. 4-Vinylcyclohexene diepoxide: a model chemical for ovotoxicity. Syst. Biol. Reprod. Med. v. 58, n. 1, p. 57-62, 2012.

KEATING, A. F., SIPES, I. G., HOYER, P.B. Expression of ovarian microsomal epoxide hydrolase and glutathione-S-transferase during onset of VCD-induced ovotoxicity in B6C3F1 mice. Toxicol Appl Pharmacol. v. 230, p. 109–116, 2008.

KEATING, A. F.; SEM, N.; SIPES, G.; HOYER, P. B. Dual protective role for glutathione s-transferase class pi against VCD-induced ovotoxicity in the rat ovary. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 247, p. 71-75, 2010.

KIM, W. T.; CHOI, H. J.; PARK, Y.; KIM, A. Y.; KIM, Y. H.; SEO, J. B.; LEE, S. H.; KOH, Y. H. Alterations in both acetylcholinesterase activity and synaptic scaffolding protein localization in the nervous system of *Drosophila* presenilin mutants. J. Asia Pacific Entomol, n. 13, p. 339-343, 2010.

KIM, Y. H.; KWON, D. H.; AHN, H. M.; KOH, Y.H; LEE, S. H. Induction of soluble AChE expression. Via alternative splicing by chemical stress in *Drosophila melanogaster*. Insect Biochem. Mol. Biol. v.48, p. 75-82, 2014.

KUMAR, V.; KURAL, M. R.; PEREIRA, B. M.; ROY, P. Spearmint induced hypothalamic oxidative stress and testicular anti-androgenicity in male rats – altered levels of gene expression, enzymes and hormones. Food. Chem. Toxicol. v. 46, n. 12, p. 3563-3570, 2008.

KUNO, R.; ROQUETTI, M. H.; GOUVEIA, N. Conceitos e derivação de valores de referência para biomonitorização humana de contaminantes. Rev. Panam Salud Publica, v. 27, n. 1, p. 75, 2010.

KUSHNAREVA, Y, NEWMAYER, D.D. Bioenergetics and cell death. Ann. N. Y. Acad. Sci. v. 1201 p. 50-57. 2010.

KLUCK, R. M.; BOSSY-WETZEL, E.; GREEN, D. R. NEWMEYER, D. D. The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, v. 275, p. 1132-1136, 1997.

KNUDSEN, A. Hereditary cancers: Clues to mechanisms of carcinogenesis, *Brit. J. Cancer*, v. 59, p. 661–666, 1989.

KRARUP, T. Effect of 9, IO-dimethyl- 1,2-benz- anthracene on the mouse ovary. Ovarian tumorigene- sis. *Brit. J. Cancer*, v. 24, p. 168-186, 1970a

KRARUP, T. Effect of 9, lo-dimethyl- 1,2-benz- anthracene on the mouse ovary. Impaired fertility and its relation to ovarian tumourigenesis. *Acta Endocrinol.* v. 64, p. 489-507, 1970b.

KRAWCZYK, N.; MEYER, A.; FONSECA, M.; LIMA, J. Suicide mortality among agricultural workers in a region with intensive tobacco farming and use of pesticides in Brazil. *J. Occup. Environ. Med.* v. 56, n.9, p. 993-1000, 2017.

LAGAZ, F. A. C. O. O campo Saúde do Trabalhador: resgatando conhecimentos e práticas sobre as relações trabalho-saúde. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 23, n. 4, p. 757-766, 2007.

LAMBETH, J. D.; KAWAHARA, T.; DIEBOLD, B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med.* v. 43, n. 3, p. 320-331, 2007.

LEE S, CHANDLER JG, BROELSCH CE, EHARA Y, YEN SS, CHARTERS AC, ORLOFF MJ. Intrasplenic ovarian neoplasm formation; direct measurement of FSH, LH, estrogen, and progesterone. *Surg Forum.* v. 26, p. 149-151, 1975.

LEIBSON, T.; LIFSHITZ, M. Organophosphate and cCarbamate Poisoning: Review of the current literature and summary of clinical and laboratory experience in Southern Israel. *Isr. Med. Assoc. J.*, v. 10, p. 767-770, 2008.

