

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/08/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA

BÁRBARA CAMPOS JORGE

**EXPOSIÇÃO AO BENZO(A)PIRENO EM RATOS MACHOS DO PERÍODO
JUVENIL ATÉ A PERIPUBERDADE: REPERCUSSÕES NA VIDA ADULTA
EM PARÂMETROS REPRODUTIVOS E IMPACTOS NA PROLE**

BOTUCATU-SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA

BÁRBARA CAMPOS JORGE

**EXPOSIÇÃO AO BENZO(A)PIRENO EM RATOS MACHOS DO PERÍODO
JUVENIL ATÉ A PERIPUBERDADE: REPERCUSSÕES NA VIDA ADULTA
EM PARÂMETROS REPRODUTIVOS E IMPACTOS NA PROLE**

Trabalho apresentado ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, como
requisito para Obtenção do Título de Mestre em
Farmacologia e Biotecnologia junto ao Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia e
Biotecnologia.

Orientadora: **Profa. Dra. Arielle Cristina Arena**

BOTUCATU-SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Jorge, Bárbara Campos.

Exposição ao benzo(a)pireno em ratos machos do período juvenil até a peripuberdade : repercussões na vida adulta em parâmetros reprodutivos e impactos na prole / Bárbara Campos Jorge. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Arielle Cristina Arena
Capes: 21000000

1. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. 2. Desreguladores endócrinos. 3. Fecundidade. 4. Puberdade. 5. Toxicologia.

Palavras-chave: Benzo(a)pireno; Peripuberdade; desregulador endócrino; fertilidade; programação paterna.

Agradecimentos

Agradecer é uma forma de mostrar a gratidão e o reconhecimento a toda ajuda psicológica, intelectual, financeira e física. Obrigada a todos, que de forma direta ou indireta me ajudaram na realização deste sonho.

Quero agradecer ao meu pai e a minha mãe, por sempre acreditarem e me apoiarem em toda a minha vida, por me aconselharem e realizarem tudo o que estava em seu alcance, e o que não estava também. Amo vocês eternamente. E todos os meus familiares também, obrigada.

Quero agradecer ao meu namorado, Plug, pelo companheirismo e amor, por todas as noites em claro comigo, por todos os chocolates, por me tranquilizar em todas as crises de ansiedade, por todas as risadas e por construir sua vida comigo, obrigada. Tem sido maravilhoso e incrível compartilhar minha vida com você.

Quero agradecer a todos os meus amigos e colegas de vida, em especial Serí, Píga, Pakas, Bate, Murta, Color, Su, Velma, Aero, Piki, Cirilo, Play, Louka, Guenta. Foi demais estes últimos seis anos de casa, de festa, de choros, de risadas. Todos esses momentos estarão marcados em mim pra sempre.

Quero agradecer à minha orientadora, Profa. Dra. Arielle Cristina Arena, por sempre acreditar no meu potencial, pelos conselhos acadêmicos e de vida, por todas as conversas, orientações e pela compreensão. Por me dar toda a oportunidade de me desenvolver cientificamente e na área da docência. Não chegaria até aqui se não tivesse me dado a minha primeira oportunidade na carreira acadêmica no meu segundo ano de graduação, em 2014.

Quero agradecer a todas as pessoas que passaram pelo Laboratório de Toxicologia de Produtos Naturais e Sintéticos. Primeiro à Aline, que ensinou os primeiros passos. À Murta e o Pakas, que me ajudaram a realizar o trabalho da ciclo. À Paola, Andressa, Fitinha e Flávia, pelos dias difíceis e intermináveis do Ibuprofeno. À Su e Letícia, pelas eutanásias mais animadas da Serjanía. À Marcela, Mayra e Léo, pela inesquecível e estressante experiência da Macela. Ao Léo e a Su, pela experiência maravilhosa da teratogênese. À Color, Júlia, Dayana e Ana pela parte dois do Ibuprofeno. Amo vocês. Todos esses projetos e cada um em especial me fizeram crescer, aprender e amar cada vez mais o meu trabalho.

Quero agradecer, logicamente, as pessoas essenciais para a realização dessa dissertação. Primeiro à Profa. Arielle, que abraçou a ideia do projeto e me deixou à vontade para escolher com o que eu queria trabalhar. À Velma, Érika, Paola, Color e Luana, por colocarem a mão na massa comigo, por todos os biotérios e experimentos. Em especial à Velma, por toda disponibilidade, carinho, estatísticas e relatórios, obrigada por toda sua amizade e contribuição com o trabalho, sem vocês eu não teria conseguido.

Quero agradecer aos animais utilizados no estudo, por contribuírem para a formação de novos conhecimentos.

Quero agradecer ao Prof. Dr. Wellerson Scarano por abrir seu laboratório para a parceria na realização da técnica de Western blot e, em especial, a animadíssima Ariana, por ter a paciência e eficiência em ensinar essa técnica.

Quero agradecer a todo suporte dado pelo Instituto de Biotecnologia de Botucatu e do departamento de Morfologia. Especialmente ao José Eduardo, pela amizade, fabricação das lâminas histológicas e todo suporte científico dado.

