



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
a) <i>Extração do RNA total</i>	22
b) <i>Purificação do RNA mensageiro (mRNA), construção das bibliotecas, amplificação clonal dos clusters e sequenciamento de cDNA</i>	22
3.7. EXPRESSÃO DOS sncRNAs	23
a) <i>Sequenciamento de alta performance</i>	23
3.7. ANÁLISES DE SEQUENCIAMENTO	23
a) <i>Dados de mRNA-Seq</i>	23
b) <i>Dados de sncRNA seq</i>	25
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**).

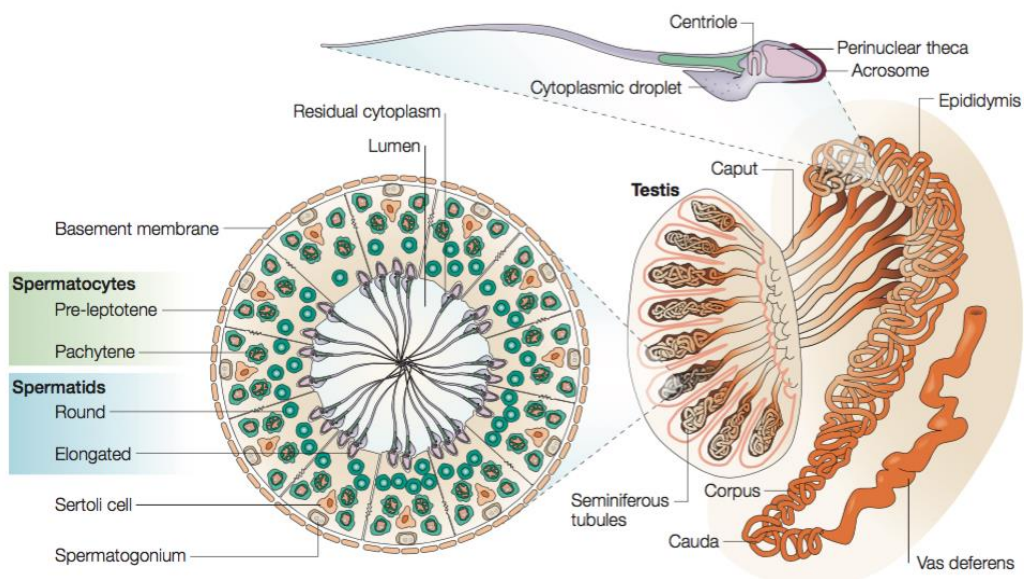


Figura 1. Túbulos Seminíferos: figura esquemática que representa um corte sagital testicular e um túbulo seminífero mostrando células de vários estágios da espermatogênese (painel da esquerda). E o testículo formado por um emaranhado de túbulos seminíferos, convergindo para a formação da rede testicular 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).

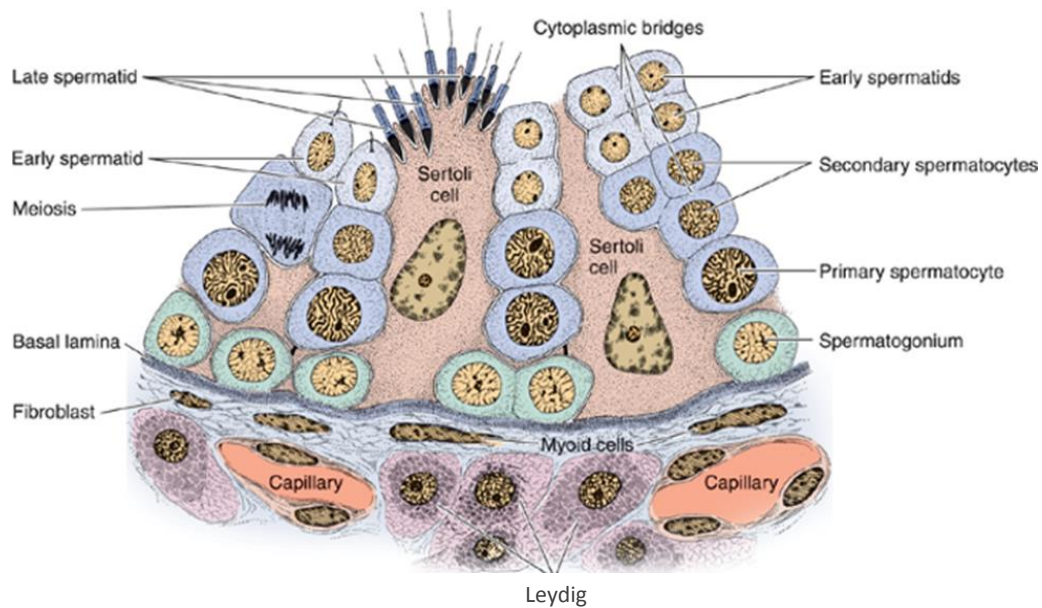


Figura 2. Secção sagital do epitélio seminífero com as células germinativas e células de Sertoli. As células de Sertoli têm uma grande superfície dividindo o epitélio germinativo em compartimento basal e adluminal. O compartimento basal contém espermatogônias na fase pré-leptoteno e o compartimento adluminal contém os espermatócitos, espermátides 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).

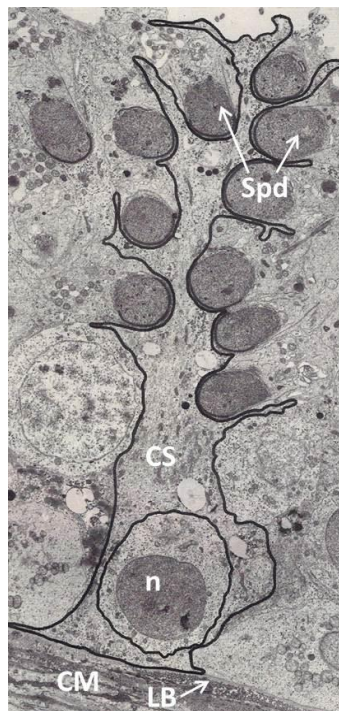


Figura 3. A célula de Sertoli (CS) estende-se desde a lâmina basal (LB) até a luz do epitélio germinativo, onde se observa, na porção apical, várias espermátides em diferenciação (Spd); núcleo da CS em destaque (n); células mióides (CM) sustentando o túbulo seminífero. Aumento: 3300X; modificado de SKINNER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

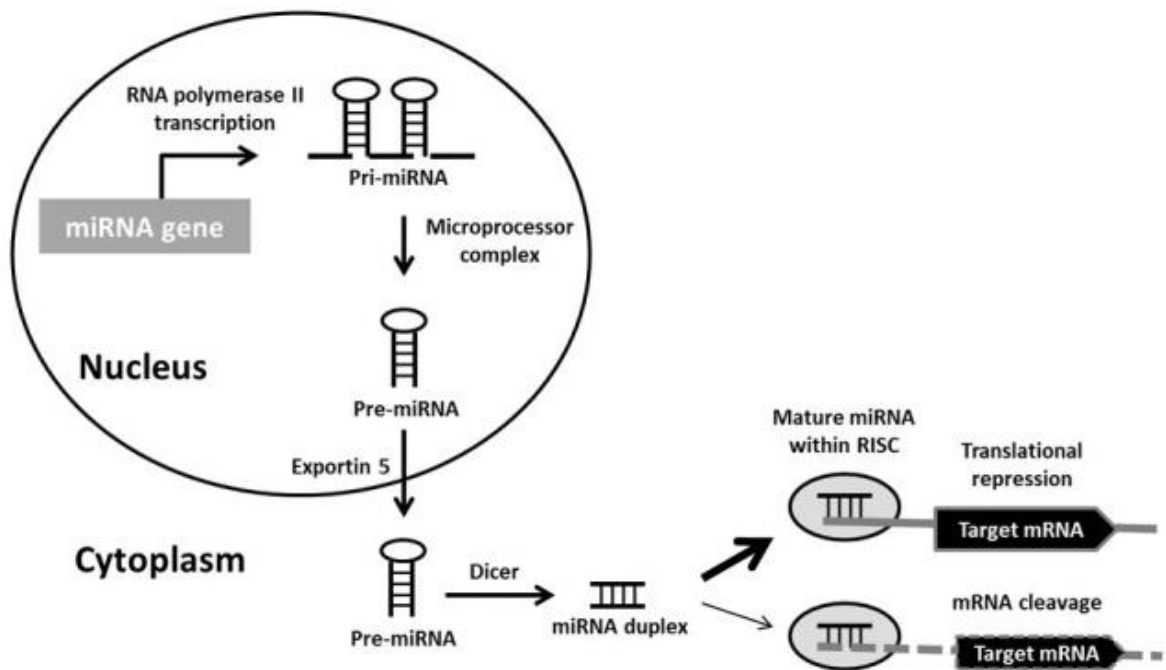


Figura 4. Esquema representativo da biogênese dos microRNAs (Goodall *et al.*, 2013).

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).

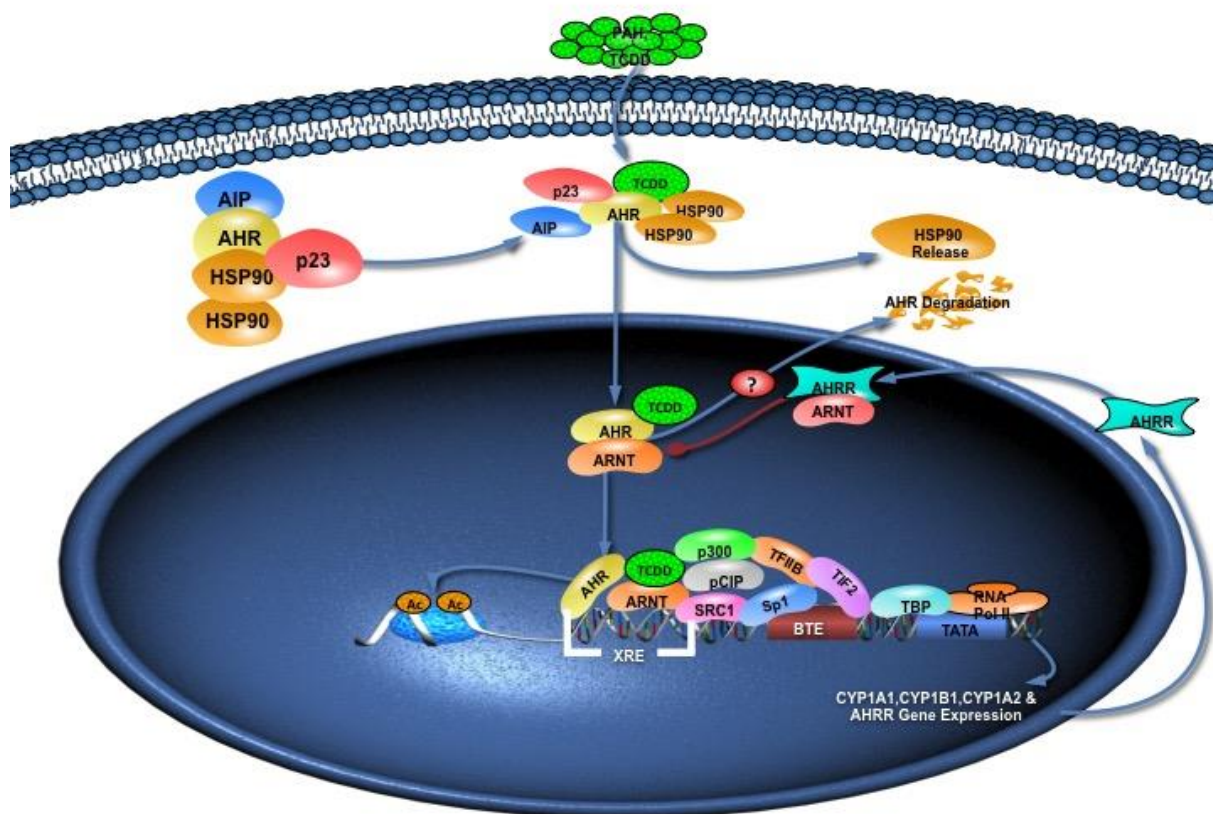


Figura 5. via do AhR e sob ação do TCDD (Gen Globe, QIagen- EUA). Disponível em: <http://tinyurl.com/nsvvsw3>.

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.

JUSTIFICATIVA

As células de Sertoli são células especializadas encontradas no epitélio seminífero e regulam a espermatogênese desde as etapas iniciais até a espermição, sendo diretamente responsáveis pela produção e qualidade espermática. Relatos científicos sobre fatores que influenciam a expressão de miRNAs nessas células ainda são escassos, principalmente no que tange os mecanismos de ação de substâncias tóxicas ambientais sobre o epitélio seminífero e, em consequência à espermatogênese. Estudos em espermatozoides humanos apontaram para alteração no perfil de expressão de alguns miRNAs em homens com diferentes graus de infertilidade, demonstrando com isso, relação entre essas alterações e a concentração espermática.

O TCDD é capaz de reduzir a contagem espermática tanto no ejaculado como no epidídimo, além de atrasar a puberdade em roedores. Além disso, evidências epidemiológicas demonstram que pela sua característica lipofílica, o TCDD encontra-se altamente disperso no meio ambiente, ameaçando a qualidade de vida da população em geral, gerando distúrbios reprodutivos, imunológicos e neuroendócrinos.

Dessa forma, estabelecer as relações entre agentes tóxicos ambientais de alta dispersão, modificações epigenéticas e as células de Sertoli são de extrema importância para elucidar mecanismos moleculares envolvidos no controle da espermatogênese.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo é avaliar as características do transcriptoma e microRNoma de células de Sertoli humanas *in vitro* antes e após a exposição ao TCDD .

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do presente estudo são analisar nas células de Sertoli humanas *in vitro* expostas ao TCDD:

- o perfil de expressão global dos microRNAs;
- o perfil de expressão global dos transcritos do mRNA (transcriptoma);
- a influência do TCDD sobre o perfil do transcriptoma e microRNoma;
- selecionar os alvos gênicos dos miRNAs diferencialmente expressos;
- dentre os alvos, determinar os mais importantes para a função das células de Sertoli;
- identificar vias moleculares alteradas relacionadas com a espermatogênese;
- comparar o transcriptoma das células de Sertoli humana, de ratos e camundongos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo celular

As células de Sertoli humanas primárias (HSeC) foram adquiridas da empresa Lonza (Walkersville-MD, USA), descongeladas e cultivadas conforme descrito pelo fabricante no meio de cultura DMEM/F12 (LGC, Biotecnologia, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 1% de solução Antibiótico-Antimicótico (Gibco, ThermoFischer, USA) a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade na incubadora Forma modelo 3110 (Thermo Scientific). Após as células atingirem aproximadamente 80% de confluência, foi realizado o subcultivo para ampliar o número de células e consequentemente de alíquotas. Para o subcultivo, as células foram desprendidas da superfície do frasco com o auxílio de solução de tripsina/EDTA 0,25%. Um total de 15 criotubos contendo aproximadamente 5×10^5 células/mL, em solução contendo meio de cultura suplementado com 20% de FBS e 10% de DMSO cada, foi armazenado em nitrogênio líquido e deram suporte a todas as etapas do estudo proposto.