LEWBART, G. A. Invertebrate medicine. Edição 2^a, Wiley-Blackwell, Austrália, p. 504, 2011.

LOHFF, J. C.; CHRISTIAN, P. J.; MARION, S. L.; ARRANDALE, A.; HOYER, P. B. Characterization of cyclicity and hormonal profile with impending ovarian failure in a novel chemical-induced mouse model of perimenopause. *Comp. Med.* v. 55, p. 523–527, 2005.

LOHFF, J. C.; CHRISTIAN, P. J.; MARION S. L.; HOYER, P. B. Effect of duration of dosing on onset of ovarian failure in a chemical-induced mouse model of perimenopause. *Menopause*, v. 13, n. 3, p. 482-488, 2006.

LLOYD-SMITH, M.; SHEFFIELD-BROTHERTON, B. Children's environmental health: Intergenerational equity in action – A civil society perspective. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1140, n. 1, p. 190-200, 2008.

LUSHCHAK, V. I. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J. Amino Acids*, v.73, p. 1-26, 2012.

MA, B.; CHANG, F. N. Purification and cloning of a delta class glutathione S-transferase displaying high peroxidase activity isolated from the German cockroach *Blattella germanica*. *FEBS. J.*, v. 274, p. 1793-1803, 2007.

MACHADO, R. A. Avaliação de compostos orgânicos voláteis em ambientes interiores climatizados. Tese de doutorado da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, SP, 2003.

MAFFUCCI, J. A.; GORE, A. C. Age-related changes in hormones and their receptors in animal models of female reproductive senescence. *Handbook of Models for Human Aging*. Academic Press and Elsevier, San Diego, p. 533-552, 2006.

MARONPOT, R. R. Ovarian Toxicity and carcinogenicity in eight recent national toxicology program studies. *Environmental Health Perspectives*, v. 73, p. 125-130, 1987.

MATTISON, D. R. The mechanisms of action of reproductive toxins. *Am. J. Ind. Med.* v. 4, p. 65-79, 1983.

MATTISON, D. R.; EVANS, M. I.; SCHWIMMER, W.B.; WHITE, B. J.; JENSEN, B.; SCHULMAN, J. D. Familial premature ovarian failure. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 36, p. 1341-1348, 1984.

MAYNE, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutr.* v. 133, p. 933-940, 2003.

MAYER L. P.; KROEGER, N.; CHRISTIAN, P. J.; MARION, S. L.; HOYER, P. B. Long-term effects of ovotoxicity in rats exposed to 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Biol. Reprod.* n. 64, v. 1, p.192-200, 2001.

MAYER, L. P.; PEARSALL N. A.; CHRISTIAN, P. J; DEVINE, P. J.; PAYNE, C. M; MCCUSKEY, M. K.; MARION, S. L.; SIPES, I. G; HOYER, P. B. Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reprod Toxicol*, v. 16, n. 6, p. 775-781, 2002.

MELLO A. P., WAISMANN, W. Exposição ocupacional ao ruído e químicos industriais e seus efeitos no sistema auditivo: revisão de literatura. *Arq. Int. Otorrinolaringol.* v. 8 n. 3, p. 226-234, 2004.

MEYER, A.; SANDLER, D. P.; FREEMAN, L. E. B.; HOFMANN, J. N.; PARKS, C. G. Pesticide exposure and risk of rheumatoid arthritis among licensed male pesticide applicators in the agricultural health study. *Environmental Health Perspectives*, v. 125, n. 7, p. 1-7, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Sistema Nacional de Informações Toxicofarmacológicas. Dados de intoxicação [Internet]. Rio de Janeiro; 2016. Disponível em: <https://sinitox.iciet.fiocruz.br/sites/sinitox.iciet.fiocruz.br/files//Bras10.pdf>.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology*, v. 147, n.1, p. S193-S201, 2006.