Quero agradecer ao Programa de Pós-Graduação de Farmacologia e Biotecnologia por aceitarem e darem apoio a nossa pesquisa.

Quero agradecer à CAPES, pelo suporte financeiro.

Quero agradecer aos professores Érick Silva, Rafael Nóbrega e Patrícia Pinheiro e aos membros suplentes que aceitaram em fazer parte da banca da qualificação e dar suas valiosas contribuições. E, por último, aos professores que aceitaram o convite para fazer parte da banca de defesa, Profa. Arielle Arena, Prof. Rafael Nóbrega, Profa. Juliana Perobelli, Prof. Wellerson Scarano e a Profa. Glaura, por se disponibilizarem a contribuir com a dissertação. Muito obrigada!

Resumo

Entre as substâncias com potencial de desregulação endócrina, destaca-se o Benzo(a)pireno (BaP), um poluente orgânico persistente e amplamente difundido no ambiente. É gerado pela combustão incompleta de compostos orgânicos e está presente na fumaça de cigarro, na exaustão de automóveis, em alimentos e água contaminados. Estudos demonstram que o BaP se acumula em órgãos vitais e reprodutores, incluindo o testículo, e pode interferir no processo de esteroidogênese, através da interação com a proteína StAR. Sabe-se que substâncias que atuam como desreguladores endócrinos (DEs) podem gerar prejuízos não somente no indivíduo exposto, mas também nas gerações subsequentes, via células germinativas. A exposição aos DEs torna-se mais relevante em períodos hormônio-dependentes, como a gestação, a infância e a peripuberdade, denominados de janelas críticas do desenvolvimento. Assim, torna-se fundamental a investigação da exposição ao BaP durante uma janela crítica do desenvolvimento (juvenil e peripuberdade) e avaliar quais são as repercussões disto na vida reprodutiva, bem como os possíveis impactos no desenvolvimento e reprodução da prole, via paterna. Para tal, 40 ratos machos Wistar no período juvenil (23 dias de idade) foram distribuídos em quatro grupos experimentais, sendo um controle (óleo de milho + DMSO); e três grupos que receberam diferentes doses de BaP: 0,1, 1,0 ou 10 µg/kg/dia. A exposição ao poluente ocorreu durante 31 dias consecutivos, do dia pós-natal (DPN) 23 ao 53, via oral (gavage). Durante o tratamento, foram avaliados sinais clínicos de toxicidade e a instalação da puberdade, e na vida adulta (DPN 90) foram realizados o comportamento sexual, teste de fertilidade e acasalamento natural com fêmeas não tratadas (gerando a prole de interesse). Posteriormente, os órgãos vitais, reprodutores e sangue foram coletados para as seguintes análises: parâmetros espermáticos (morfologia, motilidade e contagem), hematológicos, histológicos do testículo (dinâmica espermatogênica, contagem e volume das células de Leydig) e quantificação da proteína StAR. Na prole feminina, foram avaliados: parâmetros iniciais do desenvolvimento sexual, instalação da puberdade, ciclo estral, teste de fertilidade e histologia do ovário. Na prole masculina, foram avaliados: parâmetros iniciais do desenvolvimento sexual, descida testicular, separação prepucial e parâmetros espermáticos na vida adulta. A exposição ao BaP causou prejuízos nos animais expostos (geração parental-F0), comprometendo parâmetros espermáticos, hematológicos e histológicos do testículo, principalmente no grupo de menor dose. Além disso, o BaP

demonstrou ter um efeito multigeracional. A prole feminina e masculina (F1) apresentaram alterações nos parâmetros do desenvolvimento sexual e na fertilidade na vida adulta (fêmeas), indicando que a exposição ao BaP acarretou em uma programação do desenvolvimento de origem paterna para alterações reprodutivas, em ambos os sexos. O padrão de resposta observada nesse estudo foi uma curva dose-resposta não-monotônica, característica de substâncias que se comportam como DEs. Assim, o benzo(a)pireno, neste modelo experimental, é capaz de causar impactos negativos na reprodução na vida adulta dos animais expostos durante o período juvenil até a peripuberdade, bem como de causar efeitos multigeracionais, comprometendo o desenvolvimento reprodutivo de seus descendentes. Aprovado pelo comitê de ética 958/2017 (CEUA/IBB).

Palavras-chaves: peripuberdade, desregulador endócrino, benzo(a)pireno, fertilidade, programação paterna.