3.2. Teste de Micoplasma

Apesar de adquirirmos as células com o certificado de análises comprovando a ausência do microorganismo *Mycoplasma sp* (**Tabela 1**), decidimos realizar o teste de detecção antes e após o término do experimento para comprovar que não houve contaminação no decorrer da cultura celular.

Tabela 1. Especificações do Certificado de Análises da empresa Lonza certificando a ausência da bactéria *Mycoplasma sp* nas células HSeC (seta preta).

CERTIFICATE OF ANALYSIS			
Product Code:	MM-HSE-2305	Lot Number:	150909091
Product:	Human Sertoli Cells	Manufacture Date:	08-Sep-2009
TEST (Method)	SPECIFICATIONS		Results
	Min.	Max.	
Donor Screen Information:			
Cell Passage Frozen			2
Viability-Tryp.Blue Exclusion	>= 70%	***	92.00 %
Cell Count (cells/amp)	>= 500,000	***	624000
Total Population Doublings	>= 8	***	8
Seeding Efficiency	>=50%	***	60 %
Doubling Time (days)	2.0	5.0	4.7 Days
SOX9 (FACS)	70	100	98 %
GATA4 (FACS)	70	100	97 %
Sterility	Negative	Negative	Negative
→ Direct Plating (Mycoplasma)	***	***	Negative
Hoechst Stain Procedure	***	***	Negative
Virus Testing:			
HIV Test	***	***	Not detected
HBV Test	***	***	Not detected
HCV Test	***	***	Not detected

Para a avaliação, utilizamos o Venor™ GeM Mycoplasma Detection Kit, PCR-based (Sigma-Aldrich) e seguimos as recomendações do fabricante (**Figura 6**).

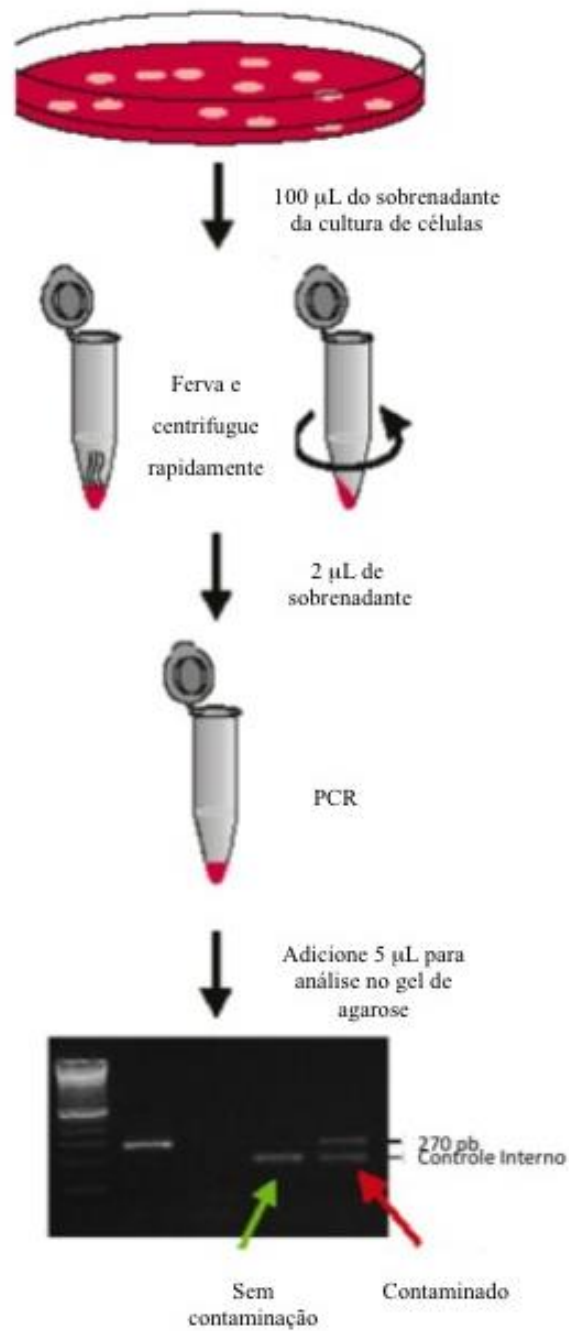


Figura 6. Esquema do protocolo de detecção do *Mycoplasma sp* pelo Venor™ GeM Mycoplasma Detection Kit, PCR-based (Sigma-Aldrich).

Optamos por realizar o teste de detecção antes da primeira passagem celular e logo após completarmos o número de garrafas suficientes para cumprir todas as etapas do experimento. Para isso, fizemos um *pull* das amostras e as avaliamos em duplicata no primeiro teste. Ao final do experimento, realizamos uma nova avaliação com um *pull* das amostras em triplicata.

3.3. Sobrevivência Celular

Para definir a concentração a ser utilizada de TCDD, na exposição das células de Sertoli, foi realizado o teste de sobrevivência celular. Entre os diferentes testes que podem ser utilizados na avaliação da citotoxicidade de um composto, destaca-se o ensaio MTT proposto por Mosmann em 1983 (Mosmann, 1983). O ensaio MTT é amplamente utilizado para determinar a citotoxicidade, viabilidade e proliferação de células vivas, após a exposição a substâncias tóxicas. Pode ser também utilizado para caracterização da toxicidade de novos fármacos (MOSMANN, 1983; BERRIDGE e TAN, 1993).

No ensaio de MTT, o sal de tetrazolium (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto em suas mitocôndrias pela ação da enzima succinato desidrogenase. O método envolve a conversão, pelas células, do MTT de coloração amarela em um composto formazan de coloração roxa. Após a adição de DMSO ou outro solvente apropriado, o produto é solubilizado, liberado e quantificado colorimetricamente, através de espectrofotometria tipo ELISA (VELLONEN *et al.*, 2004). No entanto, o mecanismo exato de redução do MTT ainda não foi esclarecido (BERNHARD *et al.*, 2003).

A capacidade das células em reduzirem o MTT fornece uma indicação da atividade e da integridade mitocondrial que são interpretadas como medidas da viabilidade celular. Ao contrário de outros ensaios de citotoxicidade, o ensaio do MTT apresenta algumas vantagens, como rapidez e precisão (MOSMANN, 1983).

O ensaio do MTT foi realizado, nas células HSeC, de acordo com o protocolo descrito por Mosmann (1983), com algumas modificações. As células foram semeadas em microplacas de 96 poços (aproximadamente 10.000 células por poço em 200 µL de meio completo). Estas foram expostas a 11 concentrações crescentes (0,3; 0,6; 1,3; 2,5; 5,0; 7,5; 10; 15; 20; 40 e 80 nM) do agente tóxico do estudo, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD),

por 6 e 72 horas a 37 °C. Após os tratamentos, o meio foi aspirado e as células foram incubadas com solução de MTT (0,5 mg/mL de meio de cultura) por 4 horas a 37 °C. Ao final deste período, a mistura da reação foi cuidadosamente aspirada e foram acrescentados em cada poço 200 µL de DMSO. Após 10 minutos, a análise foi feita em espectrofotômetro de leitor de placas (leitor Elisa) a 550 nm.

Controles positivos e negativos foram conduzidos em condições idênticas e foram utilizados como parâmetro.

3.4. Exposição das células ao TCDD

As células de Sertoli, em crescimento exponencial, foram desprendidas da superfície do frasco e ressuspensas em meio completo, contadas em câmara de Makler, devido ao tamanho celular, pelo método azul de Tripán (Merck, Darmstadt, Alemanha) (Sandström, 1966). Após a contagem, elas foram semeadas em garrafas de cultura celular com volume de 25 cm³. Utilizou-se uma densidade celular de aproximadamente 600.000 por garrafa. As garrafas foram mantidas em incubadora por 48h para permitir a adesão e crescimento celular apropriado. Após este período, o meio de cultura foi removido e as células foram expostas ao TCDD (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA); numa diluição em meio de cultura e DMSO, como veículo a 0,05%; atingindo uma concentração de 10 nM do agente tóxico.

A exposição ao TCDD foi realizada com 10 réplicas biológicas das células de Sertoli expostas por 72h a 10 nM (+0,05%DMSO) e 5 réplicas biológicas nas mesmas condições experimentais para o grupo controle (0,05% DMSO). A fim de diminuir a variabilidade normal que ocorrem entre réplicas biológicas, até mesmo em células em cultura, optamos por realizar RT-qPCR com os genes marcadores que fazem parte da via do TCDD (*AHR* e *AHRR*) e um gene marcador de estresse oxidativo (*SOD2*) para escolher as amostras com maior similaridade. Do total de amostras testadas, três foram escolhidas do grupo controle e 3 do grupo exposto ao TCDD.

3.5. Atividade de Enzimas Antioxidantes

Para a avaliação do estresse oxidativo, foi realizado experimento para quantificar a

atividade das principais enzimas antioxidantes por colorimetria: catalase, glutationala peroxidase e superóxido dismutase.

A extração proteica foi realizada com tampão RIPA (©EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), 1 mL para $\sim 5 \times 10^6$ células, adicionado ao coquetel inibidor de proteases (Sigma®, USA). As células foram transferidas para um tubo do tipo eppendorf e mantidas no gelo por 5 minutos. Em seguida, as células foram homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos, a 4 °C e o sobrenadante foi coletado. A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford em placas de ELISA de 96 poços e leitura em leitor de placas.

O ensaio para atividade da Glutationala Peroxidase (GSH-Px, GPx, EC1.11.1.9) foi realizado utilizando tampão fosfato 0.15 M, pH 7,0, contendo EDTA 5 mM, 0,1 mL de 0,0084 M de NADPH, 4 ug de GSSG-redutase, 1.125 M de azida de sódio, e 0.15 M glutationala forma reduzida (GSH), num volume total de 0,3 ml. A atividade da Superóxido Dismutase (SOD, EC1.15.1.1) foi determinada com base na sua capacidade para inibir a redução de nitrozul de tetrazólio, num meio contendo 50 mM de tampão de fosfato de pH 7,4, EDTA 0.1 mM, 50 uM de nitrozul de tetrazólio, 78 μ M de NADH, e 3,3 μ M metossulfato de fenazina. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína necessária para diminuir a taxa de referência para 50% de inibição máxima. A atividade da Catalase (CAT, E.C.1.11.1.6.) foi avaliada utilizando 50 mM de tampão fosfato, pH 7,0, com peróxido de hidrogênio a 10 mM. Uma unidade de catalase foi definida como a quantidade de enzima necessária para degradar um μ mol de H₂O₂ durante 60 s, a 240 nm. A atividade da enzima foi analisada a 25 °C utilizando leitor de microplacas (μ Quant MQX-200 com software KC Júnior, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA). Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste Mann-Whitney. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$.

3.6. Expressão gênica

a) Extração do RNA total

A extração do RNA foi realizada utilizando o reagente Trizol (Ambion, USA) com 1% de β -Mercaptoetanol (para uma proteção adicional das células contra a ação de nucleases e também para a redução de ligações S-S, ajudando a purificar o DNA), seguindo as recomendações do protocolo do fabricante. A concentração do RNA foi determinada pelo NanoVue (GE Healthcare, USA) e a pureza do RNA avaliada pelas razões A260nm/A280nm e A260nm/A230nm (aceitável quando ambas as razões foram $> 1,8$). A qualidade do RNA foi obtida pelo número da integridade do RNA (*RNA Integrity Number*, RIN), a partir da análise dos RNAs ribossomais baseadas em microfluídos, utilizando-se o sistema 2100 Bioanalyzer (Agilent, EUA) (Becker *et al.*, 2010). Todas as amostras utilizadas obtiveram RIN >9.8 .

b) Purificação do RNA mensageiro (mRNA), construção das bibliotecas, amplificação clonal dos clusters e sequenciamento de cDNA

O sequenciamento de RNA (RNA-seq) foi realizado no Centro de Genômica Funcional da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) na Universidade de São Paulo (USP), campus de Piracicaba, coordenado pelo Dr. Luiz Lehmann Coutinho, utilizando a plataforma HiSeq 2500 (Illumina, EUA).

Uma alíquota de 500 ng não fracionada de RNA total foi utilizada para a construção das bibliotecas e posterior sequenciamento. Durante o preparo das bibliotecas, o Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Illumina, EUA) foi utilizado para a remoção do RNA ribossomal (rRNA). A purificação do RNA mensageiro e a construção das bibliotecas foram realizados a partir do RNA total por meio do TruSeq Stranded mRNA LT Sample Preparation Kit (Illumina), seguindo as especificações do fabricante. Em resumo, moléculas de mRNA com cauda de poli-A foram purificadas por meio de oligos poli-T associados a *beads* magnéticos. Após a purificação, o mRNA foi fragmentado utilizando cátions divalentes, sob elevada temperatura. Os fragmentos de RNA foram utilizados como molde para a síntese de cDNA pela ação da enzima transcriptase reversa e iniciadores randômicos. Em seguida, foi sintetizada a fita complementar do cDNA por meio da DNA Polimerase I e degradação do RNA molde pela

RNase H. Os fragmentos de cDNA tiveram a adição de uma única base adenina para posterior ligação dos adaptadores. Os produtos foram purificados e enriquecidos pela PCR. Por último, as amostras foram aplicadas no cBot (Illumina, EUA) para geração automatizada dos clusters (processo de amplificação clonal das bibliotecas de cDNA), para posterior sequenciamento. O sequenciamento foi realizado no HiSeq Sequencing System, utilizando a metodologia de sequenciamento por síntese com nucleotídeos modificados e marcados com químicas fluorescentes.

3.7. Expressão dos sncRNAs

a) Sequenciamento de alta performance

Uma alíquota de 500 ng de RNA total, não fracionada, foi também submetida à construção das bibliotecas e sequenciamento de sncRNAs no Centro de Genômica Funcional. A construção das bibliotecas dos sncRNAs foram realizadas utilizando o TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit (Illumina, EUA), seguindo o protocolo do fabricante.

3.7. Análises de sequenciamento

A análise e interpretação dos dados foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Stephen Krawetz do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e Centro de Medicina Molecular e Genética da Wayne State University, Detroit- MI, EUA. Ele é conhecido por seus trabalhos em estratégias de sequenciamento de alto desempenho em espermatozoides (Krawetz *et al.*, 2011; Kaur *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2014; Jodar *et al.*, 2015).