MONSERRAT, J. M.; LIMA, J. V.; FERREIRA, J. L. R.; ACOSTA, D.; GARCIA, M. L.; RAMOS, P. B.; MORAES, T. B.; SANTOS, L. C.; AMADO, L. L. Modulation of antioxidant and detoxification responses mediated by lipoic acid in the fish *Corydoras paleatus* (Clychthyidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 48, p. 287-292, 2008.

MORALES, M. M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade ? *Ciência e Cultura*, n. 60, v. 2, p. 33-36, 2008.

MORTELMANS, K. HAWORTH, S., LAWLOR, T., SPECK, W., TAINER, B., AND ZEIGER, E. Salmonella mutagenicity tests. II. Results from the testing of 270 chemicals. Environ. Mutagen. v. 8, n. 7, p. 1-119, 1986.

MUHAMMAD, F. S.; GOODE, A. K.; KOCK, N. D.; ARIFIN, E. A.; CLINE, J. M.; ADAMS, M. R.; HOYER, P. B.; CHRISTIAN, P. J.; ISOM, S.; KAPLAM, J. R.; APPT, S. E. Effects of 4-vinylcyclohexene diepoxide on peripubertal and adult Sprague-Dawley rats: ovarian, clinical and pathologic outcomes. Comp. Med. v. 59, p. 46-59, 2009.

MUKHTAR, H.; PHILPOT, R. M.; BEND, J. B. The postnatal development of microsomal epoxide hydrase, cytosolic glutathione S-transferase, and mitochondrial and microsomal cytochrome P-450 in adrenals and varies off emale rats. Drug. Metab. Dispos. v. 6, p. 577-583, 1978.

MURRAY, M., AND CUMMINS, J. Mutagenic activity of epoxy embedding reagents employed in electron microscopy. Environ. Mutagen. v. 1, p. 307-313, 1979.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. (NTP) Toxicology and carcinogenesis studies of 4-vinylcyclohexene in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser., v. 303, p. 1-90, 1986.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. (NTP) Toxicology and carcinogenesis studies of 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide in F344/N rats and B6C3F1 mice (dermal studies). Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep., v. 362, p. 1-249, 1989.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP). 4-Vinyl-1-cyclohexene Diepoxide. Report on Carconogens, 14 Edition, 2016. Acesso em 01/01/2019, Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/content/profiles/vinylcyclohexenediepoxide.pdf>

OGA, S. Fundamentos de Toxicologia, 3ª Edição, Editora Atheneu. São Paulo, 2008.

OLIVEIRA, A. R.; NETO, A. A. C.; MEDEIROS, P. C. B.; ANDRADE, M. J. O.; SANTOS, N. A. Chronic organic solvent exposure changes visual tracking in men and women. Frontiers in Neuroscience, v. 11, p. 1-10, 2017a.

OLIVEIRA, L. M.; LUCAS, A. J. S.; CADAVAL, C. L.; MELLADO, M. S. Bread enriched with flour from cinereous cockroach (*Nauphoeta cinerea*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 44, p. 30–35, 2017b.

OLIVEIRA, A. R.; NETO, A. A. C.; ANDRADE, M. J. O.; MEDEIROS, P. C. B.; SANTOS, N. A. Organic solvent exposure and contrast sensitivity: comparing men and women. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 51, n. 3, p. 1-8, 2018.

OZAWA, T. Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochim. Biophys. Acta*. v. 1271, n. 1, p. 177-189, 1995.

PAI, H. H.; CHEN, W. C.; PENG, C. F. Cockroaches as potential vectors of nasocomial infections. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 25, p. 979-984, 2004.

PAI, H. H.; CHEN, W. C.; PENG, C. F. Isolation of bacteria with antibiotic resistance from household cockroaches (*Periplaneta americana* and *Blattella germanica*) *Acta tropica*, v. 93, p. 259-265, 2005.

PAIXÃO, R. L.; SCHRAMM, F. R. Experimentação animal: razões e emoções para uma ética. Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz. 2001.

PAKSOY, Z. The effects of 4-vinylcyclohexene diepoxide on gene expression in dog testes. *Inter. J. Vet. Sci.*, v. 7, n. 2, p. 60-64, 2018.

