

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 28/07/2019.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Campus de Botucatu



Reconstrução de redes regulatórias gênicas em células de Sertoli humanas expostas ao 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD)

MARIANA ANTUNES RIBEIRO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular, Estrutural e Funcional*.

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano

Botucatu-SP

2017



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de Botucatu



PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Reconstrução de redes regulatórias gênicas em células de Sertoli
humanas expostas ao 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina
(TCDD)**

ALUNA: MARIANA ANTUNES RIBEIRO

ORIENTADOR: PROF. DR. WELLERSON RODRIGO SCARANO

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. PATRÍCIA PINTOR DOS REIS

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para a
obtenção do título de Doutor no Programa de
Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada,
Área de concentração *Biologia Celular,
Estrutural e Funcional*.

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano

Botucatu-SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO -CRB 8/7500

Ribeiro, Mariana Antunes.

Reconstrução de redes regulatórias gênicas em células de Sertoli humanas expostas ao 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) / Mariana Antunes Ribeiro. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Wellerson Rodrigo Scarano

Coorientador: Patrícia Pintor dos Reis

Capes: 20602006

1. Sertoli, Células de. 2. MicroRNAs. 3. Dibenzodioxinas Policloradas. 4. Expressão gênica. 5. Seqüenciamento de nucleotídeo. 6. Transcriptoma.

Palavras-chave: Rnaseq; TCDD; células de Sertoli; infertilidade; miRNAs.

DEDICATÓRIA

Dedico este estudo a todos os homens
inférteis que buscam respostas e tratamentos
para realizar o sonho da paternidade

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano, por entrar comigo neste mundo novo da epigenética, por me dar todo apoio em todas as minhas decisões em aprofundar o estudo numa área tão fascinante e ao mesmo tempo difícil para nós embriologistas. Juntos aprendemos, ensinamos e conseguimos. Obrigada pela oportunidade, pela confiança, pelas sugestões, pelo incentivo nas horas difíceis, pelas correções sempre pertinentes e por acreditar no meu potencial, muito mais do que eu mesma acreditava.

Ao meu marido Luis Felipe, que sempre acreditou que todo sacrifício da distância valeria a pena pelo simples fato de me ver feliz. Obrigada por todo orgulho que você tem de mim, por me achar tão melhor do que eu realmente sou e dessa forma, sem perceber, me incentivar a ser sempre melhor.

Aos meus pais Milton e Cristina por serem meu modelo de batalha e coragem e por nunca me deixarem desistir dos meus sonhos. Vocês sempre me deram tanto, principalmente, incentivo pra continuar mesmo nas horas mais difíceis. Obrigada todo amor e por me ajudarem, até hoje, a escolher o melhor caminho.

As minhas irmãs e cunhados que mesmo à distância estavam sempre do meu lado me incentivando e proporcionando momentos de muita felicidade.

Ao Prof. Dr. Stephen Krawetz que me recebeu de braços abertos na Wayne State University e me ensinou tanto, me mostrou o outro lado da ciência, da dedicação em tempo integral, do estudo diário da biologia molecular e por contribuir robustamente para este trabalho.

Ao Prof. Danilo Pinhal por abrir seu laboratório para que pudéssemos realizar os PCRs em tempo real, possibilitando a finalização do trabalho.

Aos meus queridos amigos e colaboradores Jason e Leonardo que delineararam comigo este projeto em discussões científicas tão produtivas, por estarem sempre disponíveis como amigos e como parceiros científicos.

A querida amiga Leticia, por ser minha parceira de bancada. Por me ensinar e aprender comigo este mundo tão novo da biologia molecular. Terminamos juntas e aprendemos que juntas o caminho ficou mais fácil.

Aos amigos de laboratório Lucas, Livia, Talita e Marilia pelo dia-dia tão descontraído e por torcerem tanto pelo meu sucesso.

À todos professores e funcionários do departamento de Morfologia pela convivência, companheirismo e incentivo nos momentos de dúvida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida, com processo nº 2013/12154-2.

Aos meus pacientes que foram os maiores responsáveis pelo meu retorno à Universidade no desejo de estudar as causas idiopáticas da infertilidade masculina.

“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente”.

Roger Von Oech

RESUMO

A fertilidade masculina e a espermatogênese estão diretamente ligadas à capacidade das células de Sertoli em produzir fatores associados ao desenvolvimento das células germinativas. As células de Sertoli expressam receptores para FSH e testosterona e são os principais reguladores da espermatogênese. Aproximadamente 60-70% dos casos de infertilidade masculina são considerados idiopáticos, devido aos mecanismos moleculares envolvidos na espermatogênese ainda serem desconhecidos. Estudos recentes relatam que os microRNAs (miRNAs), são capazes de modular a função testicular durante a espermatogênese e sua expressão alterada pode estar envolvida na infertilidade masculina. miRNAs podem desempenhar papel importante na resposta aos xenobióticos que têm todas as consequências adversas para a saúde. Um grupo importante de compostos orgânicos com potencial tóxico são as dioxinas, como o 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD). Modelos experimentais de exposição ao TCDD, em camundongos, demonstraram que sua exposição provoca baixa contagem de espermatozoides e atraso na puberdade. Neste estudo, analisamos o efeito do TCDD nas células de Sertoli humanas *in vitro* após 72h a uma dose de 10nM. Nossos resultados mostraram que as enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase diminuíram sua atividade e confirmaram o estresse oxidativo causado pelo TCDD nesse tipo celular. 78 miRNAs apresentaram expressão alterada, com regulação positiva de 73 e regulação negativa de 5 miRNAs quando comparados ao grupo controle. Com relação ao perfil de expressão gênica, 51 genes se apresentaram desregulados, dos quais 46 com regulação positiva e 5 genes com regulação negativa. Três tRNAs regularam sua expressão negativamente devido a exposição ao TCDD. Além disso, 30 piRNAs se mostraram desregulados, 17 com regulação positiva e 13 com regulação negativa ao comparar os grupos. 7 diferentes famílias matriz de sítios de ligação de fatores de transcrição apresentaram expressão diferencial estatisticamente significativa nas células de Sertoli após exposição ao TCDD. Várias vias se mostraram alteradas por ação do agente tóxico. Além disso, nosso estudo mostrou um baixo número de genes similares entre os mais expressos entre humanos, ratos e camundongo que reflete a fisiologia de cada espécie e alerta sobre o cuidado ao utilizar modelos animais como substitutos para a exposição humana.

Palavras-chave: células de Sertoli, TCDD, miRNAs, RNAseq, infertilidade.

ABSTRACT

Male fertility and spermatogenesis are directly linked to the ability of Sertoli cells to produce factors associated with the development of germ cells. Sertoli cells express receptors for FSH and testosterone, and are the major regulators of spermatogenesis. Approximately 60-70% of male infertility cases are considered idiopathic, due to the molecular mechanisms involved in spermatogenesis are still unknown. Recent studies report that microRNAs (miRNAs) are capable of modulating spermatogenesis in testicular function and its altered expression may be involved in male infertility. miRNAs may play a role in response to xenobiotics that have all the adverse consequences for health. An important group of organic compounds that are potentially toxic are the dioxins such as 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Experimental models of exposure to TCDD in mice showed that its exposure causes low sperm count and delayed puberty. In this study, we analyzed the effect of TCDD on human Sertoli cells after a exposure of 72h *in vitro* at a dose of 10nM. Our results showed that the antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase decreased their activity and confirmed the oxidative stress caused by TCDD in this cell type. 78 miRNAs showed altered expression with upregulation of 73 miRNAs and downregulation of 5 miRNAs compared to the control group. Regarding the gene expression profile, 51 genes showed deregulated, of which 46 genes with upregulation and downregulation of 5 genes. Three tRNAs were downregulated due to exposure to TCDD. Furthermore, 30 piRNAs proved deregulated, 17 piRNAs with upregulation and 13 with downregulation when comparing the groups. 7 different matrix families of transcription factor binding sites showed statistically significant expression in Sertoli cells after exposure to TCDD. Several pathways have been altered by the action of the toxic agent. Furthermore, our study showed a low number of similar genes among the most expressed among humans, rats and mice, which reflects the physiology of each species and alerts the caution when using animal models as substitutes for human exposure.

Key words: Sertoli cells, TCDD, miRNAs, RNAseq, infertility.