Os dados do Next Generation Sequencing (NGS) dos mRNAs e sncRNAs produziram um arquivo de formato FASTQ. Os arquivos bcl do sistema HiSeq foram importados para o BaseSpace.com para o processo de *demultiplexing* antes da análise (Illumina, EUA).

a) Dados de mRNA-Seq:

Para determinar os níveis de cada RNA, os *reads* do RNAseq foram mapeados contra o genoma humano de referência hg38 ("<http://www.encodegenes.org/>") utilizando o HiSat

(KIM; Langmead; SALZBERG, 2015). HiSat é a mais recente versão do programa para alinhamento TopHat2, que também mapeia junções de *splicing* de dados de RNA-Seq. HiSat também é capaz de relatar alinhamentos de *reads* divididos em junções de *splicing*. Este sistema utiliza um esquema de indexação com base no Método de Burrows-Wheeler e do índice Ferragina-Manzini (FM), empregando dois tipos de índices para o alinhamento: um índice FM de todo o genoma para ancorar cada alinhamento e vários índices FM locais para extensões muito rápidas destes alinhamentos (Kim *et al.*, 2015) (**Figura 7**).

a1) Nível de expressão gênica:

Os dados brutos foram calculados como TPM (*Transcripts Per Million Mapped*) de cada gene em cada amostra utilizando o RSEM (Li and Dewey, 2011). Genes com TPM zero em uma ou mais amostras foram excluídos da análise. Os dados filtrados foram transformados logaritmicamente e normalizados utilizando um método de normalização quantil pelo EBSeq (LENG *et al.*, 2015).

O DESeq2 (AMOR; HUBER; ANDERS, 2014) também foi utilizado para calcular a expressão gênica. DESeq2 estima a dependência de variância-média em dados de contagem a partir de ensaios de sequenciamento de alto rendimento e testes para expressão diferencial com base em um modelo usando a distribuição binomial negativa.

O Log 2 *Fold Change* (Log2 FC) entre os grupos expostos ao TCDD e controle foi calculado para cada par de genes. Genes diferencialmente expressos foram determinados ajustando $\text{Log}_2 \text{FC} < -0,41$ ou $> 0,26$ (False Discovery rate (FDR)- corrigido $p\text{-value} \leq 0.05$) na comparação entre os grupos experimentais

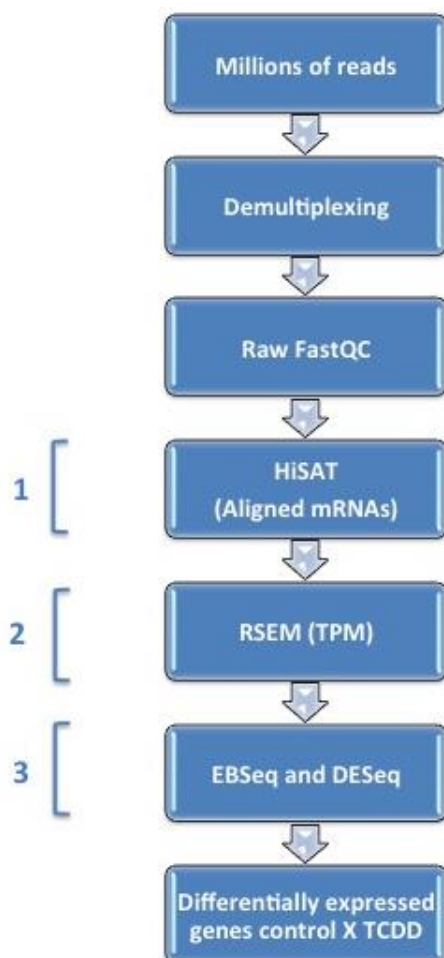


Figura 7. mRNA fluxograma: O esquema resume o fluxo de trabalho para o sequenciamento de mRNA. Os números à esquerda mostram etapas importantes da análise. 1- Alinhamento/Mapeamento; 2- Anotação; 3- Análise da expressão diferencial.

b) Dados de sncRNA seq

Todos os *reads* foram demultiplexados de acordo com as suas sequências índice utilizando CASAVA versão 1.8 (Illumina). Os *reads* que não passaram pelo filtro de pureza da Illumina foram removidos do conjunto de dados. Os *reads* do sequenciamento com boa qualidade foram submetidos à análise pelo *sRNAbench toolbox*. Resumidamente, *sRNAbench toolbox* é um conjunto de ferramentas independentes, mas interligadas para a expressão de perfis a partir de dados de sequenciamento de sncRNA de alto rendimento (RUEDA et al., 2015).

A análise dos dados incluiu a avaliação da qualidade dos *reads* pelo FastQC (ANDREWS, 2010) e a limpeza dos *reads* pelo CutAdapt (MARTIN, 2011). O alinhamento dos *reads* foi realizado contra o genoma humano de referência hg19 ("<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?hgsid=12832096&chromInfoPage=>") usando Bowtie1 (Langmead *et al.*, 2009), seguido por HT-Seq (Anders *et al.*, 2014) para anotação e quantificação das sequências alinhadas. Finalmente, as *tags* de sncRNA foram anotadas também utilizando a biblioteca RepeatMasker (Kent *et al.*, 2002) e os microRNAs e os tRNAs também foram avaliados (**Figura 8**).

b1) Nível de expressão dos sncRNAs

Os dados brutos foram calculados como a contagem média normalizada em cada amostra. A normalização de dados (Robinson and Oshlack, 2010) e a análise da expressão diferencial foram realizadas utilizando o edgeR v.30 (Bioconductor/R) (Robinson *et al.*, 2010), que implementa uma distribuição binomial negativa, para identificar miRNAs diferencialmente expressos (Anders and Huber, 2010). A contagem dos *reads* foi transformada logaritmicamente e normalizada por um método de normalização quantil. Para cada sncRNA, foi calculado *fold change* entre o grupo controle e TCDD. Os sncRNAs diferencialmente expressos foram determinados ajustando $\text{Log}_2 \text{FC} < -0,60$ ou $> 0,58$ com FDR corrigido valor de $p \leq 0,05$.

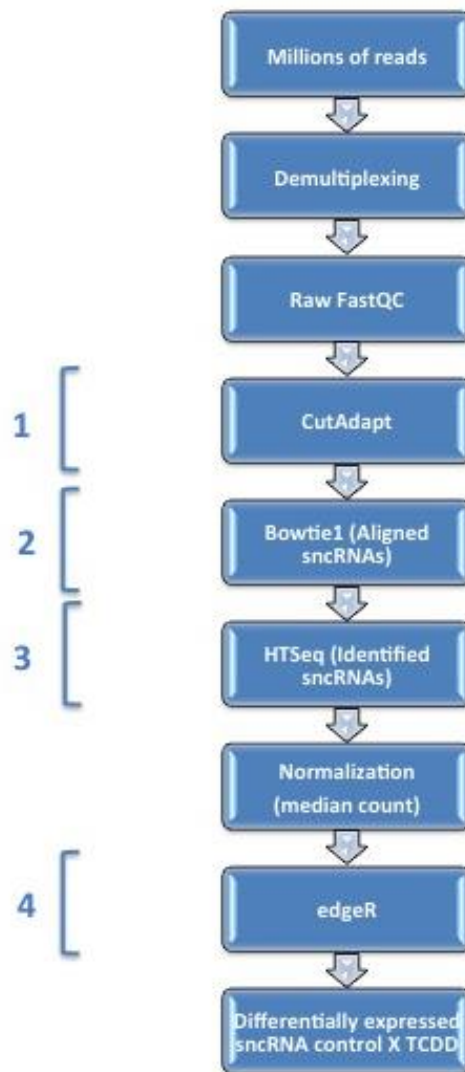


Figura 8. sncRNAs fluxograma: O esquema resume o fluxo de trabalho para o sequenciamento de sncRNA. Os números à esquerda mostram etapas importantes da análise: 1- Filtragem; 2- Alinhamento / Mapeamento; 3- Anotação; 4- Análise da expressão diferencial.

b2) Dados de piRNA seq

O Mapeamento das diferentes sequências de piRNAs contra o genoma humano hg19 foi realizado no BaseSpace, pelo programa *Small RNA* (Illumina, EUA). Este software oferece suporte para os dados recuperados a partir do TruSeq Small RNA Sample Preparation kit, supondo que as sequências de adaptadores já foram removidas. Este programa realiza o

alinhamento dos *reads* contra quatro bancos de dados de referência, e identifica os piRNAs diferencialmente expressos. Por este software, obtivemos uma lista de todos os piRNAs sequenciados e realizamos uma comparação entre os diferentes grupos experimentais. Como critério, $p \leq 0,05$, geramos um conjunto de listas de piRNAs diferencialmente expressos para terminar a análise do perfil de expressão de piRNA utilizando $\text{Log}_2 \text{FC} < -0,60$ ou $> 0,58$.

3.8. Análise do Componente Principal (PCA)

O PCA é um método estatístico que utiliza uma transformação ortogonal para converter um conjunto de observações de variáveis possivelmente correlacionadas, em um conjunto de valores de variáveis não-correlacionadas linearmente, chamados componentes principais. O número de componentes principais é menor ou igual ao número de variáveis originais. Esta transformação é definida de tal maneira que o primeiro componente principal tem a maior variância possível (isto é, responsável pelo tanto da variabilidade nos dados quanto possível), e cada componente com êxito, por sua vez, tem a próxima maior variância possível sob a restrição que é ortogonal à componente anterior (Yeung and Ruzzo, 2001). Foi realizada a análise PCA para verificar a dispersão de amostras para ambos os mRNAs e sncRNA. Para este propósito, *scripts* personalizados foram implementados no R (versão 3.2.5).

3.9. Predição dos alvos dos miRNAs

Os alvos de miRNA que poderiam alterar a expressão de seus respectivos mRNAs foram avaliados computacionalmente. Para testar esta hipótese, algoritmos de predição de miRNAs foram aplicados aos mRNAs diferencialmente expressos. A predição de potenciais alvos de miRNA foi realizada utilizando Mirwalk 2.0 (Dweep *et al.*, 2011b). Esta ferramenta integra dados de miRNA disponíveis a partir de 12 algoritmos e bases de dados de predição diferentes: miRWalk, miRNAmapper (HSU *et al.*, 2008), mirDB (WONG; WANG, 2015), Diana MicroTv4 (MARAGKAKIS *et al.*, 2009), miRmap (VEJNAR; BLUM; ZDOBNOV, 2013), RNAhybrid 2.1 (REHMSMEIER *et al.*, 2004), miBridge (J. TSANG, EBERT M, 2010), miRanda (Betel *et al.*, 2008), PicTar2 (Anders *et al.*, 2012), PITA (KERTESZ *et al.*, 2007),

RNA22v2 (LOHER; RIGOUTSOS, 2012) e TargetScan (FRIEDMAN et al, 2009). O *input* no Mirwalk foram os miRNAs com expressão diferencial entre grupos controle e expostos ao TCCD. Os mRNA transcritos preditos como alvos de miRNAs em, pelo menos, seis bases de dados foram considerados nas análises subsequentes.

3.10. Validação da expressão de miRNA e mRNA

Os miRNAs e mRNAs de interesse para nosso modelo experimental que se apresentaram desregulados, significativamente, foram validados por qPCR confirmando os resultados do RNAseq. O cDNA foi sintetizado utilizando TaqMan H microRNA Reverse Transcription kit (Life Technologies, EUA), combinado com Stem-loop RT Primers (Life Technologies, EUA) e High Capacity RNA para cDNA Master Mix (Life Technologies, EUA), de acordo com as orientações do fabricante. Para miRNA, misturaram-se 3 mL (10 ng) de RNA total com iniciadores específicos (3 µL), dNTPs (100 mM), Transcriptase Reversa MultiScribe™ (50 µL), 10X Tampão RT, inibidor de RNase (20 µL) e completou-se até 4,5 µL com H₂O. As condições de ciclagem foram: 16 °C durante 2 min, 42 °C durante 1 min, 50 °C durante 1 segundo e 85 °C durante 5 min. Para o mRNA, misturou-se 10 mL de RNA total com 4 mL de Master Mix, 2 mL de iniciadores específicos e completou-se até 20 mL com H₂O. As condições de ciclagem foram: 25 °C durante 5 min, 42 °C durante 30 min e 85 °C durante 5 min.

3.11. PCR Quantitativa em Tempo Real (miRNAs)

Cada cDNA do miR-106b-5p, miR-3613-3p e miR-18a-3p foi quantificado por PCR quantitativa em tempo real utilizando o Step One Plus Detection System (Life Technologies, EUA). Utilizou-se, para cada reação, 10 µL de TaqMan H Universal PCR Master Mix, 2 µL de TaqMan MicroRNA Assay Mix (Life Technologies, EUA), 1,5 µL de cDNA e completou-se até 20 µL de volume de reação. As condições de ciclagem foram: 95 °C durante 10 minutos; 45 ciclos de 95 °C durante 15 segundos e 60 °C durante 1 minuto.

3.12. PCR quantitativa em tempo real (mRNAs)

Para a análise do nível de expressão de *AHRR*, *CYP1B1*, *FGF2*, *GPR68*, *LIF*, *VCAM1* e *TIPARP* RT-qPCR foi realizado com SYBR Green Master Mix, utilizando primers específicos para cada gene (**Tabela 2**). Realizaram-se as reações num volume total de 20 µL utilizando 5 µL de cDNA diluído a 1:100, 10 µL de SYBR Green Master Mix (Life Technologies, EUA) e 2,5 µL de cada iniciador específico (5 nM) realizado no Step One Plus real time PCR (Life Technologies, EUA). As condições de ciclagem foram: 95 °C durante 10 minutos; 45 ciclos de 95 °C durante 15 segundos e 60 °C durante 1 minuto.

Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos para o estudo da expressão gênica.

Gene	Forward	Reverse
<i>CYP1B1</i>	CCTATGTCCTGGCCTTCCTTT	TGAGGAATAGTGACAGGCACAAA
<i>TIPARP</i>	GGCAGATTTGAATGCCATGA	TGGACAGCCTTCGTAGTTGGT
<i>AHRR</i>	TGTTGGAGTCTCTTAATG	ATGTAGTCATAAATGTTCTG
<i>VCAM1</i>	CAGGCTAAGTTACATATTGAT	GAGGAAGGGCTGACCAAGAC
<i>GPR68</i>	AGGTCATCGAGGACGAGAA	CAGGAAGCGGTAGTAGTTGATG
<i>LIF</i>	GAAGTGCAGCCCATAATGA	TTCCAGTGCAGAACCAACAG
<i>FGF2</i>	GCTGTA CTGCAAAAACGGGG	TAGCTTGATGTGAGGGTCGC

3.13. Análise da Expressão Gênica

Para analisar as expressões diferenciais, os níveis de miRNA e mRNA obtidos para cada gene foram comparados entre o grupo controle e o grupo TCDD. A normalização da expressão dos miRNAs foi feita utilizando a expressão dos RNAs de referência: snRNA U48 e RPL 21. Para a expressão de mRNA, o gene de referência utilizado foi o *B2M*. A expressão gênica relativa foi avaliada utilizando o método de quantificação comparativa [43]. Todas as quantificações relativas foram avaliadas utilizando o software DataAssist v 3.0, utilizando o método $\Delta\Delta CT$.

3.14. Avaliação quantitativa da expressão protéica por Western Blot

A extração proteica foi realizada com tampão RIPA (©EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), 1mL para $\sim 5 \times 10^6$ células, adicionado ao coquetel inibidor de proteases (Sigma®, USA). As células foram transferidas para um tubo do tipo eppendorf e mantidas no gelo por 5 minutos. Em seguida, as células foram homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi coletado. A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford em placas de ELISA com 96 poços e leitura em leitor de placas.