PANIS, C.; KAWASAKI, A. C. B.; PASCOTTO, C. R.; JUSTINA, E. Y. D.; VICENTINI, G. E.; LUCIO, L. C.; PRATES, R. T. C. Critical review of cancer mortality using hospital records and potential years of life lost. *Einstein*, n. 16, v. 1, p. 1-7, 2018.

PASIANI, J. O.; TORRES, P.; SILVA, J. R.; DINIZ, B. Z.; CALDAS, E. D. Knowledge, attitudes, practices and biomonitoring of farmers and residents exposed to pesticides in Brazil. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 9, n. 9, p. 3051-3068, 2012.

PARODI, A. L. Ethical issue in animal experimentation. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*. v. 193, n. 8, p. 1737-1745, 2009.

PICELI, P. C. Quantificação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos no ar de ambientes ocupacionais. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 2005.

PIVETTA, F.; MACHADO, J. M. H.; ARAÚJO, U. C.; MOREIRA, M. F. R.; APOSTOLI, P. Monitoramento biológico: conceitos e aplicações em saúde pública. Cad. Saúde Pública, v. 17, n. 3, p. 545-554, 2001.

PETERSON, R. T.; NASS, R.; BOYD, W. A.; FREEDMAN, J. H.; DONG, K.; NARAHASHI, T. Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. Neuro Toxicology, v. 29, p. 546-555, 2008.

PONDER, B. Inherited predisposition to cancer, Trends in Genetics, v. 6, p. 213-218, 1990.

PRASAD, A. S.; BECK, F. W. J.; BAO, B.; FITZGERALD, J. T.; SNELL, D. C.; STEINBERG, J. D. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. Am J Clin Nutr., v. 85, n. 3, p. 837-844, 2007.

PRESGRAVE, O. A. F. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 2002. Acesso em 23/12/18. Disponível em <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/12296>.

RAFAEL, J. A.; SILVA, N. M.; DIAS, R. M. N. S. Baratas (Insecta, Blattaria) sinantrópicas na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. Acta Amazonica, v. 38, n. 1, p. 173-178, 2008.

RATTAN, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. Crop. Prot. v. 29, p. 913-920, 2010.

RAPPAPORT, S.; FRASER, D. Gas chromatographic-mass spectrophotometric identification of volatiles released from a rubber stock during simulated vulcanization. Anal. Chem. v.48, p. 476-481, 1976.

REIS, F. M.; PESTANA-OLIVEIRA, N.; LEITE, C. M.; LIMA, F. B.; BRANDÃO, M. L.; GRAEFF, F. G.; DEL-BEM, C. M.; ANSELMO-FRANCI, J. A. Hormonal changes and increased anxiety-like behavior in a perimenopause-animal model induced by 4-

vinylcyclohexene diepoxide (VCD) in female rats. *Psychoneuroendocrinology*. v. 49, p. 130-140, 2014.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and câncer: How are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* v. 49, n. 11, p. 1603- 1616, 2010.

RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S. Saúde e ambiente no Brasil: desenvolvimento, território e iniquidade social. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 33, p. 475-501, 2007.

RINALDI, R.; ELIASSON, E.; SWEDMARK, S.; MORGENSTERN, R. Reactive intermediates and the dynamics of glutathione transferases. *Drug Metab. Dispos.* v. 30, n. 10, p. 1053-1058, 2002.

RIZZO, A.; ROSCINO, M. T.; BINETTI, F.; SCIORSCI, R. L. Roles of reactive oxygen species in female reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, n. 2, p. 344-352, 2012.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. *Zoologia dos invertebrados*. 6º Edição. Editora Roca LTDA, São Paulo, 1996.

RODRIGUES, N. R.; NUNES, M. E. M.; SILVA, D. G. C.; ZEMOLIN, A. P. P.; MEINERZ, D. F.; CRUZ, L. C.; PEREIRA, A. B.; ROCHA, J. B. T.; POSSER, T.; FRANCO, J. L. Is the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* a valuable model for evaluating mercury induced oxidative stress? *Chemosphere*, v. 92, n. 9, p. 1177-1182, 2013.