Lista de Figuras

Figura 1. Túbulos Seminíferos.	2
Figura 2. Secção transversal do epitélio seminífero.....	3
Figura 3. Célula de Sertoli.....	4
Figura 4. Esquema representativo da biogênese dos microRNAs	7
Figura 5. via do AhR e sob ação do TCDD.....	12
Figura 6. Esquema do protocolo de detecção do <i>Mycoplasma sp.</i>	18
Figura 7. mRNA fluxograma.....	25
Figura 8. sncRNAs fluxograma.....	27
Figura 9. Células de Sertoli humanas em cultivo	33
Figura 10. Resultado do teste de <i>Mycoplasma sp</i> nas células HSeC.	35
Figura 11. Teste de MTT.....	35
Figura 12. Atividade de enzimas antioxidantes.....	36
Figura 13. A análise PCA expressao genica.....	37
Figura 14. Genes diferencialmente expressos nas células de Sertoli humanas	38
Figura 15. Análise PCA miRNAs	42
Figura 16. miRNAs diferencialmente expressos em células de Sertoli humanas.	43
Figura 17. Western Blot para as proteínas AhR, SOD2, NRF2 e β -actina.	54
Figura 18. Western Blot para as proteínas AHRR e β -actina.....	55
Figura 19. Diagrama de Venn.	62

Lista de Tabelas

Tabela 1. Certificado de Análises Lonza	17
Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos para estudo da expressão gênica.....	30
Tabela 3. Os 10 genes marcadores específicos das células de Sertoli humanas	34
Tabela 4. Genes diferencialmente expressos	39
Tabela 5. miRNAs diferencialmente expressos.....	44
Tabela 6. Predição dos miRNAs e seus respectivos genes alvo.....	48
Tabela 7. Vias alteradas após exposição ao TCDD	51
Tabela 8. miRNAs diferencialmente expressos por miRNA-Seq e TaqMan qPCR.....	52
Tabela 9. Genes diferencialmente expressos por miRNA-Seq e TaqMan qPCR	52
Tabela 10. miRNAs diferencialmente expressos e seus respectivos alvos	53
Tabela 11. piRNAs diferencialmente expressos	56
Tabela 12. Famílias Matriz dos fatores de transcrição relacionados aos genes diferencialmente expressos	58
Tabela 13. Fatores de Transcrição presentes nas Famílias das Matrizes	59
Tabela 14. tRNAs diferencialmente expressos	60
Tabela 15. Os 10 tRNAs mais expressos em células de Sertoli humanas	61
Tabela 16. Dados de <i>input</i> no Diagrama de Venn	63
Tabela 17. Lista dos genes mais expressos em células de Sertoli que estão em comum entre as espécies	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. INFERTILIDADE	1
1.2. GAMETOGÊNESE MASCULINA	1
1.3. CÉLULAS DE SERTOLI.....	3
1.4. PEQUENOS RNAs NÃO-CODIFICANTES (sncRNAs) E A INFERTILIDADE MASCULINA	5
1.5. MICRORNAs E A REGULAÇÃO EXPRESSÃO GÊNICA.....	6
1.6. OS MICRORNAs E A ESPERMATOGÊNESE	8
1.7. OS MICRORNAs E OS XENOBIÓTICOS	9
1.8. 2,3,7,8-TETRACLORODIBENZO-P-DIOXINA (TCDD)	9
2. OBJETIVO	15
2.1. OBJETIVO GERAL	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. CULTIVO CELULAR.....	16
3.2. TESTE DE MICOPLASMA	16
3.3. SOBREVIVÊNCIA CELULAR.....	19
3.4. EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS AO TCDD	20
3.5. ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES	20
3.6. EXPRESSÃO GÊNICA	22
<i>a) Extração do RNA total.....</i>	<i>22</i>
<i>b) Purificação do RNA mensageiro (mRNA), construção das bibliotecas, amplificação clonal dos clusters e sequenciamento de cDNA.....</i>	<i>22</i>
3.7. EXPRESSÃO DOS sncRNAs.....	23
<i>a) Sequenciamento de alta performance.....</i>	<i>23</i>
3.7. ANÁLISES DE SEQUENCIAMENTO.....	23
<i>a) Dados de mRNA-Seq:</i>	<i>23</i>
<i>b) Dados de sncRNA seq.....</i>	<i>25</i>
3.8. ANÁLISE DO COMPONENTE PRINCIPAL (PCA)	28
3.9. PREDIÇÃO DOS ALVOS DOS MIRNAS	28
3.15. SÍTIOS DE LIGAÇÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO (TFBSs):	31
3.16. PERFIL DO TRANSCRIPTOMA DE CÉLULAS DE SERTOLI: COMPARAÇÃO ENTRE CAMUNDONGO, HUMANO E RATO.	32
3.17. INTERPRETAÇÃO DOS DADOS:	32
4. RESULTADOS:.....	33
4.1. CULTURA CELULAR	33
4.3. TESTE DE MICOPLASMA	34
4.4. SOBREVIVÊNCIA CELULAR	35
4.5. ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES	36
4.6. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS IDENTIFICADOS POR RNA-SEQ	37
4.7. MIRNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS IDENTIFICADOS POR sncRNA-SEQ	41
4.8. PREDIÇÃO DOS ALVOS DE MIRNAS	48

4.9. IDENTIFICAÇÃO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO E REDES	50
4.13. piRNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS IDENTIFICADOS POR SNCrNA-SEQ	55
4.14. SÍTIOS DE LIGAÇÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO (TFBSs)	57
4.15. RNAs TRANSPORTADORES (tRNAs):	60
4.16. Os 10 tRNA mais expressos:	61
4.17. PERFIL DO TRANSCRIPTOMA DAS CÉLULAS DE SERTOLI: COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS HUMANAS, CAMUNDONGO E RATO.	62
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÕES	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXOS	88

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infertilidade

Um casal é considerado infértil quando não obteve gravidez após 12 ciclos de relacionamento sexual, sem o uso de qualquer método de anticoncepção (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009). A literatura descreve diferentes etiologias para a infertilidade. Algumas causas são mais comuns em certos países que outros, tais como doenças inflamatórias pélvicas e infecções sexualmente transmissíveis (Kamel, 2010). Hábitos pessoais também podem influenciar a fertilidade, como o uso abusivo de álcool e cigarro (Kamel, 2010). A infertilidade acomete 10-15% dos casais em idade reprodutiva e o fator masculino pode ser responsável por 30-50% dos casos (Boivin *et al.*, 2007). A avaliação inicial no homem subfértil inclui minuciosa anamnese, análise do espermograma e dosagens hormonais. No entanto, a análise seminal normal não está necessariamente relacionada ao potencial de fertilidade já que não avalia a função do espermatozoide, mas somente a morfologia e contagem espermática (Samplaski *et al.*, 2010).

1.2. Gametogênese Masculina

Os testículos, as gônadas masculinas, são compostos por um emaranhado de túbulos seminíferos envoltos por uma túnica fibrosa denominada túnica albugínea. O testículo é subdividido em lóbulos através de septos que partem dessa túnica. Em cada lóbulo encontra-se de dois a três túbulos seminíferos que convergem para a zona posterior do testículo formando a rede testicular (Croxford *et al.*, 2011) (**Figura 1**).

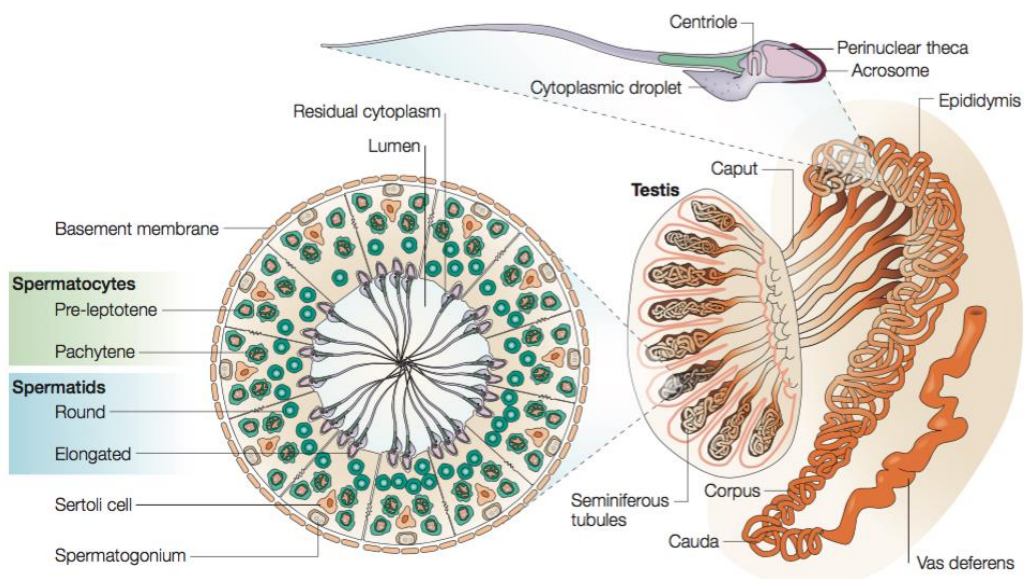


Figura 1. Túbulos Seminíferos: figura esquemática que representa um corte sagital testicular e um túbulo seminífero mostrando células de vários estágios da espermatogênese (painel da esquerda). E o testículo formado por um emaranhado de túbulos seminíferos, convergindo para a formação da rede testicular e finalizando no epidídimo (painel da direita) (Krawetz, 2005).