As alíquotas (40µg de proteína) foram tratadas com solução tampão para corrida de gel (Laemli Sample Buffer – BIO-RAD®) e β-mercaptoetanol a 100°C por 5 minutos. Em seguida, as proteínas foram separadas em SDS-PAGE e após a eletroforese, transferidas para a membrana de nitrocelulose. A ligação inespecífica de proteínas foi bloqueada através da incubação das membranas em BSA a 3% ou em leite desnatado a 5% em tampão TBST (Tris-Buffered Saline and Tween 20) por 1 hora e 30 minutos no *shaker* em temperatura ambiente. As membranas foram subsequentemente incubadas com os respectivos anticorpos primários em TBST overnight no *shaker* em geladeira [AhR (ab84833); AHRR (ab108518); SOD2 (ab13533); NRF2 (ab137550); Abcam ® Inc., Cambridge, MA, EUA e β-actin – proteína normalizadora (clone sc-47778, Santa Cruz, Santa Cruz Biotechnology ®, Inc., Dallas, TX, USA)]. Após 4 ciclos de lavagem em TBST, as membranas foram incubadas em anticorpo secundário específico diluído em TBST por 2 horas no *shaker* em temperatura ambiente. Após 4 ciclos de lavagem em TBST, os componentes imunorreativos foram revelados pelos kit luminescente Amersham ECL Select ®.

3.15. Sítios de ligação dos Fatores de Transcrição (TFBSs):

TFBSs foram preditos utilizando o software Genomatix suite. Este identificou um conjunto de reguladores candidatos que poderiam ser responsáveis pela ativação ou inibição nas mudanças da expressão gênica em células de Sertoli humanas. As sequências foram examinadas para encontrar sítios de ligação de fatores de transcrição pelo MatInspector 8.2. Resumidamente, o MatInspector é uma função do Genomatix que utiliza uma biblioteca própria de descrições de matriz para sítios de ligação de fatores de transcrição para localizar correspondências nas sequências de DNA. Ele atribui uma classificação de qualidade para as

correspondências e, assim, permite a filtragem e seleção de correspondências com base na qualidade. Para determinar quais os sítios de ligação dos fatores de transcrição que poderiam ser regulados por miRNAs, miRNAs diferencialmente expressos do estudo foram colocados no Genomatix Pathway System (GEPS). O GEPS gera uma lista de todos os TFBSs presentes nos miRNAs de interesse.

3.16. Perfil do transcriptoma de células de Sertoli: comparação entre camundongo, humano e rato.

A comparação dos perfis de transcrição derivados de células de Sertoli entre os nossos dados do grupo controle (humanos), camundongo e rato foi realizada para avaliar quais e quantos genes, entre o conjunto dos *top* 200 mais expressos, foram conservados entre as espécies. Os dados de ZIMMERMANN et al. (2015) foram extraídos para a análise do transcriptoma do camundongo. A comparação utilizou fragmentos médios por quilobase por milhão de fragmentos mapeados (FPKM) valores de 25 e 35 dias de vida dos camundongos que correspondem a idade pós-puberdade das células de Sertoli humanas em nosso estudo; e de JOHNSTON et al. (2008) extraímos os dados do transcriptoma de ratos de 60 dias (também animais em pós-puberdade). Zimmermann et al. utilizou RNA-seq, enquanto Johnston et al, utilizou Affymetrics rat genome 230 2.0 microarrays.

3.17. Interpretação dos dados:

Os dados apresentados abaixo descrevem o transcriptoma das células de Sertoli humanas. Isto inclui os sncRNAs diferencialmente expressos, genes diferencialmente expressos e sítios de ligação de fatores de transcrição aumentados após exposição a 10 nM de TCDD durante 72 horas. Para interpretar estes dados no contexto da genômica, RNA e interações proteicas conhecidas, foram utilizados uma série de programas, listados abaixo:

1- Ingenuity Pathway Analysis (IPA; Redwood City, CA, EUA): utilizadas as funções Core Analysis, Mechanistic Networks, Pathway Analysis, Canonical Pathways, MicroRNA Target Filter e Path Designer.

2- Genomatix Software Suite (Genomatix Software GmbH, Munique, Alemanha): funções: Genomatix Pathway System (GEPS), Genomatix Annotation (Eldorado), Matbase (Transcription Factor Database).

4. RESULTADOS:

4.1. Cultura Celular

As células de Sertoli humanas (HSeC) foram cultivadas *in vitro* em meio DMEM/F12 suplementado com 10% FBS e 1% antibiótico/antimicótico, a 37 °C, 5% CO₂ e 95% de umidade (**Figura 9**). O tempo de aderência após o descongelamento foi de 24h e o meio foi trocado a cada 3, 4 dias até as células atingirem em torno de 80% de confluência para que o subcultivo pudesse ser realizado.

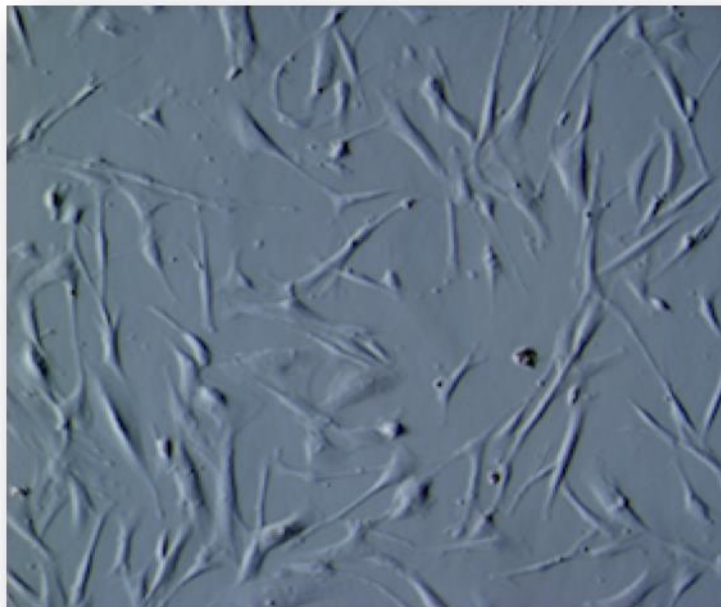


Figura 9. Células de Sertoli humanas em cultivo. Imagem obtida em microscópio com contraste de

fase em aumento de 10X.

4.2 Genes marcadores específicos das células de Sertoli humanas

Como forma de atestar a legitimidade das células do nosso estudo, utilizamos os dados de RNAseq para mostrar que os genes específicos das células de Sertoli humanas são expressos nas nossas amostras. Para esta finalidade, utilizamos as amostras do grupo controle, não expostas ao TCDD (**Tabela 3**).

Tabela 3. Os 10 genes marcadores específicos das células de Sertoli humanas. A coluna "gene" fornece os genes marcadores nas amostras do grupo controle; "C1, C2 e C3" caracterizam as amostras que não foram expostas ao TCDD, os valores nessas colunas representam a expressão significativa. A coluna "Média dos Controles" representa a média de expressão das três amostras do grupo controle.

	Gene	C1	C2	C3	Média dos controles
1	GATA4	28,45	32,89	30,86	30,73
2	CLDN11	133,28	133,82	128,64	131,91
3	CDH2	340,44	335,32	292,07	322,61
4	PDS5B	16,39	14,71	12,52	14,54
5	MAZ	94,61	87,95	85,08	89,21
6	GNAI1	34,46	30,73	30,57	31,92
7	OS9	277,24	283,56	284,29	281,70
8	EPAS1	105,72	101,99	98,55	102,09
9	ARNT	46,51	48,93	48,01	47,82
10	STAT1	82,31	70,95	66,78	73,35

4.3. Teste de Micoplasma

Os testes realizados antes e após o término de todos os experimentos indicaram ausência do microorganismo na cultura celular (**Figura 10**).

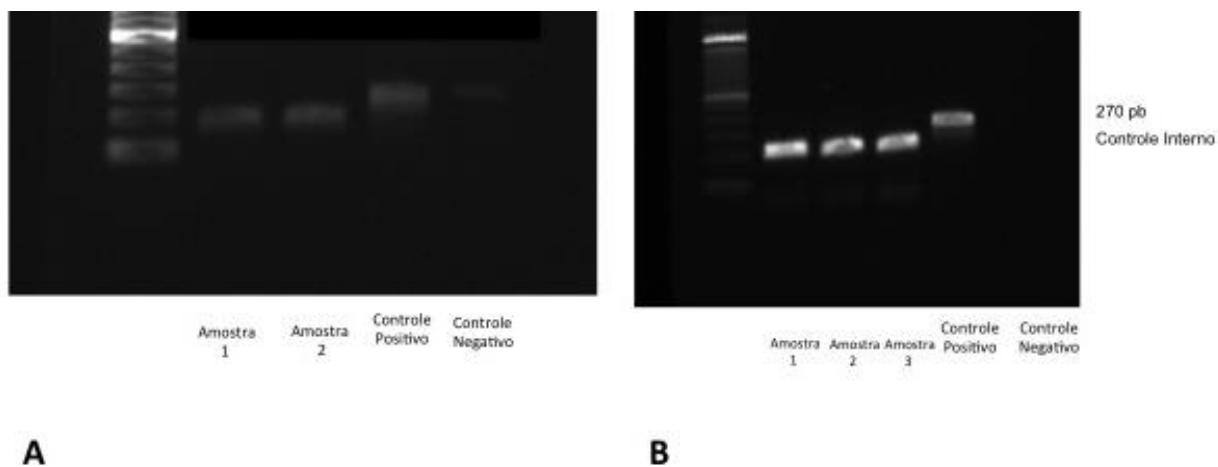


Figura 10. Resultado do teste de *Mycoplasma sp* nas células HSeC. Em A teste realizado após o descongelamento e em B teste no final do experimento.

4.4. Sobrevivência celular

Os dados são apresentados como percentual (%) de atividade mitocondrial dos experimentos independentes na mesma placa (**Figura 11**).

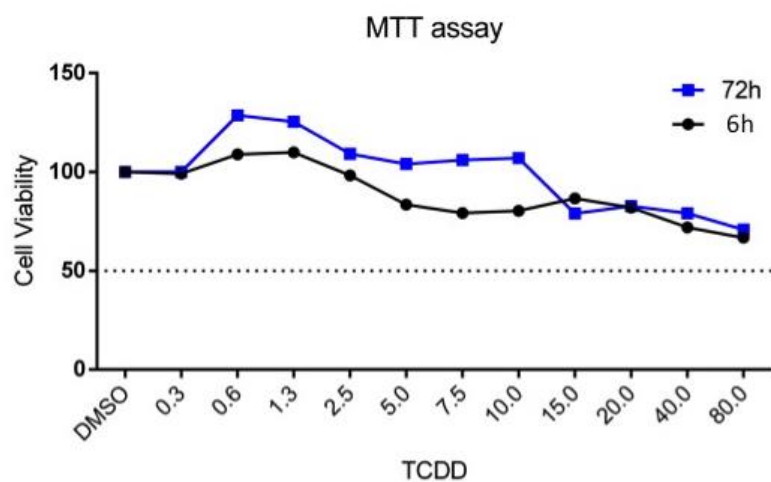


Figura 11. Teste de MTT nas células HSeC nos tempos de 6 e 72h e nas 11 diferentes concentrações de TCDD (em nM). A linha tracejada representa a concentração máxima inibitória (IC 50).

Houve redução na viabilidade celular a partir da concentração de 15 nM mas não inferior a metade da concentração máxima inibitória (IC50). Portanto, a concentração de escolha foi de 10 nM corroborando com estudos anteriores (Wu *et al.*, 2004; Aly and Khafagy, 2011).

4.5. Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas antioxidantes é mostrada nas **Figuras 12 (A-C)**. A atividade da catalase, da glutaciona peroxidase mostrou-se estatisticamente diminuída após 72 horas de exposição ao TCDD. A enzima superóxido dismutase apresentou diminuição da atividade com relação ao grupo controle mas não estatisticamente significativa.

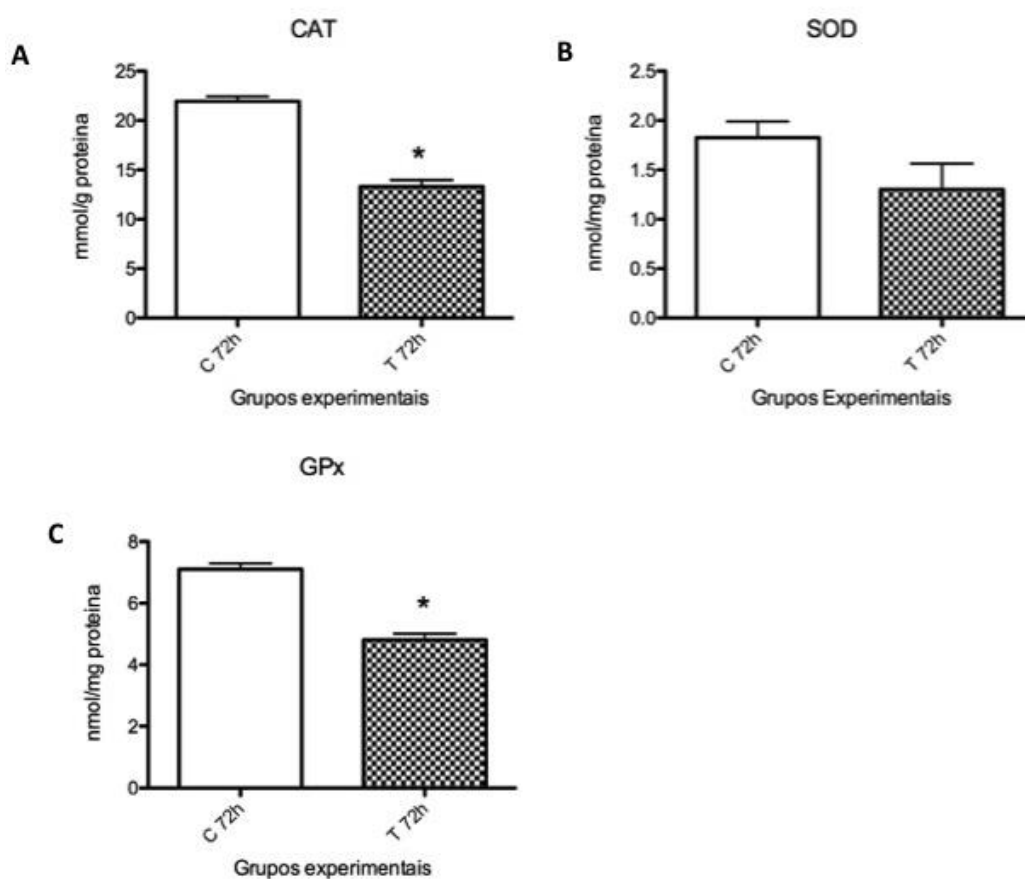


Figura 12. Atividade de enzimas antioxidantes em células de Sertoli humanas após exposição ao TCDD por ensaio colorimétrico. **A:** Catalase (CAT), **B:** Superóxido dismutase (SOD), **C:** Glutaciona peroxidase (GTx). Os gráficos representam a média \pm desvio padrão da atividade enzimática. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa ($* p \leq 0,05$) após

teste de Mann-Whitney.