SACHANA, M.; HARGREAVES, A. J. Chapter 9 - Toxicological Testing: In Vivo and In Vitro Models. *Veterinary Toxicology*. p. 145-161, 2018.

SAKUMA, A. M.; CAPITANI, E. M. Avaliação da exposição humana ao arsênio no Alto Vale do Ribeira, Brasil. Tese de doutorado da Universidade Estadual de Campinas, 1-196. Campinas, 2004.

SARADHA, B.; MATHUR, P. P. Effect of environmental contaminants on male reproduction. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* v. 21, p. 34-41, 2006.

SATTELLE, D. B.; BREERT, H. Cholinergic Nerve Terminals in the Central Nervous System of insects. *J. Neuroendocrinol*, v. 2, p. 241-256, 1990.

SEGATTO, A. L. A.; DIESEL, J. F.; LORETO, E. L. S.; ROCHA, J. B. T. De novo transcriptome assembly of the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* (Blaberidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 41, n. 3, p. 713-721, 2018.

SILVA, I. A.; NYLAND, J. F.; GORMAN, A.; PERISSE, A.; VENTURA, A. M.; SANTOS, E. C.O.; SOUZA, J. M.; BUREK, C. L.; ROSE, N. R.; SILBERGELD, E. K. Mercury exposure, malária, and sérum antinuclear/antinucleolar antibodies in amazona populations in Brazil: a cross-sectional study. *Environ. Health*, v. 3, n. 11, p. 1-12, 2004.

SIMMON, V., BADEN, J. Mutagenic activity of vinyl compounds and derived epoxides. *Mutat. Res.* v. 78, p. 227-231, 1980.

SCOVRONICK, N.; FRANÇA, D.; ALONSO, M.; ALMEIDA, C.; LONGO, K.; FREITAS, S.; RUDORFF, B.; WILKINSON, P. Air quality and health impacts of future etanol production and use in São Paulo state, Brazil. *Int. J. Environ. Res. Public. Health*, v. 13, n. 7, p. 1-13, 2016.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*. v.48, p. 835-850, 1996.

SHARARA, F. I.; SEIFER, D. B.; FLAWS, J. A. Environmental toxicants and female reproduction. *Fertility and Sterility*, v. 70, n. 4, 1998.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, v.125, p.27–58, 1993.

SLIKKER W, BOWYER JF. Biomarkers of adult and developmental neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 206, p. 255–260, 2005.

SMITH, C. G. Reproductive toxicity: hypothalamic-pituitary mechanisms. *Am. J. Ind. Med.* v. 4, p. 107-112, 1983.

SMITH, L. B.; BHATTACHARYA, A.; LEMASTERS, G.; SUCCOP, P.; PUHALA, E.; MEDVEDOVIC, M.; JOYCE, J. Effect of chronic low-level exposure to jet fuel on postural

balance of US Air Force Personnel. Journal of Occupational and Environmental Medicine, v. 39, n.7, p. 623-632, 1997.

SMITH, B. J.; MATTISON, D. R.; SIPES, I. G. The Role of Epoxidation in 4-Vinylcyclohexene Induced Ovarian Toxicity. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 105, p. 372-381, 1990a.

SMITH, B. J.; CARTER, D. E.; SIPES, I. G. Comparison of the disposition and *in vitro* metabolism of 4-vinylcyclohexene in the female mouse and rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. v.105, p. 364-371, 1990b.

SMITH, B. J.; SIPES, I. G.; STEVENS, J. C.; HALPERT, J. R. The biochemical basis for the species difference in hepatic microsomal 4-vinylcyclohexene epoxidation between female mice and rats. Carcinogenesis, v. 11, p. 1951-1957, 1990c.

SOOKRUNG, N., REAMTONG, O., POOLPHOL, R., INDRAWATTANA, N., SEESUAY, W., SAELIM, N., TANTILIPKORN, P., BUNNAG, C., CHAICUMPA, W., TUNGTRONGCHITR, A. Glutathione S-transferase (GST) of american cockroach, *Periplaneta americana*: classes, isoforms, and allergenicity. Sci. Rep. v. 8, p. 484, 2018.