No túbulos seminíferos são observadas células de grande dimensão, as células de Sertoli, e o epitélio germinativo propriamente dito, que origina os espermatozoides (**Figura 1 e Figura 2**). Encaixadas no espaço entre as circunvoluções dos túbulos seminíferos podem-se ver as células intersticiais ou de Leydig, responsáveis pela produção dos hormônios sexuais masculinos, testosterona e desidroepiandrosterona (DHEA), responsáveis pelo desenvolvimento dos órgãos genitais masculinos e dos caracteres sexuais secundários (McAninch, J. W.; Tanagha, 2010).

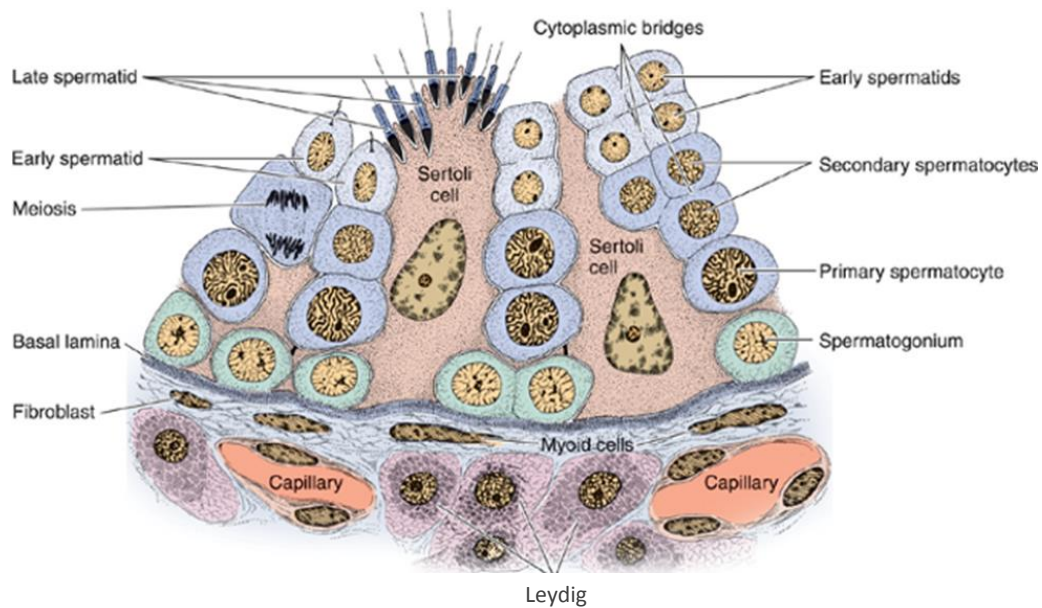


Figura 2. Secção sagital do epitélio seminífero com as células germinativas e células de Sertoli. As células de Sertoli têm uma grande superfície dividindo o epitélio germinativo em compartimento basal e adluminal. O compartimento basal contém espermatogônias na fase pré-leptoteno e o compartimento adluminal contém os espermatócitos, espermatídeos e espermatozoides (Junqueira, L.C.; Carneiro, 2013).

A espermatogênese, processo responsável pela produção dos gametas masculinos, ocorre nos túbulos seminíferos dos testículos e divide-se em quatro fases importantes: Multiplicação, Crescimento, Maturação e Diferenciação ou Espermiogênese. Tem início nos estágios embrionários, diminuindo acentuadamente a partir dos 50 anos de idade (Samplaski *et al.*, 2010).

1.3. Células de Sertoli

As células de Sertoli são células somáticas piramidais que possuem uma grande área de superfície, ocupam aproximadamente 17-19% do volume do epitélio seminífero em ratos, dessa forma, possibilitam o desenvolvimento de um grande número de células germinativas na porcentagem estimada em 1:50 no testículo de ratos adultos (Weber *et al.*, 1983) (**Figura 3**). O número dessas células no epitélio testicular pode determinar o tamanho testicular, o número de células germinativas por testículo e a produção de espermatozoides propriamente dita. Além disso, as células de Sertoli são responsáveis por proporcionar um ambiente

protegido e altamente especializado, no interior dos túbulos seminíferos, para o desenvolvimento das células germinativas. As células de Sertoli são conectadas por junções comunicantes, denominadas junções *gap*, que possibilitam a troca iônica e química entre as células, o que é importante para a coordenação do ciclo do epitélio seminífero. Células de Sertoli adjacentes são unidas por junções ocludentes, também conhecidas por *tight junctions*, situadas nas suas paredes baso-laterais, formando a denominada barreira hematotesticular. No início da meiose, as células germinativas ultrapassam a barreira para o interior do epitélio seminífero e, a partir desse momento, tornam-se dependentes das células de Sertoli para o fornecimento de nutrientes e fatores de crescimento para o seu desenvolvimento (Mruk and Cheng, 2004).

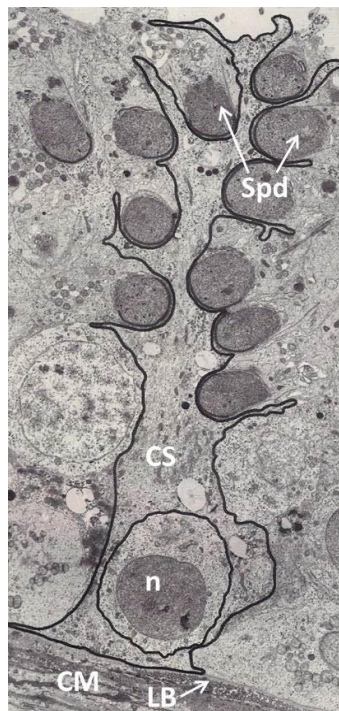


Figura 3. A célula de Sertoli (CS) estende-se desde a lâmina basal (LB) até a luz do epitélio germinativo, onde se observa, na porção apical, várias espermátides em diferenciação (Spd); núcleo da CS em destaque (n); células mióides (CM) sustentando o túbulo seminífero. Aumento: 3300X; modificado de SKINNER (2005).

A fertilidade masculina e o processo de espermatogênese estão diretamente relacionados à capacidade das células de Sertoli em produzir fatores determinantes para o desenvolvimento das células germinativas (Griswold, 1998).

As células de Sertoli são responsáveis pelo fornecimento de substâncias necessárias para o metabolismo das células germinativas (lactato, transferrina, proteínas andrógeno-dependentes); fatores de crescimento [fator de célula-tronco, fator transformador de crescimento alfa e beta (TGF- α e TGF- β – Transforming Growth Factor)], fator de crescimento homólogo a insulina (IGF-I – Insulin-like Growth Factor), fator de crescimento fibroblástico (FGF; Fibroblast Growth Factor), fator de crescimento epidermal (EGF; Epidermal Growth Factor) e hormônios que regulam o desenvolvimento das estruturas reprodutivas masculinas, substância inibidora-mulleriana (MIS) e inibina (Skinner, 2005).

Além disso, as células de Sertoli também produzem a Proteína Ligadora de Andrógenos (ABP) (Santemma *et al.*, 1992) que é uma glicoproteína que se liga especificamente à testosterona ou à di-hidrotestosterona, tornando-os menos lipofílicos e mais concentrados nos túbulos seminíferos e é responsável pela manutenção do microambiente, bem como para permitir a espermatogênese nos túbulos seminíferos e a maturação espermática no epidídimo (Ma *et al.*, 2015).