4.6. Genes diferencialmente expressos identificados por RNA-Seq

A análise PCA da expressão de mRNA mostra separação dos grupos controle e expostos ao TCDD (**Figura 13**). A expressão diferencial do mRNA entre as amostras controle e TCDD foi, em seguida, examinada utilizando o DESeq2 e EBSeq (LENG et al., 2015) (**Figura 14**). Foram utilizados os dois pacotes de bioinformática para confirmar os dados e comparar os resultados usando transcritos por milhão (TPM) e contagens normalizadas.

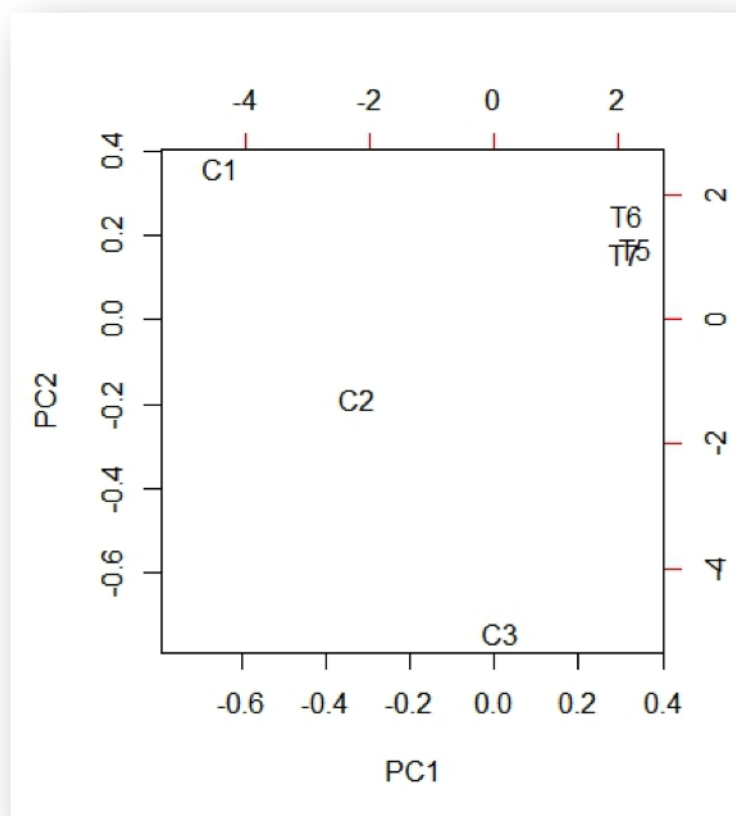


Figura 13. A análise PCA dos diferentes grupos experimentais das células de Sertoli humanas: grupos Controle e TCDD mostram expressão gênica diferencial considerável conforme determinado pela análise PCA. C1, C2 e C3 representam o grupo controle e T5, T6 e T7 caracterizam o grupo TCDD. Os eixos X e Y indicam o primeiro componente principal (PC1) e o segundo componente principal (PC2), respectivamente. Notavelmente, PC1, que representa a maior quantidade de variação nos dados, segrega o controle das amostras TCDD.

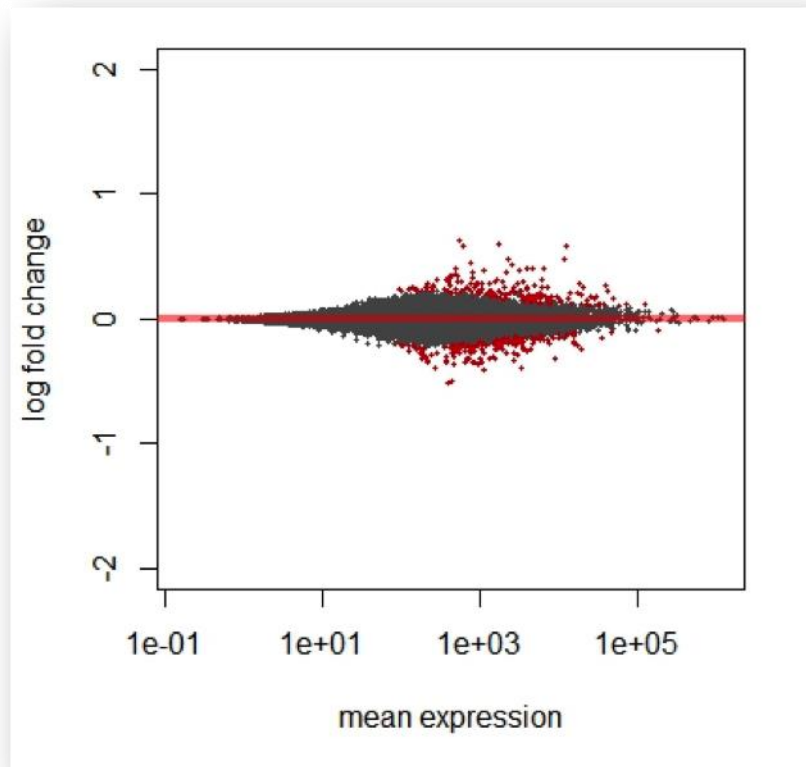


Figura 14. Genes diferencialmente expressos nas células de Sertoli humanas após a exposição ao TCDD. Após 72 horas de exposição, um grande número de genes estão regulados positivamente nas células de Sertoli. As contagens médias normalizadas dos genes são indicadas no eixo X, enquanto o eixo Y representa Log₂ Fold Change. Os pontos vermelhos representam genes com alterações estatisticamente significativas na expressão, enquanto pontos pretos indicam genes sem mudança significativa na expressão. O gráfico foi gerado a partir dos resultados de expressão do DESeq2.

A expressão diferencial dos mRNAs entre os grupos experimentais foi examinada utilizando DESeq2 e EBSeg (LENG et al., 2015). A expressão diferencial foi determinada com FDR inferior a 0,05 após correção para múltiplos testes de Benjamini-Hochberg (Benjamini; HOCHBERG, 1995), bem como Log₂ Fold Change inferior a -0,41 ou maior que 0,26. Em geral, a análise das amostras mostrou que 51 genes estão com expressão alterada. Destes, 46 revelaram níveis elevados de expressão e 5 mostraram expressão diminuída em comparação ao grupo controle (**Tabela 4**).

Tabela 4. Lista de genes diferencialmente expressos em células de Sertoli após exposição ao TCDD. Os genes listados são filtrados por Log2 FC <-0,41 ou > 0,26 (FDR corrigido valor de $p \leq 0,05$). A coluna Log2FC descreve o quanto a expressão de cada gene muda em relação à base de Log 2. A coluna FDR fornece o valor corrigido de Benjamini-Hochberg, valor de p . 51 genes estão desregulados, 47 genes com regulação positiva e 4 genes com regulação negativa na comparação entre os grupos experimentais.

Gene	Log2 FC		Valor de p	
	EBseq	DESeq2	EBSeq (FDR)	DESeq2 (p -ajustado)
KB-1572G7.2	2.1922		8.2157E-15	
DNM3OS	0.8332	0.6229	1.9860E-03	6.0979E-16
DOK3	0.7064	0.3454	4.2999E-06	3.8380E-04
MYH11	0.6035		3.2286E-02	
VIPR1	0.5945	1.7204	0	7.9016E-24
IL1A	0.5802	0.4819	3.2478E-08	8.7600E-18
DNM3		0.5775		5.6369E-14
IL1B	0.5775	1.5868	0	3.6675E-51
SERPINB2	0.5632	0.3651	1.3179E-04	8.1200E-05
LRRC2	0.5559	0.3721	1.4635E-03	1.0500E-06
CYP1B1	0.5414	0.4826	0	1.0040E-39
SERPINA9	0.5098	0.3929	3.4858E-04	2.9200E-07
VCAM1	0.4987		6.8085E-06	
LIF	0.4682	0.4024	4.9490E-12	2.0500E-12
VIPR1-AS1		0.4475		4.7027E-09

CYB561A3	0.4294	0.4070	0	2.9994E-20
FAM43A	0.4162	0.3774	1.0103E-14	1.2300E-12
TIPARP	0.3986	1.4047	0	7.4942E-19
MT1L		0.3977		1.4686E-05
TKFC		0.3832		1.9939E-15
ZPLD1		0.3498		1.4428E-04
LINC00475		0.3496		1.6415E-04
KIAA1644	0.3405	0.2786	5.6122E-06	3.8380E-04
KCTD11	0.3377	0.2974	1.1608E-07	1.0100E-06
FGF2	0.3231		1.6444E-03	
ISM2	0.3213		8.4070E-04	
SERPINB10		0.3208		1.2170E-03
GPR68		0.3176		1.5369E-03
FBXO32	0.3113		4.3203E-08	
HSPB7		0.3080		6.9930E-08
HECW2	0.3070		1.5080E-04	
KCTD12	0.3051	0.2706	2.1418E-03	1.4800E-05
METTL21B	0.3047			1.3537E-04
PKNOX2	0.3045			2.3100E-07
MEF2A	0.3037		4.0190E-14	
EGR2	0.3021			2.6252E-03
E2F7	0.3007		2.5848E-02	

STC2	0.3004		4.6423E-10	
RMDN2	0.2968			1.5126E-03
GPAM	0.2931		3.9894E-03	
RMDN2-AS1		0.2898		3.1809E-03
HLA-K		0.2857		3.1479E-04
PDE4C		0.2842		6.6004E-04
NUDT6		0.2815		2.0798E-08
PAPPA-AS1		0.2803		2.2788E-04
TP53I11	0.2774		2.4058E-11	
NPR3	0.2687		2.7589E-02	
TM4SF1	-0.4435		0.0000E+00	
ERBB3	-0.4865		6.6907E-05	
MTCO1P12	-0.5047		4.7575E-02	
STAR	-1.022	-0.5138	1.4694E-10	1.7900E-09

4.7. miRNAs diferencialmente expressos identificados por sncRNA-seq

O perfil de expressão dos miRNAs das células de Sertoli humanas foi elaborado. As amostras dos dois grupos (TCDD e controle) foram segregadas pela Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando os níveis totais de expressão dos sncRNAs (**Figura 15**). A expressão diferencial dos miRNAs, entre os grupos experimentais, foi determinada pelo edgeR (Robinson *et al.*, 2010) (**Figura 16**).

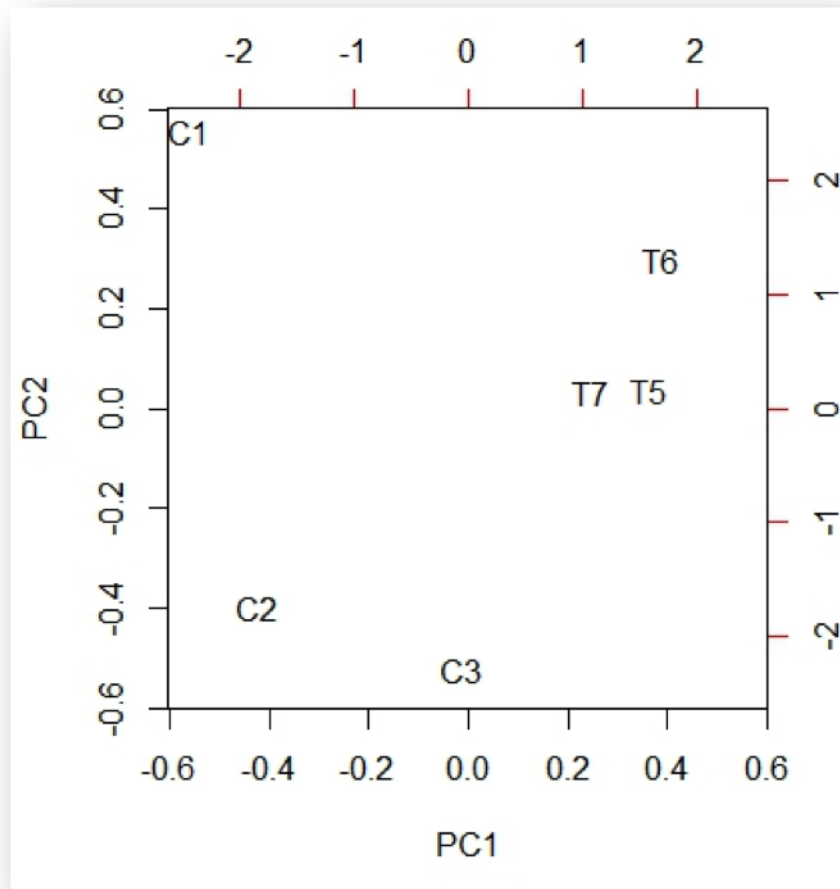


Figura 15. Análise PCA dos diferentes grupos experimentais das células de Sertoli humanas: grupos Controle e TCDD mostram considerável diferença de expressão dos miRNAs, conforme determinada pela análise PCA. C1, C2 e C3 representam o grupo controle e T5, T6 e T7 caracterizam o grupo TCDD. Os eixos X e Y indicam o primeiro componente principal (PC1) e o segundo componente principal (PC2), respectivamente. Notavelmente, PC1, que representa a maior quantidade de variação nos dados, segrega o controle a partir de amostras TCDD.