Abstract

Among substances with potential for endocrine disruptor, benzo(a)pyrene (BaP), a persistent organic pollutant widely distributed in the environment, stands out. It is generated by the incomplete combustion of organic compounds and is present in cigarette smoke, exhaust from cars, contaminated food and water. Studies have shown that BaP accumulates in vital and reproductive organs, including the testis; and may interfere with the steroidogenesis process through interaction with the StAR protein. It is known that substances that act as endocrine-disrupting chemicals (EDCs) can generate damages not only in the exposed individual, but also in subsequent generations by germ cells. Exposure to EDCs becomes more relevant in hormone-dependent periods, such as gestation, childhood and peripuberty, called critical windows of development. Thus, it is essential to investigate exposure to BaP during the critical development window (juvenile and peripuberty) and to investigate the repercussions of this on reproductive life and the possible impacts on the development and reproduction of the offspring, paternal way. For this, 40 male Wistar rats were used in the juvenile period (23 days of age) and distributed into four experimental groups, one control (corn oil + DMSO); and three groups receiving different doses of BaP: 0.1, 1.0 or 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$. The exposure to pollutant occurred during 31 consecutive days, from the postnatal day (PND) 23 to 53, via oral (gavage). During the treatment, clinical signs of toxicity and preputial separation were evaluated, and sexual behavior, fertility testing and natural mating with untreated females (generating offspring of interest) were performed in adulthood. Subsequently, vital organs, breeding and blood were collected for the following analyzes: sperm parameters (morphology, motility and counting), hematological, histological of the testis (spermatogenic dynamics, counting and volume of Leydig cells) and StAR protein quantification. In the female offspring, the following parameters were evaluated: initial reproductive parameters of the development, puberty, estrous cycle, fertility test and ovary histology. In the male offspring, the following were evaluated: initial reproductive parameters of development, testicular descent, preputial separation and sperm parameters in adult life. From the parental generation (F0), the spermatic, hematological and histological parameters of the testis were altered, mainly in the lower dose group, showing losses in sperm quality of these animals. In addition, BaP has been shown to have a multigenerational effect. Female and male offspring (F1) presented changes in the parameters of sexual development and fertility

in adult life (females), indicating that the exposure to BaP resulted in a developmental programming from paternal origins to reproductive alterations in both sexes. The response pattern observed in this study was a non-monotonic dose-response curve, characteristic of substances that behave as EDCs. Thus, benzo(a)pyrene in this experimental model can cause negative impacts on reproduction in adult life of exposed animals during the juvenile period until peripuberty, as well as causing multigenerational effects, compromising the reproductive development of their offspring. Approved by ethics committee, n° 958/2017 (CEUA/IBB).

Keywords: peripuberty, endocrine disruptor, benzo(a)pyrene, fertility, paternal programming.

Sumário

Lista de abreviaturas (português)	6
Lista de abreviaturas (inglês).....	7
INTRODUÇÃO.....	8
1. Desenvolvimento ontogenético do sistema genital	8
1.1. Desenvolvimento pré-natal do testículo em ratos.....	9
1.2. Desenvolvimento pós-natal do testículo em ratos	10
1.3. Desenvolvimento pré-natal do epidídimo em ratos.....	11
1.4. Desenvolvimento pós-natal do epidídimo em ratos.....	12
1.5. Desenvolvimento pré-natal do sistema genital feminino em ratas.....	14
1.6. Desenvolvimento pós-natal do sistema genital feminino em ratas.....	15
2. Peripuberdade.....	18
3. Desreguladores endócrinos	19
4. Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos.....	20
5. Benzo(a)pireno	21
5.1. Toxicocinética.....	22
5.2. Possíveis modos de ação do BaP	22
6. Benzo(a)pireno, sistema genital masculino e epigenética.....	24
7. Epigenética e os desreguladores endócrinos	27
8. Programação do desenvolvimento e contribuição paterna.....	28
Justificativa.....	31
Hipótese.....	32
Objetivo geral	33
Objetivos específicos	33
REFERÊNCIAS	34
Capítulo I.....	46
EXPOSURE TO LOW-DOSES OF BENZO(A)PYRENE FROM JUVENILE PERIOD TO PERIPUBERTY LEADS NEGATIVE IMPACTS ON MALE REPRODUCTION IN ADULT RATS	47
Capítulo II.....	85
REPRODUCTIVE IMPAIRMENT IN THE OFFSPRING MEDIATED BY PATERNAL EXPOSURE TO BENZO(A)PYRENE FROM JUVENILE PERIOD TO PERIPUBERTY IN RATS.....	86
Considerações finais.....	115

Lista de abreviaturas (português)

AhR – receptor de hidrocarboneto de arila
ARNT – translocador nuclear do hidrocarboneto de arila
BaP – benzo(a)pireno
BHT – barreira hemato-testicular
BPDE – benzo(a)pireno-diol-époído
CG – células da granulosa
CGP – células germinativas primordiais
CL - células de Leydig
CS – células de Sertoli
CT – células da teca
DDT – diclorodifeniltricloroetano
DE – Desreguladores endócrinos
DG – dia gestacional
DPN – dia pós-natal
FSH – Hormônio folículo estimulante
HAP – hidrocarboneto aromático policíclico
HHG – hipotálamo-hipófise-gônada
LDL – lipoproteínas de baixa densidade
LH – Hormônio luteinizante
LHRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas
OP – oócitos primários
SC – espermátócito
SF1 – fator esteroideogênico 1
SG – espermatogônia
StAR – proteína reguladora aguda esteroideogênica
SZ - espermatozoide
T – testosterona
VLDL – lipoproteínas de muito baixa densidade

Lista de abreviaturas (inglês)