1.4. Pequenos RNAs não-codificantes (sncRNAs) e a Infertilidade Masculina

Apesar da produção de espermatozoides ser peça fundamental para a fertilidade do homem, estudos sugerem que 60-70% dos casos de infertilidade masculina são considerados idiopáticos, uma vez que os mecanismos moleculares envolvidos na espermatogênese ainda são desconhecidos (Wu *et al.*, 2010). Estudos recentes relatam que moléculas reguladoras de RNA, tais como os microRNAs, são capazes de regular a função testicular durante a espermatogênese e sua expressão alterada pode estar envolvida com vários fatores da infertilidade masculina (Lian *et al.*, 2009; Abu-Halima *et al.*, 2013). Os *Piwi-interacting RNAs* (piRNAs) são também sncRNAs e formam complexos de RNA-proteína através de associações com proteínas da família PIWI que são basicamente restritas à linhagem germinativa (Thomson and Lin, 2009). Estes complexos piRNA foram relacionados ao silenciamento gênico dos retrotransposons por vias epigenéticas ou pós-transcricionais e por outros elementos genéticos na linhagem germinativa, em particular durante a espermatogênese (SIOMI *et al.*, 2011). SHARMA *et al.* (2015) também relataram a

importância dos RNAs transportadores (tRNAs) durante o processo de espermatogênese, isto é, a regulação de retro-elementos endógenos ativos no embrião pré-implantação.

1.5. MicroRNAs e a regulação expressão gênica

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs reguladores não-codificantes (sncRNAs), com tamanho variando de 17 a 25 nucleotídeos (ver miRBase, <http://microrna.sanger.ac.uk/>). A definição de miRNA é baseada na sua formação pela ação da enzima RNase III (Dicer), uma RNase que processa precursores com estrutura de hairpin (conhecidos como pré-miRNA) originando o miRNA maduro (Ambros *et al.*, 2003). Os miRNAs reprimem pós-transcricionalmente a expressão gênica pelo reconhecimento de locais complementares na região 3' não traduzida (3' UTR) de seus RNAs mensageiros (mRNA) alvos podendo causar também sua degradação.

A biogênese de um miRNA começa com a síntese de um longo transcrito primário conhecido como pri-miRNA. Os pri-miRNAs são preferencialmente transcritos pela RNA polimerase II e mantém características tais como estrutura de *cap* na sua região 5' e cauda poli (A) na sua região 3' (Cai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Kim, 2005).

No núcleo, o pri-miRNA é processado para pré-miRNA pela enzima RNase III (Drosha), a qual requer um cofator, a proteína DGCR8 (DiGeorge Syndrome critical region gene 8) em humanos (Pasha em D. Melagonaster e C. Elegans) (Landthaler *et al.*, 2004; Gregory *et al.*, 2004; Denli *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2003). A DGCR8 forma com a Drosha um grande complexo conhecido como complexo microprocessador, que em humanos possui ~ 650 kDa (Gregory *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004). Esse complexo microprocessador reconhece e cliva o pri-miRNA, originando uma molécula com estrutura de hairpin de aproximadamente 60 pb, o pré-miRNA (Zeng and Cullen, 2005; Han *et al.*, 2006). Um subconjunto de miRNAs, conhecidos como miRtrons utiliza uma via alternativa, na qual os pré-miRNAs são derivados como produtos secundários de um evento de *splicing*, sem a necessidade de processamento pela Drosha (Berezikov *et al.*, 2007; Ruby *et al.*, 2007; Okamura *et al.*, 2007). Após o processamento nuclear, cada pré-miRNA é exportado para o citoplasma pela exportina-5 (EXP5), membro da família de receptores de transporte nuclear (Yi *et al.*, 2003; Bohnsack *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004) sendo convertido para miRNA maduro e funcional pela Dicer (Hutvágner *et al.*, 2001). Após a clivagem pela Dicer, a molécula de dupla fita de RNA com aproximadamente 22 nucleotídeos associa-se à proteína

Argonauta para formar o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (Kim *et al.*, 2009). Uma das fitas de aproximadamente 22 nucleotídeos do RNA dupla fita permanece na proteína Argonauta como o miRNA maduro (fita guia ou miRNA), enquanto a outra fita é degradada (Rand *et al.*, 2005). O complexo miRNA-RISC interage com sítios ligantes da região 3' UTR do RNA mensageiro alvo inibindo a expressão ou degradando o RNA mensageiro alvo (Lee and Dutta, 2009; Lim *et al.*, 2005). A interação entre o RNA mensageiro alvo e o complexo miRNA-RISC ocorre devido à complementaridade total ou parcial de uma sequência de 5-7 nucleotídeos do miRNA, chamada de sequência *seed*, e do RNA mensageiro alvo (Lee and Dutta, 2009; Sen and Blau, 2005) (**Figura 4**).

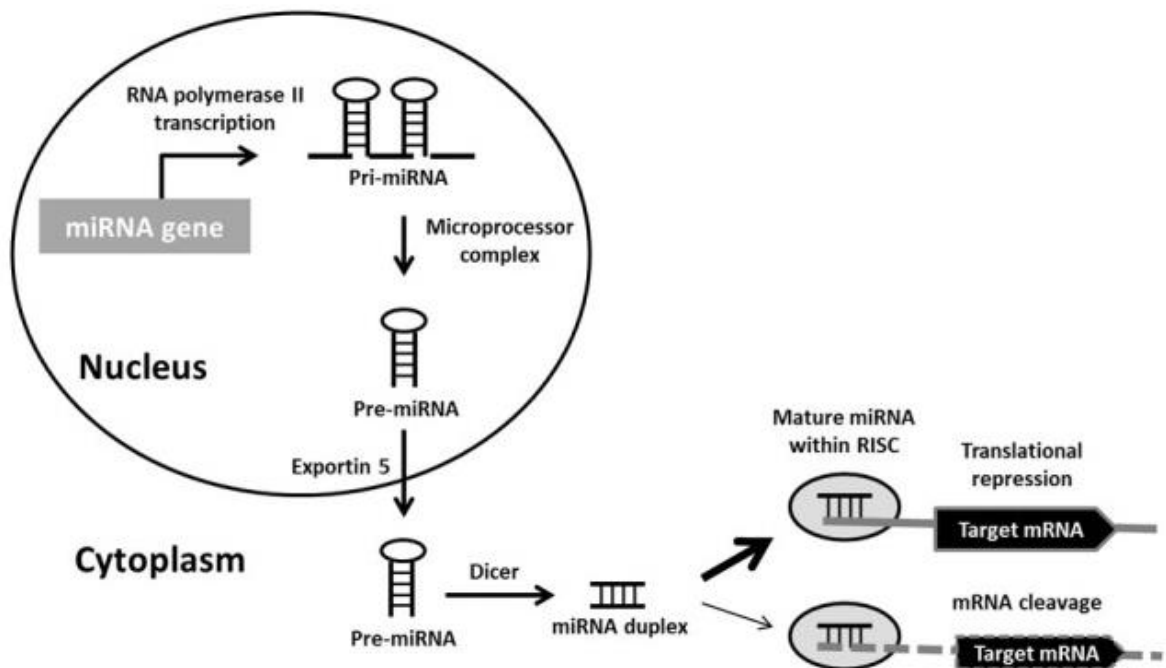


Figura 4. Esquema representativo da biogênese dos microRNAs (Goodall *et al.*, 2013).

Os miRNAs não são apenas reconhecidos por reprimir a tradução, em determinadas condições podem também ativá-la (Vasudevan and Steitz, 2007). Alguns miRNAs foram relatados por ativar a tradução de mRNA (Vasudevan and Steitz, 2007; Ørom *et al.*, 2008). Por exemplo, células sob condições de privação de soro, o complexo AGO2-miR369-3 ligado ao 3'-UTR do mRNA do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) atua recrutando a proteína FXR1 (fragile X-related protein 1) estimulando a tradução (Vasudevan and Steitz, 2007).

Outros exemplos do efeito estimulador de miRNAs inclui a interação do miR-10a com a região 5'-UTR de mRNAs que codificam para proteínas ribossomais estimulando a tradução destes mRNAs em resposta ao estresse ou à escassez de nutrientes (Ørom *et al.*, 2008). Além disso, miRNAs podem interagir diretamente na região oligopirimidina 5' terminal (5'-TOP), um motif característico de mRNAs que codificam proteínas ribossomais e alguns fatores de tradução. Um outro exemplo, o miR-122, um miRNA específico do fígado, estimula a tradução do RNA do vírus da hepatite C (HCV) possivelmente por aumentar a leitura pelos ribossomos da região IRES (internal ribosome entry site) dos mRNAs (Henke *et al.*, 2008). Com base nestes resultados, o miR-122 tem sido relatado por atuar como acompanhante que modifica a estrutura do RNA facilitando o acesso dos ribossomos ao mRNA do HCV. No entanto, novos experimentos são necessários para compreender o motivo que o miR-122 aumenta a tradução ao se ligar ao HCV 5'-UTR, inibindo a tradução de mRNAs ao se ligar ao 3'-UTR (Jopling *et al.*, 2008).