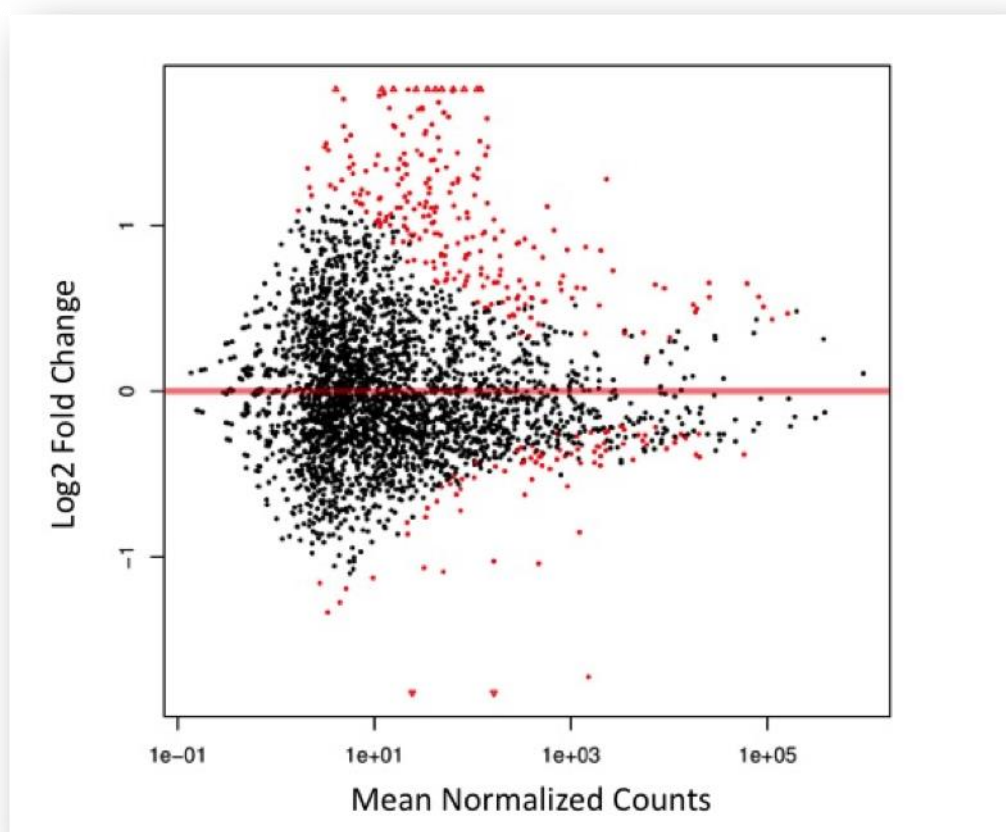


Figura 16. miRNAs diferencialmente expressos em células de Sertoli humanas após a exposição ao TCDD. Após 72 horas de exposição, as células apresentaram, principalmente, regulação positiva na expressão dos miRNAs. As contagens médias normalizadas dos miRNAs estão indicadas no eixo X, enquanto o eixo Y representa Log₂ Fold Change (Log₂ FC). Os pontos vermelhos representam miRNAs com alterações estatisticamente significativas na expressão, enquanto os pontos pretos indicam miRNAs sem mudança significativa na expressão. O gráfico foi gerado a partir dos resultados de expressão do edgeR.

Conforme calculado pelo edgeR, 78 miRNAs mostraram expressão alterada, com a regulação positiva de 73 miRNAs e regulação negativa de 5 miRNAs quando comparados os grupos TCDD e controle (**Tabela 5**). Os miRNAs foram classificados como diferencialmente expressos quando o FDR foi $\leq 0,05$ após correção para múltiplos testes de Benjamini-Hochberg (Benjamini; HOCHBERG, 1995), bem como Log₂ FC inferior a -0,60 ou maior que 0,58.

Tabela 5. Lista de miRNAs diferencialmente expressos em células de Sertoli humanas após exposição ao TCDD. Os miRNAs listados são filtrados por $\text{Log}_2\text{FC} < -0,60$ ou $> 0,58$ (FDR valor corrigido de $p \leq 0,05$). A coluna Log_2FC descreve o quanto a expressão de cada miR altera relativamente no log de base 2. A coluna FDR fornece o valor corrigido de Benjamini-Hochberg, valor de p . 78 miRNAs estão desregulados, 73 miRNAs com regulação positiva e 5 com regulação negativa, comparando os grupos experimentais

miRNA	Log2FC	FDR
hsa-miR-33a-5p	3.6355	2.6322E-24
hsa-miR-3613-5p	2.6617	1.8096E-11
hsa-miR-1307-5p	2.5792	4.9537E-30
hsa-miR-374a-3p	2.5648	9.4989E-35
hsa-miR-29b-3p	2.4595	6.5221E-24
hsa-miR-33b-5p	2.4110	6.1126E-15
hsa-miR-362-3p	2.3579	2.9876E-09
hsa-miR-190a-3p	2.1796	7.0145E-05
hsa-miR-32-5p	2.1325	1.2985E-18
hsa-miR-590-3p	2.0057	3.3126E-18
hsa-miR-539-3p	1.9871	2.4340E-19
hsa-miR-100-3p	1.8980	8.0508E-31
hsa-miR-19a-3p	1.8512	1.3329E-13
hsa-miR-376a-2-5p	1.6739	6.2277E-08
hsa-miR-34b-5p	1.6489	1.5753E-16
hsa-miR-301a-3p	1.6309	2.8068E-19

hsa-miR-101-3p	1.5111	3.8413E-15
hsa-miR-193a-3p	1.5004	2.4340E-19
hsa-miR-188-5p	1.4906	2.8433E-18
hsa-miR-136-5p	1.4431	9.0104E-17
hsa-miR-652-5p	1.4217	6.7977E-04
hsa-miR-542-3p	1.4213	1.7741E-11
hsa-miR-190a-5p	1.4112	1.0371E-17
hsa-miR-545-5p	1.3686	1.9964E-05
hsa-miR-340-5p	1.3522	6.0270E-10
hsa-miR-141-3p	1.3337	2.1909E-05
hsa-miR-101-5p	1.3160	1.7461E-05
hsa-miR-136-3p	1.2324	3.6298E-16
hsa-miR-30e-5p	1.2247	1.9924E-14
hsa-miR-369-3p	1.2137	4.4522E-10
hsa-miR-337-5p	1.1999	3.3992E-21
hsa-miR-32-3p	1.1965	3.8650E-04
hsa-miR-330-5p	1.1868	9.9832E-19
hsa-miR-181b-2-3p	1.1511	6.7432E-03
hsa-miR-708-3p	1.1019	7.7509E-15
hsa-miR-34c-5p	1.0232	2.9169E-11
hsa-miR-19b-3p	1.0104	2.2053E-06
hsa-miR-450b-5p	1.0069	2.1666E-11

hsa-miR-374b-3p	0.9992	5.4835E-06
hsa-miR-30d-3p	0.9576	1.5753E-16
hsa-miR-29a-5p	0.9515	1.0204E-14
hsa-miR-126-5p	0.9440	2.1763E-10
hsa-miR-301b-3p	0.9226	1.7580E-11
hsa-miR-424-5p	0.9067	6.8359E-12
hsa-miR-374a-5p	0.8358	6.7253E-08
hsa-let-7g-3p	0.8208	2.5561E-05
hsa-miR-98-3p	0.8197	1.3605E-13
hsa-miR-192-5p	0.8027	2.4981E-10
hsa-miR-18a-5p	0.7916	1.7154E-05
hsa-miR-106b-5p	0.7676	6.4475E-07
hsa-miR-30a-5p	0.7475	7.7711E-14
hsa-miR-98-5p	0.7463	4.1536E-11
hsa-miR-335-5p	0.7075	3.0825E-06
hsa-miR-376c-3p	0.7055	1.5960E-04
hsa-miR-34a-5p	0.6987	8.1505E-07
hsa-miR-27a-3p	0.6980	3.7713E-08
hsa-miR-887-5p	0.6936	1.1807E-03
hsa-miR-561-5p	0.6756	2.6409E-05
hsa-let-7f-2-3p	0.6709	1.4930E-09
hsa-miR-1185-5p	0.6640	7.8367E-08

hsa-miR-7-5p	0.6633	1.3213E-02
hsa-miR-411-5p	0.6530	4.0216E-10
hsa-miR-15a-5p	0.6483	3.3223E-07
hsa-miR-548e-3p	0.6460	7.4387E-04
hsa-miR-377-3p	0.6307	5.0018E-05
hsa-miR-17-3p	0.6293	1.2811E-04
hsa-miR-140-5p	0.6260	1.5262E-05
hsa-miR-627-3p	0.6246	1.5792E-02
hsa-miR-20a-5p	0.6201	1.4717E-05
hsa-miR-450a-5p	0.6174	8.0517E-06
hsa-let-7f-5p	0.6109	7.9173E-08
hsa-miR-34a-3p	0.6076	5.3203E-06
hsa-miR-381-3p	0.5851	8.7913E-09
hsa-miR-615-5p	-0.6391	5.0477E-03
hsa-miR-193b-5p	-0.6559	6.1490E-06
hsa-miR-18a-3p	-0.6835	5.8957E-03
hsa-miR-3613-3p	-0.8102	4.0450E-03
hsa-miR-222-5p	-1.7667	1.0135E-83

4.8. Predição dos alvos de miRNAs

Tabela 6. Predição dos miRNAs e seus respectivos genes alvo pelo Mirwalk (Dweep *et al.*, 2011a). A lista dos miRNAs diferencialmente expressos, após a exposição ao TCDD, é apresentada na coluna "miRNA". A coluna "Alvos" indica os respectivos genes, que o miRNA na coluna "miRNA" pode regular. As colunas "Regulação miRNA" e "Regulação Gênica" mostram se houve aumento ou diminuição dos níveis de expressão dos genes ou dos miRNAs, respectivamente. A seta resume a direção da alteração da expressão.

miRNA	Regulação miRNA	Alvos	Regulação Gênica
hsa-miR-18a-3p	↓	FBXO32	↑
hsa-miR-18a-3p	↓	GPR68	↑
hsa-miR-18a-3p	↓	HSPB7	↑
hsa-miR-18a-3p	↓	KCTD11	↑
hsa-miR-18a-3p	↓	KIAA1644	↑
hsa-miR-18a-3p	↓	LIF	↑
hsa-miR-18a-3p	↓	PKNOX2	↑
hsa-miR-18a-3p	↓	VIPR1	↑
hsa-miR-193b-5p	↓	FAM43A	↑
hsa-miR-193b-5p	↓	FGF2	↑
hsa-miR-193b-5p	↓	PDE4C	↑
hsa-miR-193b-5p	↓	STC2	↑
hsa-miR-222-5p	↓	CYP1B1	↑
hsa-miR-222-5p	↓	FGF2	↑
hsa-miR-222-5p	↓	KCTD11	↑
hsa-miR-222-5p	↓	LRRC2	↑
hsa-miR-222-5p	↓	STC2	↑
hsa-miR-3613-3p	↓	CYP1B1	↑
hsa-miR-3613-3p	↓	DNM3	↑
hsa-miR-3613-3p	↓	E2F7	↑

hsa-miR-3613-3p	↓	FBXO32	↑
hsa-miR-3613-3p	↓	FGF2	↑
hsa-miR-3613-3p	↓	KCTD12	↑
hsa-miR-3613-3p	↓	LRRC2	↑
hsa-miR-3613-3p	↓	METTL21B	↑
hsa-miR-3613-3p	↓	NPR3	↑
hsa-miR-3613-3p	↓	ZPLD1	↑
hsa-miR-615-5p	↓	EGR2	↑
hsa-miR-615-5p	↓	HSPB7	↑
hsa-miR-615-5p	↓	KCTD12	↑
hsa-miR-615-5p	↓	LRRC2	↑
hsa-miR-615-5p	↓	PKNOX2	↑
hsa-let-7f-2-3p	↑	VCAM1	↓
hsa-miR-141-3p	↑	TM4SF1	↓
hsa-miR-15a-5p	↑	TM4SF1	↓
hsa-miR-30a-5p	↑	TM4SF1	↓
hsa-miR-30e-5p	↑	TM4SF1	↓
hsa-miR-340-5p	↑	TM4SF1	↓
hsa-miR-34a-5p	↑	VCAM1	↓
hsa-miR-381-3p	↑	TM4SF1	↓
hsa-miR-411-5p	↑	TM4SF1	↓
hsa-miR-424-5p	↑	TM4SF1	↓
hsa-miR-539-3p	↑	TM4SF1	↓
hsa-miR-561-5p	↑	VCAM1	↓
hsa-miR-590-3p	↑	VCAM1	↓
hsa-miR-708-3p	↑	TM4SF1	↓

4.9. Identificação de vias de sinalização e redes

Para começar a desvendar o mecanismo de ação do TCDD nas células de Sertoli humanas, as vias e redes dos genes alterados pela exposição ao agente tóxico foram analisadas com o Genomatix Software Suite e Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Comparando os grupos TCDD e controle, os genes diferencialmente regulados têm um importante papel na resposta ao estresse. Isto é interessante, tendo em vista que o TCDD é conhecido por induzir o estresse oxidativo (Chen *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2007; Aly and Khafagy, 2011). Outras vias alteradas após a exposição ao TCDD incluem: sinalização e interação célula-célula, ciclo celular, movimento, crescimento e proliferação celular. Como descrito acima (Griswold, 1998; Walker and Cheng, 2005; Kopera *et al.*, 2010), as células de Sertoli desempenham um papel extremamente importante na fisiologia e diferenciação das células germinativas, essas alterações se refletem diretamente na espermatogênese. A via do TCDD, via do Câncer, crescimento e desenvolvimento celular são vias que também se apresentaram alteradas. O TCDD já foi descrito por estar relacionado com o câncer em populações expostas (LE et al., 2016). Portanto, estudar as alterações causadas pelo TCDD em células de Sertoli humanas pode proporcionar novas perspectivas para o estudo do câncer testicular e outros efeitos associados (**Tabela 7**). As figuras com as vias estão nos **Anexos**.

Tabela 7. Vias alteradas após exposição ao TCDD. As vias foram determinadas pelo Genomatix Software Suite e Ingenuity Pathway Analysis. ↑ ou ↓ indicam regulação gênica positiva ou negativa, respectivamente.

Via	Regulação gênica
Resposta ao estresse	IL1A↑, FGF2↑, CYP1B1↑, VCAM1↓, STAR↓, MEF2A↑, ERBB3↓, GPAM↑, IL1B↑, SERPINB2↑, STC2↑, TP53L11↑, GPR68↑, MYH11↑, TKFC↑, SERPINB10↑, E2F7↑
Proliferação celular	IL1A↑, VCAM1↓, GPAM↑, VIPR1↑, E2F7↑, CYP1B1↑, IL1B↑, LIF↑, FGF2↑, ERBB3↓, NPR3↑, TP53L11↑, KCTD11↑
Sinalização e interação célula-célula, Ciclo celular, Movimento celular	E2F7↑, VIPR1↑, GPR68↑, ILB1↑, STC2↑, IL1↑, MTL1↑, TP53L11↑, TM4SF1↑
TCDD	MYH11↑, STAR↓, IL1B↑, SERPINB2↑, CYP1B1↑, TIPARP↑, STC2↑, ERBB3↓
Câncer, crescimento e desenvolvimento celular	↑TIPARP, ↑PKNOX2, ↑TKFC, ↑METTL21B, ↑KCTD11, ↑HECW2, ↑DNM3, ↑FAM43A, ↑MTL1, ↓TM4SF1

4.10. Validação da expressão de miRNAs e mRNAs:

Os miRNAs e mRNAs de interesse, para as células de Sertoli humanas *in vitro*, que se apresentaram desregulados, significativamente, foram validados por PCR quantitativo (qPCR) confirmando os resultados do RNAseq (**Tabela 8 e 9 e Figura 17 A e B**). A **Tabela 10** mostra a interação dos miRNAs validados e seus respectivos genes alvos também validados por qPCR.