AGD – anogenital distance

APA – adequate for pregnancy age

BaP – benzo(a)pyrene

DOHaD – development origins of health and disease

DSP – daily sperm production

EDC – endocrine disrupting chemical

GD – gestational day

LC – Leydig cell

LPA – large for pregnancy age

NMDR – non-monotonic dose response

PAH – polycyclic aromatic hydrocarbon

PND – post-natal day

SD – standard deviation

SEM – standard error mean

SPA – small for pregnancy age

StAR – Steroidogenic acute regulatory protein

INTRODUÇÃO

O ciclo reprodutivo masculino envolve processos complexos e sensíveis, os quais são controlados pelo sistema endócrino. Estes processos podem ser perturbados após exposição a compostos tóxicos exógenos em diferentes estágios do ciclo e por diversos modos de ação (Moore et al., 2016), acarretando em alterações genéticas e anomalias reprodutivas, que muitas vezes só são detectadas mais tarde, até mesmo em gerações futuras.

Os mecanismos envolvidos na toxicidade reprodutiva dependem do estágio do desenvolvimento em que a exposição ocorre, seja na vida intrauterina, na infância, na puberdade ou na vida adulta (Mantovani e Fucic, 2014; Perobelli, 2014). As alterações mais frequentes incluem criptorquidã, hipospãdia, anomalias dos canais excretores e de glândulas acessórias, tumores testiculares e espermatogênese alterada (Sousa et al., 2017).

Para se identificar as alterações causadas por agentes externos, é necessário que se conheça a formação e a fisiologia normal dos órgãos de interesse no modelo experimental escolhido e, assim, pode-se identificar e quantificar as possíveis alterações desencadeadas por substâncias tóxicas neste grupo de indivíduos.

1. Desenvolvimento ontogênico do sistema genital

A determinação sexual de um indivíduo refere-se a um processo complexo que abrange a fertilização, diferenciação gonadal e a diferenciação sexual no cérebro. Nos mamíferos, o sexo genético é determinado por complementos cromossômicos na fertilização (XX para fêmeas ou XY para machos) (She e Yang, 2016). Tanto os ovários quanto os testículos derivam de uma estrutura denominada gônada bipotente, e o seu desenvolvimento em direção a um destes órgãos dá-se através do arranjo entre a ativação ou repressão de vias de sinalização na linhagem celular de suporte (células de Sertoli – XY ou células da granulosa - XX) (Svingen e Koopman, 2013).

Nos mamíferos, o sistema genital surge a partir do mesoderme intermediário. Logo após a formação dos ductos mesonéfricos, inicia-se a formação adjacente dos ductos paramesonéfricos (Arrotia et al., 2012). Nos machos, a diferenciação sexual gonadal se caracteriza através da regressão dos ductos paramesonéfricos e o desenvolvimento dos ductos mesonéfricos em órgãos reprodutivos característicos do

sexo masculino, como o epidídimo, os ductos deferentes e as glândulas seminais. Já nas fêmeas, os ductos mesonéfricos regredem e os ductos paramesonéfricos diferenciam-se para formar o útero, as tubas uterinas e a parte próxima da vagina (Hannema e Hughes, 2007).

1.1.Desenvolvimento pré-natal do testículo em ratos

Os mamíferos apresentam uma mesma sequência de eventos para o desenvolvimento testicular, diferindo-se somente no espaço de tempo. A sequência básica de maturação dos testículos é: (I) formação pré-natal de cordões testiculares contendo gonócitos e células de Sertoli (CS - células de sustentação do testículo); (II) transformação de gonócitos em espermatogônias (células germinativas masculinas); (III) proliferação das espermatogônias e das células de Sertoli; (IV) maturação das CS e formação da barreira das células de Sertoli; (V) desenvolvimento dos espermátócitos, marcando o início da meiose; e (VI) a espermiogênese (citodiferenciação das espermátides redondas para as alongadas) (Picut, Ziejewski, Stanislaus, 2018).

Após a fertilização, o indivíduo XY possui o gene *SRY* (gene determinante de testículo localizado no cromossomo Y) que é capaz de induzir a diferenciação da linhagem das células de suporte em células de Sertoli (CS) e, conseqüentemente, a transformação da gônada bipotencial em testículo (Gubbay et al., 1990). Em roedores, do DG 10,5 ao 12,5 (dia gestacional), o gene *SRY* inicia a indução da expressão do *Sox9* (Sekido et al., 2008), no qual promove a organogênese do testículo através da ativação de genes pró-testículo e repressão dos genes pró-ovário. A expressão de *Sox9* também desencadeia a cascata de genes essenciais à diferenciação das CS, atuando sinergicamente com SF1 (fator de transcrição) para interagir com o promotor *Amh* para iniciar a expressão de *Amh* (produz o hormônio antimülleriano) (Arango, Lovell-badge, Behringer, 1999). Esta expressão é mantida ao longo do desenvolvimento dos testículos por meio de vários *loopings* de feedback positivo, estimulando assim a via da determinação masculina gonadal (She e Yang, 2016).