Os miRNAs são expressos em muitas espécies, em uma grande variedade de tecidos, durante todas as fases de desenvolvimento. Até o momento, centenas de miRNAs foram identificados, cada um dos quais pode regular vários genes. Predições computacionais indicam que mais de um terço de todos os genes humanos podem ser alvos de miRNAs (Lewis *et al.*, 2005). Os miRNAs foram funcionalmente ligados ao desenvolvimento celular embrionário, proliferação, diferenciação, apoptose e respostas ao estresse.

1.6. Os microRNAs e a espermatogênese

Os miRNAs são altamente expressos nas células germinativas. Devido a função repressora pós-transcricional e as modificações na cromatina serem extremamente importantes durante a espermatogênese e os miRNAs serem altamente expresso nas células germinativas pré e pós meióticas (Ro *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2012), os miRNAs provavelmente desempenham um papel importante na função e no desenvolvimento testicular.

Além das funções específicas nas células germinativas, os miRNAs desempenham um papel igualmente importante no desenvolvimento das células de Sertoli: um estudo em camundongos knockout para Dicer, específica para células de Sertoli, durante os estágios embrionários (utilizando a linhagem AMH-cre de camundongos) resultou em disgenesia testicular devido a alteração na arquitetura das células de Sertoli logo no primeiro dia pós-

natal (Papaioannou *et al.*, 2009). No entanto, pouco se sabe sobre o papel dos miRNAs nas funções de células de Sertoli em animais adultos e em linhagens humanas dessas células.

1.7. Os microRNAs e os xenobióticos

Alguns dos processos celulares regulados pelos miRNAs são a apoptose, o crescimento celular, o armazenamento de gordura, a secreção de insulina e a iniciação e progressão do câncer (Grimm *et al.*, 2006; Tsuchiya *et al.*, 2006; Gaur *et al.*, 2007). Os miRNAs podem desempenhar um papel importante na resposta a xenobióticos químicos e suas consequências à saúde, causando doenças. FUKUSHIMA *et al.* (2007) demonstraram que a exposição de ratos à substâncias tóxicas ao fígado, tais como acetaminofeno ou o tetracloreto de carbono provocou alteração na expressão de vários miRNAs. Em outro estudo, o tamoxifeno, um hepatocarcinógeno potente, estava correlacionado com o aumento na expressão de miRNAs (miR-106a, and miR-34) associados a vários oncogenes (Pogribny *et al.*, 2007). Há relatos que demonstram que o tabagismo também pode causar mudanças no perfil de expressão de miRNAs como let-7, miR-10, miR-26, miR-30, miR-34, miR-99, miR-122, miR-123, miR-124, miR-125, miR-140, miR-145, miR-146, miR-191, miR-192, miR-219, miR-222, e o miR-223 (Izzotti *et al.*, 2009). Também tem sido demonstrado que mães fumantes podem apresentar alterações nos níveis de expressão de miRNAs relacionados com os processos de crescimento e desenvolvimento celular (Maccani *et al.*, 2010). Da mesma forma, outros agentes químicos, tais como o bisfenol A, também estão listados por causar alteração da expressão dos miRNAs *in vitro* (Avisar-Whiting *et al.*, 2010). Apesar de esses estudos sugerirem que os miRNAs podem regular a toxicidade mediada por substâncias químicas e do potencial papel dos miRNAs como moduladores de vias genéticas associadas à toxicidade ambiental, não há dados suficientes que elucidam o papel dos miRNAs sobre as células de Sertoli humanas e, em consequência, sobre os fatores regulatórios da espermatogênese humana após exposição a um agente tóxico.

1.8. 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD)

Um grupo conhecido de compostos tóxicos são as dioxinas, que são substâncias lipofílicas que resistem à degradação biológica e ambiental. Setenta e cinco congêneres de dioxinas e 135 congêneres de furano compõem a complexa mistura de dioxinas, dos quais 7 e

10 congêneres são, respectivamente, capazes de se ligar e ativar o receptor Aril hidrocarboneto (AhR). Dos 209 congêneres de bifenilos policlorados (PCB), doze têm o potencial de ativar o AhR (Van den Berg *et al.*, 2006) (**Figura 5**). Estudos em animais mostram que o TCDD é considerado o contaminante ambiental com maior toxicidade e, dessa forma, é também significativo para a saúde humana (Denison and Nagy, 2003; Schecter *et al.*, 2006).

O TCDD é introduzido no nosso ambiente em grande parte como um subproduto indesejado de processos industriais, como a incineração e a queima de combustíveis fósseis, embora as erupções vulcânicas e os incêndios florestais também contribuam para a carga ambiental global das dioxinas. Entre as populações humanas e animais, a ingestão de alimentos contaminados é a principal fonte de exposição à dioxina, especialmente os ricos em gordura, como leite, queijo, carne, peixe, fast foods e o leite materno (Harrad *et al.*, 2003; Pompa *et al.*, 2003; Schecter *et al.*, 2002; Malisch and Kotz, 2014). Infelizmente, estes compostos são resistentes à degradação química ou biológica e, portanto, exibem um grau significativo de bioacumulação e persistência ambiental (Birnbaum, 1994). No entanto, padrões de emissão mais rigorosos e redução da poluição nos países do primeiro mundo levaram a uma queda significativa na exposição ao TCDD em residentes nos Estados Unidos, Canadá, Alemanha e França nos últimos 30 anos. Estima-se que a carga corpórea de TCDD nos cidadãos nesses países seja de aproximadamente duas partes por trilhão de lipídios ajustados (ppt), abaixo do estimado 20 ppt no início dos anos 70 (Aylward and Hays, 2002). Em contrapartida, a emissão de TCDD e outros agonistas de AhR não está em declínio em muitos países em desenvolvimento, como consequência da queima incompleta de lixo, queima de lixo eletrônico e hábitos de cozimento *indoor*. Assim, os encargos corporais nos países menos desenvolvidos podem ser significativamente mais elevados do que os observados acima (Archibong *et al.*, 2012; Vanker *et al.*, 2015). É importante notar que padrões climáticos podem transportar contaminantes aéreos longe de seu local de origem (Ramos *et al.*, 2016), reduzindo a capacidade de qualquer nação de eliminar completamente esses tóxicos de seu ambiente. Além disso, o TCDD foi classificado como "curvas dose-resposta não-monotônicas", o que significa simplesmente que os efeitos de baixa dose não podem ser previstos por extrapolar os efeitos observados a uma dose elevada. O TCDD, não só têm impacto negativo em sistemas humanos e animais em doses elevadas, mas também pode ter efeitos igualmente prejudiciais, embora diferentes, em doses baixas (Bruner-Tran *et al.*, 2016).

O AhR é um receptor que participa de processos fisiológicos essenciais como crescimento celular, morte e diferenciação, sendo também um importante regulador de processos reprodutivos masculinos (Hansen *et al.*, 2013). Quando o AhR está inativo, ele se encontra no citoplasma ligado a chaperonas. No momento em que ocorre a interação com o ligante, no caso o TCDD, o receptor transloca-se para o núcleo, dissocia-se das chaperonas, e interage com o ARNT (translocador nuclear do receptor aril-hidrocarboneto). O complexo AhR-ARNT torna-se ativo e se liga ao DNA em elementos de resposta a xenobióticos (XRE), atuando, dessa forma, na regulação da expressão de vários genes e desencadeando, assim, uma resposta celular (Jackson and Mitchell, 2011). A maior parte dos genes alvo envolvidos na ligação AhR-ARNT, como por exemplo, Citocromo P450 1A1 (*CYP1A1*), *CYP1B1*, repressor do AHR (*AHRR*) (MacPherson *et al.*, 2014), possuem XRE na sua região reguladora, indicando que o composto ativado com AhR regula positivamente a expressão dos genes, por estarem diretamente ligados às sequências XRE (Mimura and Fujii-Kuriyama, 2003) (**Figura 5**).

O AHRR pertence ao extenso grupo das proteínas homólogas básicas helice-loop-helice para Per/Arnt/Sim (bHLH-PAS) e são evolutivamente conservadas (Puga *et al.*, 2002). Essa proteína inibe tanto a atividade de transcrição do AhR induzida pelos xenobióticos quanto a transcrição ativa nas diversas espécies. Mesmo o AhR e o AHRR sendo duas proteínas altamente divergentes, o AHRR compartilha uma alta identidade de aminoácidos com o AhR no terço N-terminal da proteína (~275 aa) contendo a base bHLH e domínio Per-ARNT-Sim “A” (PAS-A), desse modo, o AhR irá competir com seu repressor para formar um heterodímero com ARNT e se ligar ao XRE (Hahn *et al.*, 2009).