Tabela 8. miRNAs diferencialmente expressos pela técnica de miRNA-Seq e por TaqMan qPCR. As células em cinza representam os dados de RNAseq, enquanto as brancas de qPCR.

miRNA	RNA-Seq logFC	Fold Change	Valor de <i>p</i>	miRNA	Fold Change	qPCR logFC	Valor de <i>p</i>
106b-5p	0,7676	1,7024	0,0000	106b-5p	2,0388	1,0277	0,0396
3613-3p	-0,8102	0,5703	0,0040	3613-5p	0,6364	0,6520	0,0318
18a-3p	-0,6835	0,6227	0,0059	18a-3p	0,6664	0,5855	0,0318

Tabela 9. Genes diferencialmente expressos pela técnica de RNA-Seq e por TaqMan qPCR. As células em cinza representam os dados de RNAseq, enquanto as brancas de qPCR.

Gene	RNA-Seq logFC	Fold Change	Valor de <i>p</i>	Gene	Fold Change	qPCR logFC	Valor de <i>p</i>
<i>AHRR</i>	0,1394	1,1014	0,0866	<i>AHRR</i>	1,1094	0,1498	0,3212
<i>CYP11B1</i>	0,4826	1,3973	0,0000	<i>CYP11B1</i>	1,8582	0,8939	0,0318
<i>FGF2</i>	0,7993	1,7403	0,0016	<i>FGF2</i>	2,4902	1,3163	0,0318
<i>IL1B</i>	0,5775	1,4923	0,0000	<i>IL1B</i>	3,1515	1,6560	0,0318
<i>LIF</i>	0,4024	1,3217	0,0000	<i>LIF</i>	1,9684	0,9770	0,0318
<i>TIPARP</i>	0,3986	1,3182	0,0000	<i>TIPARP</i>	1,6871	0,7545	0,0318
<i>VCAM1</i>	-0,3578	0,7803	0,0000	<i>VCAM1</i>	0,4111	-1,2824	0,0318
<i>GPR68</i>	0,3176	1,2463	0,0015	<i>GPR68</i>	2,2874	1,1937	0,0318

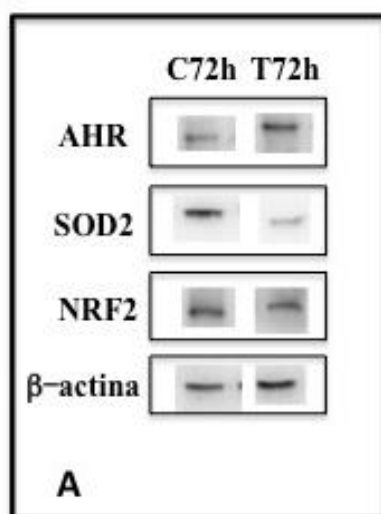
Tabela 10. miRNAs diferencialmente expressos e seus respectivos alvos de vias de interesse das células de Sertoli humanas *in vitro*. ↑ ou ↓ indicam regulação positiva ou negativa, respectivamente.

miRNA	Regulação do miRNA	Alvos	Regulação Gênica
hsa-miR-106b-5p	↑	AHRR	Sem diferença
hsa-miR-3613-3p	↓	CYP1B1	↑
hsa-miR-3613-3p	↓	FGF2	↑
hsa-miR-18a-3p	↓	GPR68	↑
hsa-miR-18a-3p	↓	LIF	↑

4.11. Análise da expressão proteica por Western Blot

Ao analisarmos a expressão das proteínas relacionadas à via do receptor Aril-hidrocarboneto, constatou-se que, após 72h de exposição ao TCDD, não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo exposto ao agente tóxico (**Figuras 17 A e B**). No entanto, houve aumento médio de 61% da expressão do AhR em relação ao controle (**Figura 17A e B**).

Com relação às proteínas envolvidas com o estresse oxidativo, não houve alterações significativas para ambas as proteínas: SOD2 e NRF2, entre o controle e os grupo exposto (**Figuras 17A e B**).



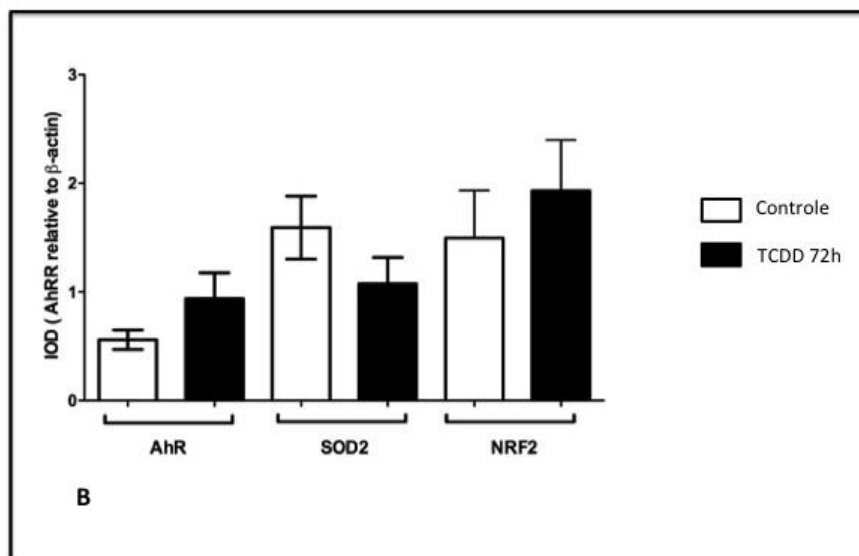


Figura 17. A. Western Blot para as proteínas AhR, SOD2, NRF2 das células de Sertoli humanas *in vitro* dos grupos controle e expostos ao TCDD nos diferentes tempos do estudo. **B.** Os gráficos representam a expressão relativa da densidade óptica integrada para as proteínas AhR, SOD2 e NRF2 normalizadas pela β -actina, expressa pela média \pm EPM.

4.12. Identificação de TIPARP como regulador negativo do AHR em células de Sertoli humanas *in vitro*

TiPARP foi relatado pela primeira vez como um gene responsivo ao TCDD, regulado pelo receptor AHR em hepatócitos de rato (Ma *et al.*, 2001). Posteriormente, MacPherson *et al.* (2013), descreveu pela primeira vez TIPARP como um novo repressor transcricional do AHR. Nossos resultados mostram que TIPARP aumentou os níveis de mRNA em células de Sertoli após 72h de exposição ao TCDD. Dessa forma, decidimos investigar o gene repressor canônico (AHRR) e sua respectiva proteína para verificar se ele foi ativado. O AHRR não mostrou qualquer diferença na expressão gênica em RNAseq ou qPCR, mas a expressão de sua proteína correspondente foi regulada negativamente, com diferença estatisticamente significativa, após 72 h, como mostrado na **Fig. 18 A e B.**

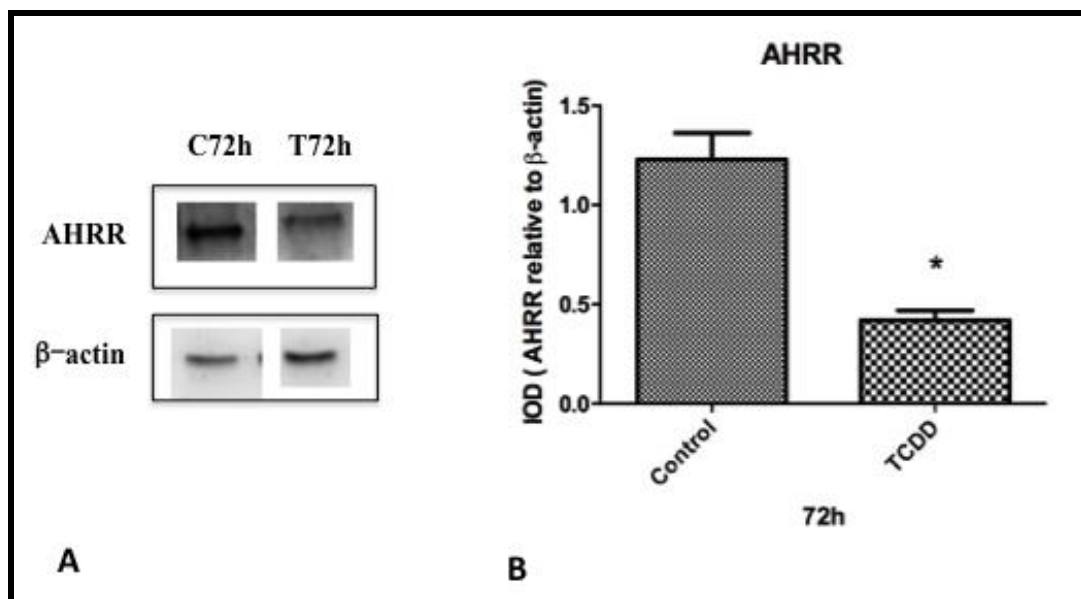


Figura 18. A. Bandas representativas para as proteínas AHRR e β-actina dos grupos controle e exposto ao TCDD 10 nM durante 72 h. B. O gráfico representa a expressão relativa da densidade óptica integrada para AHRR em células de Sertoli tratadas com TCDD 10 nM. A densidade óptica foi normalizada pela β-actina e foi expressa como média ± EPM. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

4.13. piRNAs diferencialmente expressos identificados por sncRNA-seq

Os piRNAs são importantes por silenciar elementos transponíveis na linhagem germinativa, um papel que é altamente conservado entre as espécies animais (SIOMI et al., 2011). Considerando o contato próximo entre as células de Sertoli e as células germinativas, em desenvolvimento, os dados de sncRNA-Seq foi extraído para identificar mudanças associadas na expressão de piRNAs após a exposição ao TCDD. A expressão diferencial foi calculada utilizando o DESeq2 (Anders and Huber, 2010) e os piRNAs com Log2FC menor que -0,60 ou maior que 0,58 (q -value $\leq 0,05$) foram identificados e apresentados na **Tabela 11**. Um total de 30 piRNAs foram identificados, 17 com expressão regulada positivamente e 13 com expressão regulada negativamente (**Tabela 11**).

Tabela 11. piRNAs diferencialmente expressos em células de Sertoli humanas após a exposição ao TCDD. Os piRNAs que exibiram Log2 FC < -0,60 ou > 0,58 (valor de $q \leq 0,05$) foram selecionados. Um total de 30 piRNAs se mostraram desregulados, 17 com regulação positiva e 13 com regulação negativa, comparando os grupos experimentais.

piRNAs	Log2 FC	Fold Change	Valor de q
piRNA_DQ600952.1 piRNA piR-39018	1.62	3.0738	2.68E-11
piRNA_DQ600951.1 piRNA piR-39017	1.48	2.7895	1.48E-05
piRNA_DQ596311.1 piRNA piR-34377	1.29	2.4453	4.96E-03
piRNA_DQ601590.1 piRNA piR-39656	1.22	2.3295	2.56E-03
piRNA_DQ572618.1 piRNA piR-40730	1.13	2.1886	8.31E-04
piRNA_DQ596310.1 piRNA piR-34376	1.03	2.0420	7.29E-03
piRNA_DQ596307.1 piRNA piR-34373	0.96	1.9453	1.92E-04
piRNA_DQ596308.1 piRNA piR-34374	0.94	1.9185	1.62E-04
piRNA_DQ598677.1 piRNA piR-36743	0.84	1.7901	5.70E-06
piRNA_DQ575881.1 piRNA piR-43993	0.81	1.7532	2.57E-02
piRNA_DQ596309.1 piRNA piR-34375	0.75	1.6818	1.94E-02
piRNA_DQ597402.1 piRNA piR-35468	0.71	1.6358	7.47E-08
piRNA_DQ597401.1 piRNA piR-35467	0.71	1.6358	9.75E-06
piRNA_DQ596354.1 piRNA piR-34420	0.67	1.5911	1.31E-02
piRNA_DQ593356.1 piRNA piR-33468	0.64	1.5583	6.17E-03
piRNA_DQ597403.1 piRNA piR-35469	0.62	1.5369	6.24E-04
piRNA_DQ598676.1 piRNA piR-36742	0.59	1.5052	6.38E-03

piRNA_DQ592931.1 piRNA piR-33043	-0.62	0.6507	1.48E-05
piRNA_DQ571335.1 piRNA piR-31447	-0.62	0.6507	4.06E-02
piRNA_DQ581033.1 piRNA piR-49145	-0.64	0.6417	6.46E-03
piRNA_DQ570687.1 piRNA piR-30799	-0.67	0.6285	3.30E-02
piRNA_DQ571511.1 piRNA piR-31623	-0.74	0.5987	3.40E-03
piRNA_DQ598177.1 piRNA piR-36243	-0.8	0.5743	4.06E-02
piRNA_DQ571003.1 piRNA piR-31115	-0.82	0.5664	6.49E-03
piRNA_DQ598104.1 piRNA piR-36170	-0.91	0.5322	3.21E-04
piRNA_DQ571419.1 piRNA piR-31531	-0.94	0.5212	2.15E-03
piRNA_DQ572892.1 piRNA piR-41004	-0.94	0.5212	6.24E-04
piRNA_DQ575661.1 piRNA piR-43773	-0.96	0.5141	7.12E-04
piRNA_DQ582536.1 piRNA piR-32648	-1.08	0.4730	1.02E-02
piRNA_DQ593303.1 piRNA piR-33415	-1.22	0.4293	6.24E-04

4.14. Sítios de ligação dos Fatores de Transcrição (TFBSs)

O fator de transcrição é um fator de sequência-específica que se liga à sequências específicas de DNA, permitindo que um gene seja transcrito (KARIN, 1990). Os fatores de transcrição executam esta função isoladamente ou com outras proteínas em um complexo, promovendo (como um ativador), ou bloqueando (como um repressor) o recrutamento da RNA polimerase (a enzima que realiza a transcrição da informação genética a partir do DNA para RNA) para genes específicos (Roeder, 1996). A identificação de sítios de ligação dos fatores de transcrição é um passo inicial importante na determinação dos sinais que regulam a transcrição do genoma (Levy and Hannehalli, 2002) e sua influência na alteração ambiental. O *software* Genomatix foi utilizado para identificar os TFBSs, esses poderiam ser os responsáveis pelas alterações de expressão dos genes e, dessa forma, podemos definir se esses

fatores de transcrição estão ativados ou inibidos nas células de Sertoli humanas (**Tabela 12 e Tabela 13**).

Tabela 12. Famílias Matriz dos fatores de transcrição relacionados aos genes diferencialmente expressos. A tabela mostra as 7 diferentes famílias matriz que estão estatisticamente significantes com relação a sua expressão diferencial em células de Sertoli após exposição ao TCDD, com valor de $p \leq 0,05$. A descrição se refere ao nome completo das famílias das matrizes.

Família Matriz	Descrição	Valor de p
V\$ZF02	C2H2 zinc finger transcription factors 2	0.000325
V\$SP1F	Transcription factor Sp1	0.001828
V\$GCMF	Chorion-specific transcription factors with a GCM DNA binding domain	0.003063
V\$GLIF	Growth factor independence transcriptional repressor	0.026326
V\$PAX6	Paired box protein Pax-6	0.029237
V\$E2FF	E2F-myc activator/cell cycle regulator	0.036049
V\$KLFS	Krueppel like transcription factors	0.042165

Tabela 13. Fatores de Transcrição presentes nas Famílias das Matrizes dos Fatores de Transcrição associados aos genes diferencialmente expressos nas células de Sertoli expostas ao TCDD. Cada coluna representa uma matriz de TFBS e os seus respectivos fatores de transcrição. Os Fatores de Transcrição que estão destacados em vermelho representam aqueles em comum entre os sítios de ligação dos Fatores de Transcrição encontrados em ambos os genes diferencialmente expressos e os microRNAs.