Em conjunto, o *Sox9* é essencial para o início da expressão de *Amh* nas células de Sertoli e o *Sox8* reforça a função do *Sox9* na regulação positiva dos transcritos do *Amh* (Lovell-badge, Canning, Sekido, 2002). A expressão de *Sox9* então orchestra a proliferação de CS, a expansão das células somáticas, a migração e diferenciação necessárias para o desenvolvimento, a regressão dos primórdios femininos (hormônio

anti-Mülleriano) e a virilização somática (secreção de testosterona pelas células de Leydig).

Outros fatores importantes, o *Fgf9* e *Wnt4*, são inicialmente expressos em células de suporte sexualmente indiferenciadas em ambas as gônadas XX e XY, e então sua expressão dimórfica (com alta *Fgf9*/baixa *Wnt4* na gônada XY e baixa *Fgf9*/alta *Wnt4* na gônada XX) torna-se aparente na gônada após DG 12,5 (Hiramatsu et al., 2009). Assim, o papel crucial da sinalização de *Fgf9* é suprimir a expressão de *Wnt4* e outros genes específicos de fêmeas e, assim, inibir a via feminina (Jameson, Lin, Capel, 2012). O *Dmrt1* antagoniza *Foxl2* (gene específico de fêmea) para manter o desenvolvimento do testículo pós-natal e o *Foxl2* também reciprocamente suprime o *Dmrt1* para garantir o desenvolvimento do ovário adulto feminino (Uhlenhaut et al., 2009).

Imediatamente após este início da expressão do *Sry*, o hormônio luteinizante (LH) já pode ser detectado no cérebro fetal (Aubert et al., 1985), e o primeiro aspecto morfológico do testículo é identificado no DG 13,5 (Jobling et al., 2011). O testículo fetal torna-se sensível a testosterona entre o DG 14,5 ao 15,5, período em que as células de Leydig fetais produzem testosterona (T) (Habert e Picon, 1984; Scott et al., 2009). Os níveis de testosterona aumentam rapidamente no feto, com um pico no DG 18 a 19 e declina-se imediatamente após o nascimento (Habert e Picon, 1984; Baum et al., 1991; Scott et al., 2009).

Morfológicamente, o testículo fetal é composto de cordões seminíferos, formados no DG 13,5 no rato, inseridos no estroma mesenquimal. Dentro destes cordões, temos duas populações celulares: os gonócitos (células germinativas primordiais) e as células de Sertoli, com características proliferativas. Dentro do estroma mesenquimal, existe uma população proeminente de células de Leydig fetais, sendo responsáveis por produzir testosterona, necessária para virilizar fenotipicamente o embrião em um macho, e mais especificamente, para virilizar o ducto mesonéfrico em epidídimo, ducto deferente e glândula seminal (Huhtaniemi e Pelliniemi, 1992).

1.2. Desenvolvimento pós-natal do testículo em ratos

O desenvolvimento sexual pós-natal de ratos ocorre em quatro estágios de desenvolvimento (Tabela 1) (Ojeda et al., 1980; Picut et al., 2015; Picut e Remick, 2017):

Tabela 1. Comparação cronológica dos estágios de desenvolvimento dos testículos em ratos e humanos.

Período rato/humano	Ratos	Humanos
Neonatal/Recém-nascido	DPN 0 – 7	0 – 28 dias
Infantil/Bebê	DPN 8 – 20	28 dias – 2 anos
Juvenil/Infância	DPN 21 – 32	2 – 11 anos
Peripubere/ Adolescente	DPN 33 – 60	11 – 14 anos

DPN: dia pós-natal. Adaptada de Picut e Remick, 2017.

Período neonatal: é caracterizado morfológicamente por pequenos túbulos seminíferos contendo gonócitos que estão se diferenciando em espermatogônias, células de Sertoli em proliferação, assim como células de Leydig fetais sofrendo rápida regressão no estroma testicular (Picut et al., 2015).

Período infantil: é caracterizado por uma rápida proliferação das espermatogônias e das células de Sertoli e continuação da proliferação e maturação de células de Leydig definitivas. O final deste período é caracterizado pela formação da barreira das células de Sertoli e do lúmen tubular (Picut et al., 2015).

Período juvenil: é caracterizado pelo início da espermatogênese com o desenvolvimento dos espermatócitos e a diferenciação das células das linhagens germinativas dos túbulos seminíferos e o início da espermiogênese. A produção de testosterona aumenta rapidamente após o DPN 28, relacionando-se com a maturação das células de Leydig adultas (Picut et al., 2015).

Período peripubere: há um aumento rápido e contínuo de testosterona, acompanhado de um aumento acentuado do diâmetro dos túbulos seminíferos e o fim da diferenciação das células germinativas, formando os espermatozoides (Tabela 2) (Picut et al., 2015).

1.3. Desenvolvimento pré-natal do epidídimo em ratos.

Sob a influência do hormônio antimulliriano (produzido pelas SC imaturas) e da testosterona (produzida pelas células de Leydig fetais), a porção cranial dos ductos mesonéfricos se diferencia para formar o epidídimo pós-natal (Arrotia et al., 2012).