A expressão de AHRR é estudada em tecidos humanos e animais, bem como em várias linhagens celulares. Em tecido humano adulto, a expressão mais elevada do mRNA foi encontrada nos testículos, seguido do pulmão, ovário e do baço (Tsuchiya *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2004). Testículos de ratos também apresentam elevada expressão de AHRR (Korkalainen *et al.*, 2004), mas a razão para esta expressão testicular elevada não é conhecida. Curiosamente, a expressão constitutiva de *CYP1A1* é baixo nesse tecido e especula-se que os altos níveis de expressão de AHRR protegem este delicado tecido contra os metabólitos tóxicos gerados por *CYP1A1* através de supressão de transcrição constitutiva de *CYP1A1* (Yamamoto *et al.*, 2004).

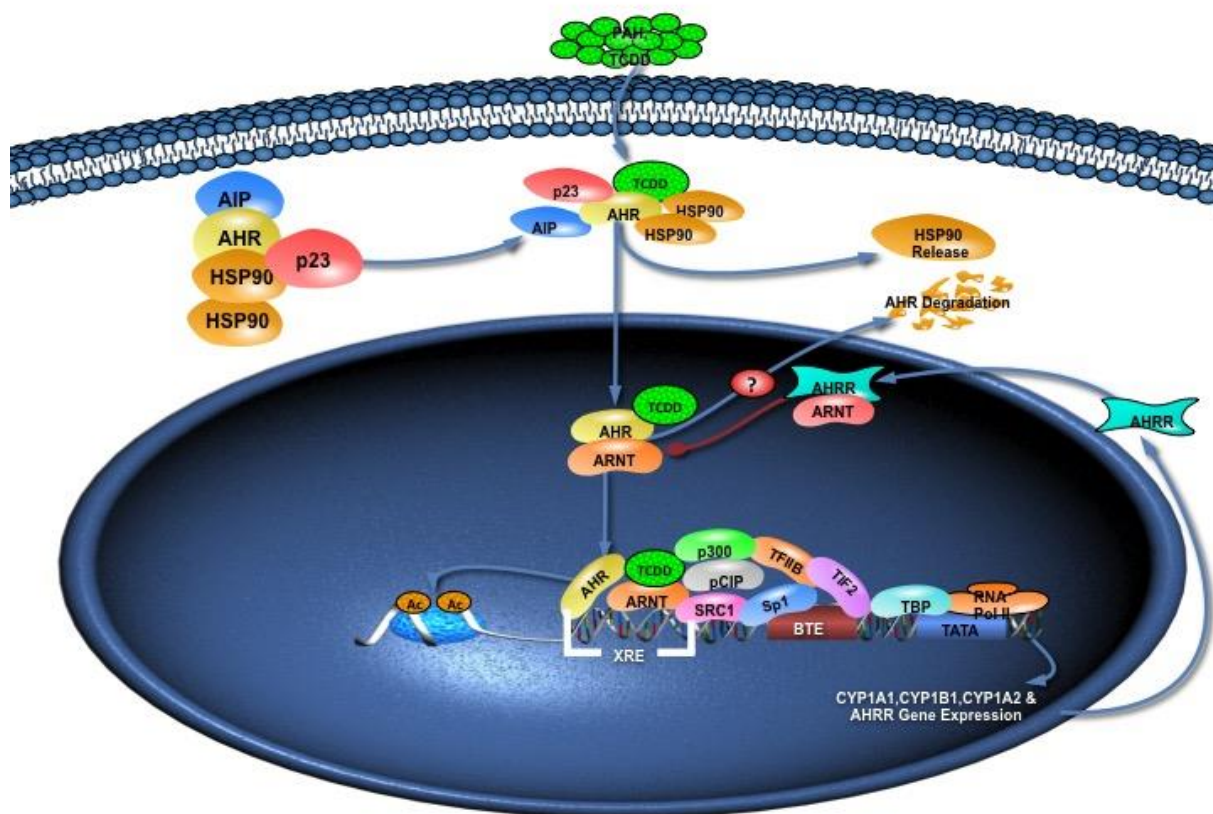


Figura 5. via do AhR e sob ação do TCDD (Gen Globe, QIagen- EUA). Disponível em: <http://tinyurl.com/nsvvsw3>.

O TCDD é um contaminante ambiental que tem um amplo espectro de efeitos tóxicos, incluindo a indução de grave perda de peso, exercendo fetotoxicidade e teratogenicidade (Couture *et al.*, 1990). Wolf e colaboradores (1999) relataram que a administração de baixas concentrações do TCDD, durante a gestação de camundongos, altera o desenvolvimento reprodutivo fetal. Nas fêmeas, ocasiona diminuição do peso uterino e da fertilidade e, no macho, reduz a contagem espermática tanto no ejaculado como no epidídimo, além de atrasar a puberdade (Wolf *et al.*, 1999b, 1999a). Mably e colaboradores (1992) relataram que a contagem de espermatozoides no epidídimo foi significativamente menor, em ratos, após uma única exposição de 0,064 mg TCDD/kg no décimo quinto dia gestacional (Mably *et al.*, 1992). Semelhanças na espermatogênese de ratos e seres humanos contribuíram para que a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabelecesse uma concentração diária tolerável para o TCDD de 2pg/kg (Mably *et al.*, 1992).

Em relação a dados epidemiológicos humanos, em 1976, uma fábrica química em Seveso (Itália), lançou acidentalmente uma nuvem tóxica contendo TCDD. Na descendência de homens expostos ao TCDD, a razão dos nascimentos menino/menina foi diminuída. Em homens adultos que tinham sido expostos ao TCDD em Seveso, quando crianças ou na fase gestacional ou durante o período de lactação, apresentaram redução na concentração e na motilidade dos espermatozoides e nas concentrações circulantes de estradiol (E2), hormônio folículo-estimulante (FSH) e inibina B. Estes achados, em conjunto, mostram que o TCDD afeta particularmente os órgãos reprodutivos (Somm *et al.*, 2013).

Singh e colaboradores (2012) em um recente estudo, demonstraram que a exposição de ratos a agentes tóxicos ambientais, tais como o TCDD, durante a prenhez, pode ter um efeito significativo sobre o perfil de miRNAs no timo fetal e, assim, influenciar a regulação de um grande número de genes que podem afetar o desenvolvimento do sistema imunológico (Singh *et al.*, 2012).

Há escassez de dados para elucidar o papel do sncRNAs e mRNAs em células de Sertoli humanas e, conseqüentemente, sobre os fatores de regulação da espermatogênese. Assim, a identificação de sncRNAs como alvos para o TCDD, induzida pela modulação da expressão gênica, oferece um novo caminho para compreender os mecanismos de toxicidade no sistema genital masculino.

6. CONCLUSÕES

Os dados apresentados acima fornecem uma análise abrangente das alterações nas células de Sertoli humanas após exposição crônica ao TCDD. Este é um dos poucos estudos realizados em células não tumorais humanas primárias expostas ao TCDD, além de ser uma importante contribuição para a compreensão da resposta humana a esse agente tóxico em uma célula crucial do sistema genital masculino. Os dados gerados permitiram a formulação de conclusões importantes sobre as células de Sertoli humanas *in vitro*, após 72 horas de exposição ao TCDD. Dentre elas que houve alteração na expressão de miRNAs, tRNAs, piRNAs e famílias matriz de sítios de ligação para fatores de transcrição, os quais elucidaram possíveis interações moleculares que podem ser responsáveis por alterações em vias celulares importantes para a homeostasia da célula de Sertoli e, por consequência, da espermatogênese. Dentre as vias que se mostraram alteradas, o repressor canônico da via do TCDD, o AHRR, não realizou o bloqueio da via nas células em questão devido a ação pós-transcricional do mir-106b-5p, ao mesmo tempo, o gene *TIPARP* seria o repressor por uma via alternativa por se apresentar super expresso. Além disso, os resultados permitiram concluir que existe um número reduzido de genes similares entre os mais expressos entre as células de Sertoli em humanos, ratos e camundongos; mostrando que podem existir similaridades e limitações ao se comparar as diferentes espécies.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Halima, M. *et al.* (2013) Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. *Fertil. Steril.*, **99**, 1249–1255.e16.
- Aly, H.A.A. and Khafagy, R.M. (2011) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced cytotoxicity accompanied by oxidative stress in rat Sertoli cells: Possible role of mitochondrial fractions of Sertoli cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **252**, 273–80.
- Amann, R.P. (2008) The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J. Androl.*, **29**, 469–87.
- Ambros, V. *et al.* (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, **9**, 277–9.
- Anders, G. *et al.* (2012) doRiNA: a database of RNA interactions in post-transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res.*, **40**, D180-6.
- Anders, S. *et al.* (2014) HTSeq A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *bioRxiv*, **31**, 2824.
- Anders, S. and Huber, W. (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.*, **11**, R106.
- Archibong, A.E. *et al.* (2012) Endocrine disruptive actions of inhaled benzo(a)pyrene on ovarian function and fetal survival in fisher F-344 adult rats. *Reprod. Toxicol.*, **34**, 635–643.
- Avissar-Whiting, M. *et al.* (2010) Bisphenol A exposure leads to specific microRNA alterations in placental cells. *Reprod. Toxicol.*, **29**, 401–6.
- Aylward, L.L. and Hays, S.M. (2002) Temporal trends in human TCDD body burden: decreases over three decades and implications for exposure levels. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.*, **12**, 319–28.
- Becker, C. *et al.* (2010) mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*, **50**, 237–43.
- Berezikov, E. *et al.* (2007) Mammalian mirtron genes. *Mol. Cell*, **28**, 328–36.