SPRINGER, L. N.; MCASEY, M.; SIPES, I. G.; HOYER, P. B. Induction of cell death in small pre-antral rat follicles by dosing with 4-vinylcyclohexene diepoxide. Biol. Reprod. v. 52, n.1, 1-49, 1995a.

SPRINGER, L. N.; TILLY, J. L.; SIPES, I. G.; HOYER, P. B. Effect of 4-vinylcyclohexene diepoxide on DNA integrity in rat small, pre-antral ovarian follicles. Toxicologist, v. 15, p. 215-251, 1995b.

SPRINGER, L. N.; TILLY, J. L.; SIPES, I.G.; HOYER, P. B. Enhanced expression of bax in small preantral follicles during 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in the rat. Toxicol Appl Pharmacol., v. 139, p. 402-410, 1996a.

SPRINGER, L. N.; MCASEY, M. E.; FLAWS, J. A.; TILLY, J. L.; SIPES, I. G.; HOYER, P. B. Involvement of apoptosis in 4-vinylcyclohexene diepoxide induced ovotoxicity in rats. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 139, p. 394-401, 1996b.

SPRINGER, L. N.; FLAWS, J. A.; SIPES, I. G.; HOYER, P. B. Follicular mechanisms associated with 4-vinylcyclohexene diepoxide induced ovotoxicity in rats. *Reproductive Toxicology*, v. 10, n. 2, p. 137-143, 1996c.

STANKWIEWICZ, M.; DABROWSKI, M.; LIMA, M. E. Nervous system of *Periplaneta americana* cockroach as a model in toxicological studies: A short historical and actual view. *J. Toxicol*, 14, 37-40, 2012.

STOCKER, R.; KEANEY, J.F, JR. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.*, v. 84, p. 1381-1478, 2004.

STÜRMER, D. G.; FREITAS, T. C.; HEBERLE, M. A.; ASSIS, D. R.; VINADÉ, L.; PEREIRA, A. B.; FRANCO, J. L.; BELO, C. A. D. Modulation of dopaminergic neurotransmission induced by sublethal doses of the organophosphate trichlorfon in cockroaches. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* n. 109, p. 56-62, 2014.

SWARTJES, F. Human health risk assessment related to contaminated land: state of the art. *Environmental Geochemistry and Health*, Dordrecht, 2015.

TAKASHIMA, A.; FALLER, D.V. Targeting the RAS oncogene. *Expert Opin Ther Targets*, v. 17, n. 5. 2013.

TANAKA, T.; KOHNO, J.; TANINO, M.; YNAIDA, Y. Inhibitory effects of estrogenic compounds, 4-nonylphenol and genistein, on 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced ovarian carcinogenesis in rats. *Ecotoxicol and Environ. Safety*, v. 52, p. 38-45, 2002.

TANAKA, T.; KOHNO, H.; SUZUKI, R.; SUGIE, S. Lack of modifying effects of an estrogenic compound atrazine on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced ovarian carcinogenesis in rats. *Cancer Lett*, v. 210, p. 129-137, 2004.

TANG, Z.; LIU, Y.; DUAN, Y. Breath analysis: technical developments and challenges in the monitoring of human exposure to volatile organic compounds. *Journal of Chromatography B.*, v. 1002, n. 1 p. 285-299, 2015.

THAPA, S.; MIN, LV.; XU, H. Acetylcholinesterase: A Primary Target for Drugs and Insecticides. *Mini. Rev. Med. Chem.* v. 17, p. 1665-1676, 2017.

TAVARES, T. M.; CARVALHO, F. M. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: Exemplos do Recôncavo Baiano. *Química Nova*, v. 15, n. 2, p. 147-154, 1992.

TILLY, J. L.; KOWALSKI, K. I.; JOHNSON, A. L.; HSUEH, A. J. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*, v. 129; p. 2799-2801, 1991.

THOMPSON, K. E.; SUPES, I. G.; GREENSTEIN, B. D.; HOYER, P. B. 17_Estradiol affords protection against 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovarian follicle loss in Fischer-344 rats. *Endocrinology*, 2002, v. 143, n. 3, p. 1058-1065, 2002.