1.4. Desenvolvimento pós-natal do epidídimo em ratos.

Enquanto a proliferação celular do ducto mesonéfrico parece ser dependente de andrógenos e fatores mesenquimais durante o desenvolvimento pré-natal, alguns fatores produzidos pelos testículos desempenham um papel adicional durante o desenvolvimento pós-natal (Hinton et al., 2011). Estes fatores são moléculas como androgênios, fatores de crescimento e enzimas que atuam na atividade secretora das células epiteliais do epidídimo e, posteriormente, nos espermatozoides que participam diretamente do processo de maturação epididimal (Robaire, Hinton, Orgebin-Crist, 2015). O desenvolvimento pós-natal do epidídimo de mamíferos pode ser dividido em três períodos (Sun e Flickinger, 1979): indiferenciação (do nascimento ao DPN 15), período de diferenciação (DPN 16 - 44) e período de expansão (> DPN 44).

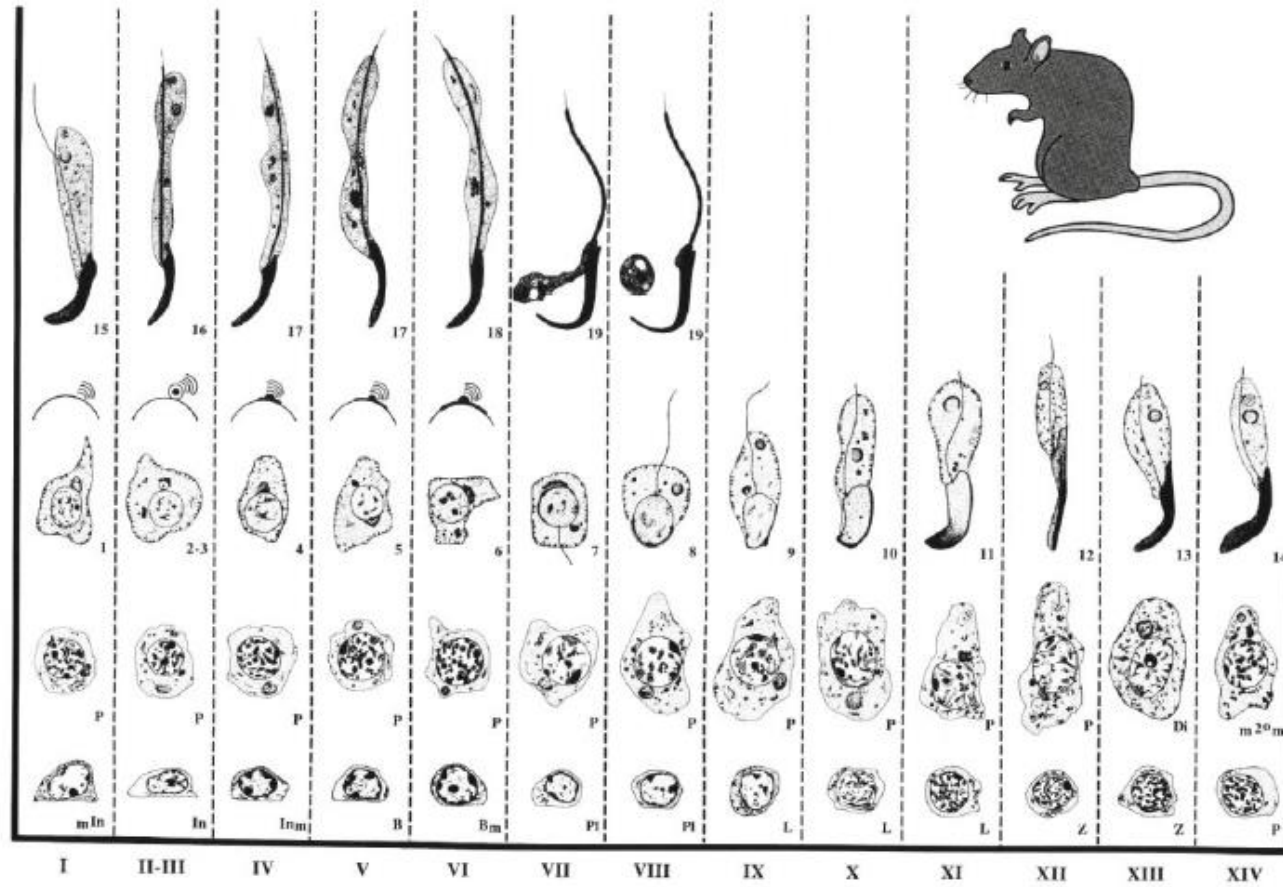
Período de indiferenciação (do nascimento ao DPN 15): é caracterizada pela ausência de especialização das células epiteliais, crescimento e enovelamento do ducto epididimal. As primeiras alterações histológicas evidentes é o aparecimento de células halo que marca o fim do período de indiferenciação para o período de diferenciação (Robaire, Hinton, Orgebin-Crist, 2015).