- Van den Berg, M. *et al.* (2006) The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol. Sci.*, **93**, 223–41.
- Betel, D. *et al.* (2008) The microRNA.org resource: Targets and expression. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 149–153.
- Birnbaum, L.S. (1994) Endocrine effects of prenatal exposure to PCBs, dioxins, and other xenobiotics: implications for policy and future research. *Environ. Health Perspect.*, **102**, 676–9.
- Bohnsack, M.T. *et al.* (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, **10**, 185–91.
- Boivin, J. *et al.* (2007) International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum. Reprod.*, **22**, 1506–12.
- Bruner-Tran, K.L. *et al.* (2016) Exposure to the environmental endocrine disruptor TCDD and human reproductive dysfunction: Translating lessons from murine models. *Reprod. Toxicol.*
- Cai, X. *et al.* (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, **10**, 1957–66.
- Chang, Y.-F. *et al.* (2012) Interaction between microRNAs and actin-associated protein Arpc5 regulates translational suppression during male germ cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 5750–5.
- Chen, S.R. and Liu, Y.X. (2015) Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. *Reproduction*, **149**, R159–R167.
- Chen, Z.-H. *et al.* (2004) Resveratrol inhibits TCDD-induced expression of CYP1A1 and CYP1B1 and catechol estrogen-mediated oxidative DNA damage in cultured human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis*, **25**, 2005–13.
- Cheng, J. *et al.* (2011) PiRNA, the new non-coding RNA, is aberrantly expressed in human cancer cells. *Clin. Chim. Acta*, **412**, 1621–1625.
- Couture, L.A. *et al.* (1990) A critical review of the developmental toxicity and teratogenicity

- of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: recent advances toward understanding the mechanism. *Teratology*, **42**, 619–27.
- Croxford, T.P. *et al.* (2011) Moderate zinc deficiency reduces testicular Zip6 and Zip10 abundance and impairs spermatogenesis in mice. *J. Nutr.*, **141**, 359–65.
- Denison, M.S. and Nagy, S.R. (2003) Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **43**, 309–34.
- Denli, A.M. *et al.* (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, **432**, 231–5.
- Dweep, H. *et al.* (2011a) miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by 'walking' the genes of three genomes. *J. Biomed. Inform.*, **44**, 839–47.
- Dweep, H. *et al.* (2011b) miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by 'walking' the genes of three genomes. *J. Biomed. Inform.*, **44**, 839–47.
- Ehmcke, J. and Schlatt, S. (2006) A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. *Reproduction*, **132**, 673–80.
- Fukushima, T. *et al.* (2007) Changes of micro-RNA expression in rat liver treated by acetaminophen or carbon tetrachloride--regulating role of micro-RNA for RNA expression. *J. Toxicol. Sci.*, **32**, 401–9.
- Gaur, A. *et al.* (2007) Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res.*, **67**, 2456–68.
- Ghildiyal, M. and Zamore, P.D. (2009) Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.*, **10**, 94–108.
- Goodall, E.F. *et al.* (2013) Neuronal dark matter: the emerging role of microRNAs in neurodegeneration. *Front. Cell. Neurosci.*, **7**, 178.
- Gregory, R.I. *et al.* (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, **432**, 235–40.
- Grimm, D. *et al.* (2006) Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*, **441**, 537–41.

- Griswold, M.D. (1998) The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **9**, 411–6.
- Hahn, M.E. *et al.* (2009) Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: Complex interactions involving the AHR repressor. *Biochem. Pharmacol.*, **77**, 485–497.
- Han, J. *et al.* (2006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, **125**, 887–901.
- Han, J. *et al.* (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.*, **18**, 3016–27.
- Hansen, D. a *et al.* (2013) The Aryl Hydrocarbon Receptor Is Important for Proper Seminiferous Tubule Architecture and Sperm Development in Mice. *Biol. Reprod.*
- Harrad, S. *et al.* (2003) Human dietary intake and excretion of dioxin-like compounds. *J. Environ. Monit.*, **5**, 224–8.
- Henke, J.I. *et al.* (2008) microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J.*, **27**.
- Hess, R.A. and Renato de Franca, L. (2008) Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **636**, 1–15.
- Houlahan, K.E. *et al.* (2015) Transcriptional profiling of rat hypothalamus response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-??-dioxin. *Toxicology*, **328**, 93–101.
- Houwing, S. *et al.* (2007) A Role for Piwi and piRNAs in Germ Cell Maintenance and Transposon Silencing in Zebrafish. *Cell*, **129**, 69–82.
- Hutvagner, G. *et al.* (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, **293**, 834–8.
- Izzotti, A. *et al.* (2009) Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke. *FASEB J.*, **23**, 806–12.
- Jackson, D.P. and Mitchell, K.A. (2011) Ah Receptor – Mediated Suppression of Liver Regeneration through NC- XRE – Driven p21 Cip1 Expression.
- Jin, M.H. *et al.* (2008) Enhanced TGF-beta1 is involved in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-

- dioxin (TCDD) induced oxidative stress in C57BL/6 mouse testis. *Toxicol. Lett.*, **178**, 202–9.
- Jodar, M. *et al.* (2015) Absence of sperm RNA elements correlates with idiopathic male infertility. *Sci. Transl. Med.*, **7**, 295re6-295re6.
- Johnston, D.S. *et al.* (2008) Stage-specific gene expression is a fundamental characteristic of rat spermatogenic cells and Sertoli cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 8315–20.
- Jopling, C.L. *et al.* (2008) Position-dependent Function for a Tandem MicroRNA miR-122 Binding Site Located in the Hepatitis C Virus RNA Genome. *Cell Host Microbe.*, **4**, 77–85.
- Junqueira, L.C.; Carneiro, J. (2013) Basic Histology: Text and Atlas 12a ed. Nova Iorque:McGraw-Hill.
- Kamel, R.M. (2010) Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **8**, 21.
- Kaur, H. *et al.* (2013) Next-generation sequencing: a powerful tool for the discovery of molecular markers in breast ductal carcinoma in situ. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **13**, 151–65.
- Kent, W.J. *et al.* (2002) The human genome browser at UCSC. *Genome Res.*, **12**, 996–1006.
- Kim, D. *et al.* (2015) HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods*, **12**, 357–60.
- Kim, V.N. *et al.* (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 126–39.
- Kim, V.N. (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 376–85.
- Kopera, I. a *et al.* (2010) Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **365**, 1593–605.
- Korkalainen, M. *et al.* (2004) Primary structure and inducibility by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) of aryl hydrocarbon receptor repressor in a TCDD-sensitive and a TCDD-resistant rat strain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 123–

31.