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. *Estudo dos insetos*. 7ª Edição, Editora Cengage, 2011.

TUNNICLIFFE, W. S.; O'HICKEY, S.P.; FLETCHER, T.J.; MILES, J.F.; BURGE, P.S.; AYRES, J. G. Pulmonary function and respiratory symptoms in a population of airport workers. *Occupational Environmental Medicine*, v.56, p. 118-123, 1999.

TURCHI, C., BONATTI, S., CITTI, L., GERVASI, P. Abbondandolo, A., and Presciuttini, S. Alkylating properties and genetic activity of 4-vinylcyclohexene metabolites and structurally related epoxides. *Mutat. Res.* v. 83, p. 419-430, 1981.

UVA, A. S.; FARIA, M. Exposição profissional a substâncias químicas: diagnóstico das situações de risco. *Saúde Ocupacional*, Rio de Janeiro, v. 18, n. 1, 2000.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VANDUUREN, B. L.; NELSON, N.; ORRIS, L.; PALMES, E. D.; SCHMITT, F. L. Carcinogenicity of epoxides, lactones, and peroxy compounds. *J Natl Cancer Inst.* v. 31, p. 41-55, 1963.

VANDUUREN, B., LANGSETH, L., GOLDSCHMIDT, B., AND ORRIS, L. Carcinogenicity of epoxides, lactones, and peroxy compounds. VI. Structure and carcinogenic activity. *J. Natl. Cancer Inst.* v. 39, p. 1217-1228, 1967.

VOOGD, C., VAN DER STEL, J., AND JACOBS, J. The mutagenic action of aliphatic epoxides. *Mutat. Res.* v. 89, p. 269-282, 1981.

ZAHM, S. H.; WARD, M. H. Pesticides and childhood cancer. *Environmental Health Perspectives.* v. 106, n. 3, p. 893-908, 1998.

ZEMOLIN, A. P.; CRUZ, L. C.; PAULA, M. T.; PEREIRA, B. K.; ALBUQUERQUE, M. P.; VICTORIA, F. C.; PEREIRA, A. B.; POSSER, T.; FRANCO, J. L. Toxicity induced by *Prasiola crispa* to fruit fly *Drosophila melanogaster* and cockroach *Nauphoeta cinerea*: evidence for bioinsecticide action. *J. Toxicol. Environ. Health*, n. 77, p. 115-124, 2014.

WÄCHTLER, K. Phylogeny of the cholinergic synapse. In: Whittaker, V. P. The cholinergic synapse. *Handbook of Experimental Pharmacology.* Springer, p. 762, 1988.

WANG, X.; SHARMA, R. X.; SIKKA, S. C. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril*, v. 80, p. 531-535, 2003.

WANULE. D. D.; SIRSIKAR, A. N. Antimicrobial activity of American Cockroach, *Periplaneta americana*. *Bioinfolet.*, v. 6, n. 3, p. 219-223, 2009.

WATABE, T., AND SAWAHATA, T. Metabolism of the carcinogenic bifunctional olefin oxide, 4-vinyl-1cyclohexene dioxide, by hepatic micTOSomes. *Biochem Pharmacol*, v. 25, p. 601-602, 1976.

WESCHLER, C. J., SHIELDS, H. C. Potential reactions among indoor pollutants. *Atmospheric Environment, New Jersey*, v. 31, p. 3487-3495, 1997.

WEBBER, K. M.; CASADESUS, G.; MARLATT, M. W.; HAMLIN, C. R.; ATWOOD, C. S.; BOWEN, R. L.; SMITH, M. A. Estrogen bows to a new máster: the role of gonadotropins in Alzheimer pathogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v. 1052, p. 201-209, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cancer. 2018. Acesso em 02/02/2019, Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer> .

YANG, C. Y.; WU, T.N.; WU, J. J.; HO, C. K.; CHANG, P.Y. Adverse respiratory and irritant health effects in airport workers in Taiwan. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 66, p. 799-806, 2003.

YU, S. J.; HUANG, S. W. Purification and characterization of glutathione s-transferases from the german cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. v. 67, p. 36-45, 2000.