Período de diferenciação (DPN 16 - 44): há uma rápida proliferação celular e diferenciação das células em principais, estreita, apical, basal, clara e halo, apresentando um gradiente no sentido cabeça-cauda (Limanowski et al., 2001). Acredita-se que tanto a testosterona quanto a chegada de células germinativas e fluido testicular contribuam para a diferenciação epididimária (Pryor et al., 2000). Como o epidídimo passa pela maior diferenciação celular durante esta fase, torna-se um alvo sensível para substâncias tóxicas de ação direta ou para qualquer fator que interfira na maturação testicular e na produção de testosterona.

Período de expansão (> DPN 44): os túbulos aumentam de tamanho e são preenchidos com espermatozoides. O epidídimo depende de andrógenos para manter a arquitetura e as funções epiteliais normais.

1 **Tabela 2.** Aspectos morfológicos do ciclo espermatogênico dos ratos

2



1.5. Desenvolvimento pré-natal do sistema genital feminino em ratas.

Por muito tempo, acreditava-se que para as gônadas bipotenciais se desenvolverem em ovários, seria necessário apenas a ausência do gene *SRY*. Recentemente, foi demonstrado que o processo de desenvolvimento ovariano depende da ativação de genes pró-ovário e repressão de genes pró-testículo, similarmente como ocorre no desenvolvimento testicular (Nicol et al., 2015). O chamado gene Z, correspondente do sexo feminino ao gene *SRY*, inibe vias determinantes para testículo enquanto promove a diferenciação ovariana (Nicol e Yao, 2014). O gene Z ativa outros genes, como o *WNT4* (Biason-Lauber et al., 2004), *RSPO1* (Chassot et al., 2008) e *FOXL2* (Pailhoux et al., 2002).

Ambos os genes *Wnt4* e *Rspo1* produzem proteínas que são expressas na gonada bipotencial e a sua expressão torna-se ovário-específica no DG 11,5 (Parma et al., 2006). Modelos de ratos *knockout* revelam que os genes *WNT4* e *RSPO1* são partes de uma via de sinalização comum que atua através da β -catenina (Figura 1) (Tomizuka et al., 2008). Alvos adicionais da via *Wnt4/Rspo1/ β -catenina* foram identificados, incluindo a *folistatina* (*Fst*) e *Bmp2* (Manuylov et al., 2008), sendo que o papel do gene *FST* é prevenir a formação de vasculatura específica de testículo por meio da inibição da activina B, e do gene *FOXL2* é inibir a expressão do gene *SOX9* e a ativação de genes pró-ovarianos (Yao, Aardema, Holthusen, 2006).

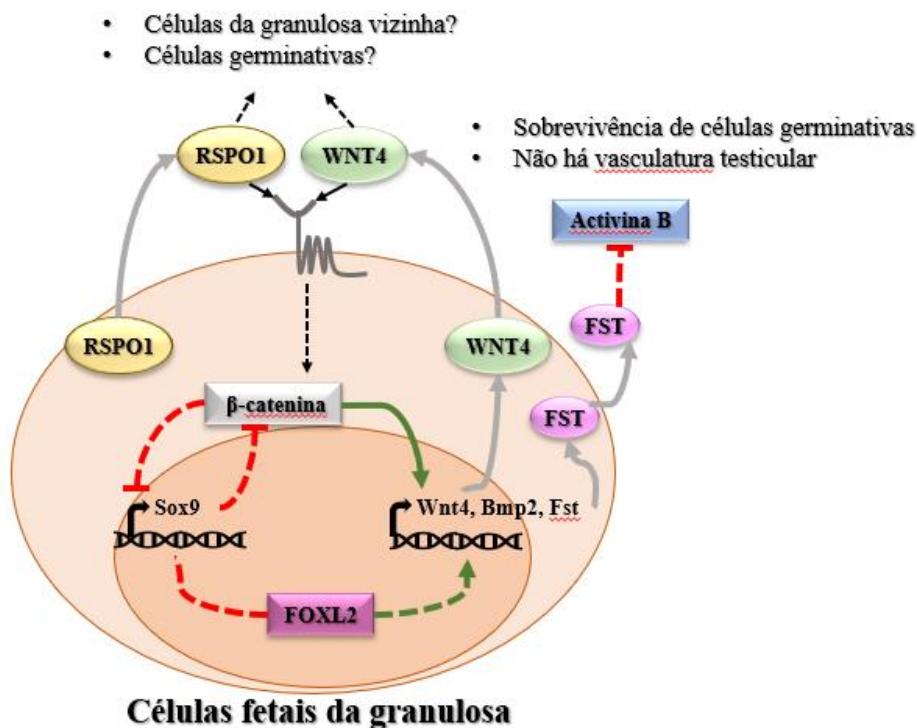


Figura 1. O desenvolvimento das células da granulosa fetal é promovido principalmente por duas proteínas, a *Rspo1* e *Wnt4*, que atuam nas células pré-granulosas de maneira autócrina/parácrina. Com base na evidência de outros modelos, a via *Wnt4/Rspo1* ativa sinergicamente a β -catenina, que induz a transcrição de fatores ovarianos, como o *Fst*, *Bmp2* e o próprio *Wnt4*. O fator de transcrição FOXL2 participa na supressão de *Sox9* e ativação de outros genes ovarianos, como o *Fst*. Adaptada de Nicol e Yao (2014).