- Krawetz, S.A. *et al.* (2011) A survey of small RNAs in human sperm. *Hum. Reprod.*, **26**, 3401–12.
- Krawetz, S.A. (2005) Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat. Rev. Genet.*, **6**, 633–42.
- Lai, K.P. *et al.* (2005) Effects of TCDD in modulating the expression of Sertoli cell secretory products and markers for cell-cell interaction. *Toxicology*, **206**, 111–23.
- Landthaler, M. *et al.* (2004) The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr. Biol.*, **14**, 2162–7.
- Langmead, B. *et al.* (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.*, **10**, R25.
- Lee, E.J. *et al.* (2011) Identification of piRNAs in the central nervous system. *RNA*, **17**, 1090–9.
- Lee, Y. *et al.* (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.*, **23**, 4051–60.
- Lee, Y. *et al.* (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, **425**, 415–9.
- Lee, Y.S. and Dutta, A. (2009) MicroRNAs in cancer. *Annu. Rev. Pathol.*, **4**, 199–227.
- Levy, S. and Hannenhalli, S. (2002) Identification of transcription factor binding sites in the human genome sequence. *Mamm. Genome*, **13**, 510–4.
- Lewis, B.P. *et al.* (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, **120**, 15–20.
- Li, B. and Dewey, C.N. (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, **12**, 323.
- Lian, J. *et al.* (2009) Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **7**, 13.
- Lim, L.P. *et al.* (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large

- numbers of target mRNAs. *Nature*, **433**, 769–73.
- Lin, P.-H. *et al.* (2007) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces oxidative stress, DNA strand breaks, and poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation in human breast carcinoma cell lines. *Toxicol. Lett.*, **172**, 146–58.
- Lu, Y. *et al.* (2010) Identification of piRNAs in HeLa cells by massive parallel sequencing. *BMB Rep.*, **43**, 635–41.
- Lund, E. *et al.* (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, **303**, 95–8.
- Ma, Q. *et al.* (2001) TCDD-Inducible Poly(ADP-ribose) Polymerase: A Novel Response to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**, 499–506.
- Ma, Y. *et al.* (2015) Testosterone regulates the autophagic clearance of androgen binding protein in rat Sertoli cells. *Sci. Rep.*, **5**, 8894.
- Mably, T.A. *et al.* (1992) In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 3. Effects on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **114**, 118–26.
- Maccani, M.A. *et al.* (2010) Maternal cigarette smoking during pregnancy is associated with downregulation of miR-16, miR-21, and miR-146a in the placenta. *Epigenetics*, **5**, 583–9.
- MacPherson, L. *et al.* (2013) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin poly(ADP-ribose) polymerase (TiPARP, ARTD14) is a mono-ADP-ribosyltransferase and repressor of aryl hydrocarbon receptor transactivation. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 1604–21.
- MacPherson, L. *et al.* (2014) Aryl hydrocarbon receptor repressor and TiPARP (ARTD14) use similar, but also distinct mechanisms to repress aryl hydrocarbon receptor signaling. *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 7939–7957.
- Malisch, R. and Kotz, A. (2014) Dioxins and PCBs in feed and food--review from European perspective. *Sci. Total Environ.*, **491–492**, 2–10.
- Mao, S. *et al.* (2014) A comparison of sperm RNA-seq methods. *Syst. Biol. Reprod. Med.*, **60**, 308–15.
- McAninch, J. W.; Tanagha, E.A. (2010) *Urologia Geral de Smith 17th ed.* Lange (ed).

- Mimura, J. and Fujii-Kuriyama, Y. (2003) Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta*, **1619**, 263–8.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55–63.
- Mruk, D.D. and Cheng, C.Y. (2004) Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr. Rev.*, **25**, 747–806.
- Okamura, K. *et al.* (2007) The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, **130**, 89–100.
- Ørom, U.A. *et al.* (2008) MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. *Mol. Cell*, **30**, 460–471.
- Papaioannou, M.D. *et al.* (2009) Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. *Dev. Biol.*, **326**, 250–9.
- Pogribny, I.P. *et al.* (2007) Induction of microRNAome deregulation in rat liver by long-term tamoxifen exposure. *Mutat. Res.*, **619**, 30–7.
- Pompa, G. *et al.* (2003) Dioxin and PCB contamination of fish and shellfish: assessment of human exposure. Review of the international situation. *Vet. Res. Commun.*, **27 Suppl 1**, 159–67.
- Puga, A. *et al.* (2002) Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Toxicology*, **181–182**, 171–7.
- Ramos, Y. *et al.* (2016) Spatio-temporal models to estimate daily concentrations of fine particulate matter in Montreal: Kriging with external drift and inverse distance-weighted approaches. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.*, **26**, 405–14.
- Rand, T.A. *et al.* (2005) Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, **123**, 621–9.
- Ro, S. *et al.* (2007) Cloning and expression profiling of testis-expressed microRNAs. *Dev. Biol.*, **311**, 592–602.
- Robaire, B. (2003) Advancing towards a male contraceptive: a novel approach from an

- unexpected direction. *Trends Pharmacol. Sci.*, **24**, 326–8.
- Robinson, M.D. *et al.* (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, **26**, 139–40.
- Robinson, M.D. and Oshlack, A. (2010) A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.*, **11**, R25.
- Roeder, R.G. (1996) The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 327–335.
- Ruby, J.G. *et al.* (2007) Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, **448**, 83–6.
- Samplaski, M.K. *et al.* (2010) New generation of diagnostic tests for infertility: review of specialized semen tests. *Int. J. Urol.*, **17**, 839–47.
- Sandström, B. (1966) Liver parenchymal cells in tissue culture. A morphological study on foetal rat and chicken liver cells. *Acta Soc. Med. Ups.*, **71**, 21–34.
- Santemma, V. *et al.* (1992) Human Sertoli cells in vitro: morphological features and androgen-binding protein secretion. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **43**, 423–9.
- Schechter, A. *et al.* (2002) Characterization of dioxin exposure in firefighters, residents, and chemical workers in the Irkutsk Region of Russian Siberia. *Chemosphere*, **47**, 147–56.
- Schechter, A. *et al.* (2006) Dioxins: an overview. *Environ. Res.*, **101**, 419–28.
- Schlatt, S. and Ehmcke, J. (2014) Regulation of spermatogenesis: an evolutionary biologist's perspective. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **29**, 2–16.
- Sen, G.L. and Blau, H.M. (2005) Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat. Cell Biol.*, **7**, 633–6.
- Singh, N.P. *et al.* (2012) Prenatal exposure to TCDD triggers significant modulation of microRNA expression profile in the thymus that affects consequent gene expression. *PLoS One*, **7**, e45054.
- Skinner, M.K. (2005) Sertoli cell secreted regulatory factors. In, Skinner, Michael K, Griswold, M.D. (ed), *Sertoli Cell Biology*. Elsevier Ltd, San Diego, pp. 107–120.

- Somm, E. *et al.* (2013) Effect of developmental dioxin exposure on methylation and expression of specific imprinted genes in mice. *Reprod. Toxicol.*, **35**, 150–5.
- Thomson, T. and Lin, H. (2009) The Biogenesis and Function PIWI Proteins and piRNAs: Progress and Prospect.
- Tian, J. *et al.* (2015) The Aryl Hydrocarbon Receptor: A Key Bridging Molecule of External and Internal Chemical Signals. *Environ. Sci. Technol.*, **49**, 9518–31.
- Tsuchiya, Y. *et al.* (2003) Expression of aryl hydrocarbon receptor repressor in normal human tissues and inducibility by polycyclic aromatic hydrocarbons in human tumor-derived cell lines. *Toxicol. Sci.*, **72**, 253–9.
- Tsuchiya, Y. *et al.* (2006) MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1. *Cancer Res.*, **66**, 9090–8.
- Vanker, A. *et al.* (2015) Home environment and indoor air pollution exposure in an African birth cohort study. *Sci. Total Environ.*, **536**, 362–367.
- Vasudevan, S. and Steitz, J.A. (2007) AU-Rich-Element-Mediated Upregulation of Translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*, **128**, 1105–1118.
- Walker, W.H. and Cheng, J. (2005) FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*, **130**, 15–28.
- Weber, J.E. *et al.* (1983) Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli--Sertoli and Sertoli--germ-cell relationships. *Am. J. Anat.*, **167**, 163–79.
- Wolf, C.J. *et al.* (1999a) Gestational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) severely alters reproductive function of female hamster offspring. *Toxicol. Sci.*, **51**, 259–264.
- Wolf, C.J. *et al.* (1999b) Gestational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) severely alters reproductive function of female hamster offspring. *Toxicol. Sci.*, **51**, 259–64.
- Wu, Q. *et al.* (2004) Exposure of mouse preimplantation embryos to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters the methylation status of imprinted genes

- H19 and Igf2. *Biol. Reprod.*, **70**, 1790–7.
- Wu, W. *et al.* (2010) Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant promoter methylation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *PLoS One*, **5**, e13884.
- Xiao, X. *et al.* (2014) Environmental toxicants perturb human Sertoli cell adhesive function via changes in F-actin organization mediated by actin regulatory proteins. *Hum. Reprod.*, **0**, 1–13.
- Yamamoto, J. *et al.* (2004) Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: organ-specific distribution and variable induction patterns in mononuclear cells. *Life Sci.*, **74**, 1039–49.
- Yeung, K.Y. and Ruzzo, W.L. (2001) Principal component analysis for clustering gene expression data. *Bioinformatics*, **17**, 763–74.
- Yi, R. *et al.* (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.*, **17**, 3011–6.
- Zegers-Hochschild, F. *et al.* (2009) International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil. Steril.*, **92**, 1520–4.
- Zeng, Y. and Cullen, B.R. (2005) Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J. Biol. Chem.*, **280**, 27595–603.