Morfologicamente, há uma intensa proliferação das células germinativas primordiais após a migração para as gônadas. A gametogênese feminina inicia-se na vida pré-natal, sendo que as células de suporte feminina (células da granulosa) se arranjam em torno dos oócitos, formando os folículos primordiais (Tingen, Kim, Woodruff, 2009). Os oócitos avançam através da prófase I e são mantidos no diplóteno, onde permanecem quiescentes aguardando a indução da maturação dependente de gonadotrofina na puberdade, quando se transformaram em oócitos primários (Jones, 2008).

1.6. Desenvolvimento pós-natal do sistema genital feminino em ratas.

Nas fêmeas, há cinco períodos do desenvolvimento identificáveis, com alterações microscópicas. Esses estágios incluem os períodos neonatal (DPN 0–7), infantil (DPN 8–20), juvenil (DPN 21–32), peripubere (DPN 33–37) e púbere (DPN 38–46) (Tabela 3) (Ojeda, Advis, Andrews, 1980; Ojeda e Skinner, 2006).

Estes estágios de desenvolvimento dependem principalmente de alterações fisiológicas do desenvolvimento e não são definidos apenas por alterações reprodutivas, exceto nos períodos peripubere e púbere. O período peripubere é definido como os 3 a 5 dias anteriores à primeira ovocitação, quando o hormônio luteinizante (LH) exhibe diferenças nos surtos matinal e vespertino e quando o líquido intrauterino aparece pela primeira vez; a puberdade é marcada pela abertura vaginal e a primeira ovocitação nas ratas (Picut e Remick, 2017).

Tabela 3. Comparação cronológica dos estágios de desenvolvimento dos ovários em ratas e humanos.

Período rato/humano	Ratos	Humanos
Neonatal/Recém-nascido	DPN 0 - 7	0 – 28 dias
Infantil/Bebê	DPN 8 - 20	28 dias – 2 anos
Juvenil/Infância	DPN 21 - 32	2 – 12 anos

Peripuberdade	DPN 33 - 37	ND
Pubere/Adolescente	DPN 38 – 46	12 – 16 anos

ND – Não identificável. Adaptado de Picut e Remick (2017).

Período neonatal: é marcado pelo desenvolvimento de folículos primordiais e secundários estritamente controlado por fatores de crescimento (como FGF-2, BMP-4 e FGF-7) parácrinos e autócrinos produzidos pelo oócito (Skinner, 2008), pelas células da granulosa, ou por células estromais. As células da granulosa dos folículos primários começam a expressar os receptores LH e FSH após o DPN 5 (Ojeda e Skinner, 2006). Alguns folículos primários imaturos começam a se diferenciar e se encaminham para a medula ovariana.

Período infantil: no DPN 10, o desenvolvimento antral precoce ocorre, e a formação do antro é a característica morfológica marcante que marca a mudança do ovário da independência hipofisária (período neonatal) para a dependência pituitária (período infantil) (Skinner, 2008). Durante o período infantil, há um aumento nos níveis séricos de LH e FSH, atingindo um máximo no DPN 12 a 14 (Ojeda e Skinner, 2006). Após este período, inicia a produção de estrógeno e ocorre assim um feedback negativo, acarretando em uma queda súbita de LH e FSH (Ojeda e Skinner, 2006).

Período juvenil: a característica mais proeminente do período juvenil é a apoptose das células da granulosa e a atresia dos folículos. Os níveis séricos de FSH estão continuamente diminuindo, atingindo seu nível mínimo no DPN 30 (Ojeda e Skinner, 2006). Os níveis de LH diminuem durante a primeira metade do período juvenil, mas ao contrário dos níveis de FSH, começa a ser produzido em um padrão pulsátil e bimodal, com um pequeno surto de manhã e tarde. A maturação do padrão de produção de LH pulsátil e bimodal é devida ao início da retroalimentação positiva do estrógeno na produção de LH por volta do DPN 24 (Davis, Travlos, McShane, 2001). Os folículos corticais selecionados continuam a desenvolver-se devido, em parte, ao fato de os receptores FSH/LH atingirem um nível máximo de adultos no DPN 30, resultando em maior sensibilidade de certos folículos a níveis relativamente baixos de FSH sérica (Nicol e Yao 2015).

Período peripubere: se dá a partir do aparecimento do folículo ovulatório (0,9 a 1,0 mm de diâmetro) no córtex externo (Picut, 2017). Esse período dura de 3 a 5 dias e é definido como o momento em que há a secreção de LH em surtos, facilitando o

Considerações finais

Assim, levando em consideração os resultados e a discussão dos dois capítulos apresentados, temos que o BaP age como um desregulador endócrino quando o indivíduo é exposto no período juvenil até a peripuberdade e gera impactos negativos na produção espermática na vida adulta. Além disso, o BaP é capaz de causar uma programação no desenvolvimento dos machos expostos e, via células germinativas, foi capaz de alterar vários parâmetros reprodutivos da sua prole masculina e feminina, deixando claro a importância da programação paterna no desenvolvimento da prole.