V\$ZF02	V\$SPIF	V\$GCMF	V\$GLIF	V\$PAX6	V\$E2FF	V\$KLF5
ZBTB7A	CDCA7L	GCM1	GLI1	PAX4	E2F1*	KLF1
ZBTB7B	SP1	GCM2	GLI2	PAX6	E2F2	KLF12
ZKSCAN3	SP2		GLI3		E2F3*	KLF13
ZNF148	SP3		GLIS1		E2F4	KLF15
ZNF202	SP4		GLIS2		E2F5*	KLF17
ZNF219	SP5		GLIS3		E2F6	KLF2
ZNF281	SP8		ZIC1		E2F7*	KLF3
ZNF300			ZIC2		E2F8	KLF4*
			ZIC3		TFDP1	KLF5
			ZIC4		TFDP2	KLF6
			ZIC5		TFDP3	KLF7
						KLF8
						KLF9

4.15. RNAs transportadores (tRNAs):

Os tRNAs têm papel central na síntese de proteínas após interpretação da informação genética armazenada no DNA, que foi decodificado em RNA, eles transportam os aminoácidos para a síntese proteica. Estudos mostram que os tRNAs têm ainda funções adicionais (LI; ZHOU, 2009). Em algumas situações de estresse, a aminoacilação inativa os tRNAs. Estes tRNAs, sem carga, podem atuar como moléculas efetoras na expressão gênica global, dessa forma, o organismo em estresse pode lidar com o ambiente adverso (LI; ZHOU, 2009). A **Tabela 14** lista os tRNAs que apresentaram diferença de expressão entre os grupos controle e expostos ao TCDD. Além dos tRNAs diferencialmente expressos, foram também analisados os tRNAs mais expressos nas células de Sertoli humanas, como mostra a **Tabela 15**, utilizando apenas o grupo controle da análise.

Tabela 14. Três tRNAs estão diferencialmente expressos nas células de Sertoli humanas após a exposição ao TCDD. Os tRNAs listados são filtrados por $\text{Log}_2\text{FC} < -0,60$ ou $> 0,58$ (p -ajustado $\leq 0,05$). A coluna Log_2FC descreve a magnitude da mudança. A coluna p -aj fornece múltiplos testes corrigidos com valor- p . Três tRNAs apresentaram-se desregulados; todos foram regulados negativamente.

chrstring	ID	Log2FC	p -aj
chr16:hsa#3234131#3234204#-	tRNA-Pro-CCA	-0.83106	1.69E-05
chr16:hsa#3238094#3238167#+	tRNA-Pro-CCA	-0.83106	1.69E-05
chr6:hsa#28574933#28575007#+	tRNA-Ala-GCY_	-0.70813	1.69E-05

4.16. Os 10 tRNA mais expressos:

Tabela 15. Os 10 tRNAs mais expressos em células de Sertoli humanas. A coluna "ID" fornece os tRNAs nas amostras do grupo controle; "C1, C2 e C3" caracterizam as amostras que não foram expostas ao TCDD, os valores nessas colunas representam a expressão significativa. A coluna "Média dos Controles" representa a média de expressão das três amostras do grupo controle. tRNA-Ala-GCY é o tRNA mais expresso nas células de Sertoli humanas.

	ID	C1	C2	C3	Média dos Controles
1	tRNA-Ala-GCY	1132.787	927.9661	1148.646	1059.944
2	tRNA-Val-GTG	234.5462	212.5283	188.0659	214.6694
3	tRNA-Pro-CCA	70.86395	67.52465	64.06156	67.91111
4	tRNA-Pro-CCA	70.86395	67.52465	64.06156	67.91111
5	tRNA-Val-GTY	47.82052	40.13041	34.67326	41.64992
6	tRNA-Val-GTG	47.82052	40.13041	34.67326	41.64992
7	tRNA-Val-GTG	47.82052	40.13041	34.67326	41.64992
8	tRNA-Ser-TCA(m)	30.66408	35.82711	68.81121	42.137
9	tRNA-Ser-TCA(m)	30.66408	35.82711	68.81121	42.137
10	tRNA-Pro-CCA	12.81931	12.31729	12.09434	12.44981

4.17. Perfil do transcriptoma das células de Sertoli: comparação entre amostras humanas, camundongo e rato.

As comparações são mostradas nas **Figura 19**, **Tabela 16** e **17**.

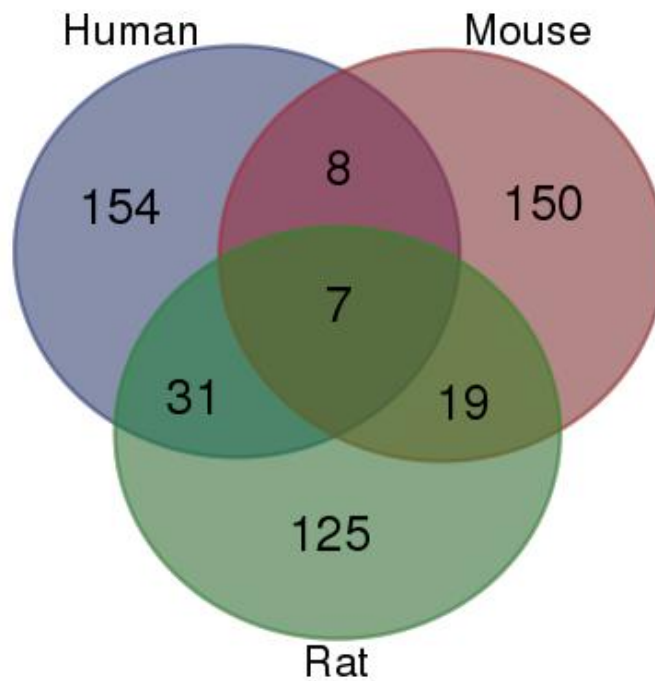


Figura 19. Diagrama de Venn mostra todas as intersecções entre os 200 genes mais expressos nas células de Sertoli nas três diferentes espécies: *Homo sapiens* (Homem), *Mus musculus* (Camundongo) e *Rattus norvegicus* (Rato). Os dados indicam que há 7 genes em comum entre as três espécies, com 15, 38, e 26 genes em comum entre homem e camundongo, homem e rato e camundongo e rato, respectivamente.

Tabela 16. Dados de *input* no Diagrama de Venn. A coluna "Espécie" descreve o nome do animal, a coluna "Número de elementos" lista o número de genes do *input* e a coluna "Número de genes exclusivos" mostra o número de genes que são homólogos entre as espécies.

Espécie	Número de elementos	Número de elementos exclusivos
<i>Homo sapiens</i>	200	200
<i>Mus musculus</i>	200	184
<i>Rattus norvegicus</i>	200	182
Número total de elementos exclusivos		494

Tabela 17. Lista dos genes mais expressos em células de Sertoli que estão em comum entre as espécies. A tabela utiliza como *input* os 200 genes mais expressos em homem, camundongo (Johnston *et al.*, 2008) e rato (ZIMMERMANN *et al.*, 2015) e evidencia quais genes estão concomitantes nas correlações acima. Há 7 genes em comum entre homem, camundongo e rato. 8 genes que são os mais expressos entre homem e camundongo, 31 genes que coincidem entre homem e rato e 19 genes em comum entre camundongo e rato (genes exclusivos entre as espécies).

Comparação entre Organismos	# elementos em comum exclusivos	genes
Homem versus Camundongo versus Rato	7	Rpl23
		Rpl26
		Rps24
		Rpl7

		Hsp90b1
		Timp2
		Psap
Homem versus Camundongo	8	Mif
		Qsox1
		Nme2
		Eef2
		Naca
		Rpl37a
		Sparc
		Rps15
Homem versus Rato	31	Tpt1
		Igfbp7
		B2m
		Rpl5
		Rps28
		Actg1
		Rps15a
		Rpl3
		Ier3
		Rps9
		Pgam1

		Rps5
		Rps16
		Rps29
		Rpl27a
		Rps11
		Rplp0
		Rpl7a
		Vim
		Eef1a1
		Itm2b
		Gnas
		Rpl11
		Rpl28
		Rps8
		Rpl4
		Rpl18a
		Rps23
		Rps27a
		Aldoa
		Rpl19
Camundongo versus Rato	19	Tsc22d1
		Eif1

	Itm2c
	Zwint
	Ctsl
	Creg1
	Gpx4
	Serpina5
	Shbg
	Ddx5
	Slc25a3
	Dbi
	Atp5b
	Npc2
	Rpl41
	Ywhaq
	Laptm4a
	Atp1b1
	Clu

5. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo comparativo que descreve os sncRNAs e os mRNAs de células de Sertoli humanas após a exposição ao TCDD. Estudos prévios demonstram que as células de Sertoli são um dos principais alvos de agentes tóxicos ambientais (Boekelheide, 2005; GAO; Mruk; Cheng, 2015). Esse tipo de célula pode ser utilizada para monitorar os efeitos dos xenobióticos na função testicular. A maioria dos estudos publicados, até o momento, mostra os efeitos do TCDD nos diferentes tipos de células após um curto tempo de exposição (por exemplo, 24 horas) (Wu *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2005; Aly and Khafagy, 2011; MacPherson *et al.*, 2013). Nosso principal objetivo foi avaliar como as células se comportam após um longo tempo de exposição ao TCDD, 72 horas, com finalidade de aproximar o nosso modelo a uma exposição crônica *in vivo*.

Para definir se o TCDD é capaz de afetar a homeostasia das células de Sertoli, decidimos analisar a atividade de enzimas antioxidantes e verificar se houve aumento do estresse oxidativo após esse tempo de exposição. JIN *et al.* (2008) demonstraram que o TCDD induziu estresse oxidativo em testículo de camundongo, através da diminuição da atividade de antioxidantes enzimáticos, o que resultou em maior nível de ROS. Estes dados são consistentes com os nossos achados. A exposição das células de Sertoli ao TCDD diminuiu a atividade de enzimas antioxidantes celulares, tais como GPx que diminuiu sua atividade nas células do nosso estudo após 72 horas de exposição ao TCDD e a CAT que diminuiu significativamente sua atividade após o mesmo tempo de exposição ao agente tóxico, indicando um desequilíbrio no sistema antioxidante, levando ao estresse oxidativo. A SOD apesar de não apresentar diminuição estatística na sua atividade nem na sua expressão, ela também apresenta sua atividade diminuída com relação ao grupo controle.

Devido à escassa literatura que explora o transcriptoma das células de Sertoli humanas e no intuito de produzir novos conhecimentos, optamos por comparar nossos resultados com outros tipos celulares previamente estudados. Os nossos resultados mostraram que, após 72 horas de exposição ao TCDD, 51 genes estão diferencialmente expressos em comparação ao grupo controle nas células de Sertoli humanas. FORGÁCS *et al.* (2013) mostraram que, após 48 horas de exposição ao TCDD, utilizando a mesma concentração (10nM), em hepatócitos humanos *in vitro*, 540 genes se apresentaram diferencialmente expressos em comparação ao controle. Um estudo recente (Houlahan *et al.*, 2015) mostrou que a exposição ao TCDD, por 23 horas, causou desregulação mínima na transcrição das

células do hipotálamo de ratos, com apenas seis genes alterados significativamente em ratos Long-Evans e 15 genes em ratos Han/Wistar. Esses resultados demonstram que as alterações na expressão gênica são dependentes do organismo, do tipo de célula e do tempo de exposição.

Também estudamos o microRNoma das células de Sertoli humanas expostas e não expostas a TCDD. Um total de 78 miRNAs apresentaram-se diferencialmente expressos quando comparamos os grupos TCDD e controle. Dentre os 78, 73 tiveram regulação positiva, incluindo mir-106b-5p, que foi predito como um possível modulador da expressão do Repressor do AhR (AHRR) por diferentes programas de bioinformática (mirDb (Wong e Wang, 2015), TargetScan (Friedman et al., 2009), Miranda (Betel et al., 2008), MirWalk (Dweep et al., 2011b)). Em nosso modelo, o gene AHRR teve sua expressão inalterada após a exposição ao TCDD, expressão que foi determinada por RNAseq e confirmada por qPCR. Já a expressão da proteína AHRR se mostrou estatisticamente diminuída após a exposição ao TCDD, demonstrando que o miR, possivelmente, se ligou parcialmente na região *seed* do mRNA não alterando sua expressão mas alterando a expressão da proteína. Esta é uma via muito importante que requer atenção uma vez que, o AHRR regula a via do TCDD. Se a expressão do AHRR estiver alterada, a resposta celular ao TCDD pode também estar comprometida. Por outro lado, um gene de muito interessante que está superexpresso em nosso modelo é o poli (ADP-ribose) polimerase induzível por TCDD (*TIPARP*). *TIPARP* é um membro da família de poli (ADP) -ribose polimerase (PARP) que utiliza NAD como substrato para transferir ADP-ribose para proteínas alvo (MacPherson et al., 2013). A maioria dos membros da família PARP transfere mono-ADP-ribose e não poli-ADP-ribose para os seus substratos. A ADP-ribosilação é uma modificação pós-traducional envolvida em vários processos biológicos, tais como a função das células imunes, a regulação da transcrição e o sistema de reparo do DNA. MacPherson et al. (2013, 2014) demonstraram recentemente que o *TIPARP* é um repressor transcricional de AhR, revelando uma nova via de *feedback* negativo na sinalização do AhR. Esta informação é extremamente importante uma vez que após 72 horas de exposição ao TCDD, as células Sertoli humanas mostraram diminuição da expressão proteica do AHRR, que é o repressor canônico da via do AHR, no entanto, a superexpressão da *TIPARP* sugere que possivelmente a via de repressão do AhR é feita por esta proteína, corroborando com as descobertas de MacPherson.

Dentre os genes que se apresentaram diferencialmente expressos está o citocromo P4501B1 (*CYP1B1*), que também é super expresso como resultado da ativação do AhR pelo TCDD. A maioria dos estudos que correlacionam a ação do TCDD em células humanas ou em modelos animais mostrou que tanto o *CYP1A1* como *CYP1B1* estavam super expressos no grupo exposto a este agente tóxico (Mimura e Fujii-Kuriyama, 2003; Puebla-Osorio et al., 2004; Et al., 2004). Curiosamente, tal como apresentado acima, apenas *CYP1B1* e não *CYP1A1* teve sua expressão positiva. Essas diferenças são intrigantes considerando que estudos anteriores se concentraram na exposição de curto prazo (aguda), enquanto o nosso estudo foi o primeiro a analisar o efeito do TCDD em células de Sertoli humanas num longo tempo de exposição (72 horas), representando uma exposição crônica. Após a análise computacional realizada por miRWalk, miR-3613-3p foi predito como um modulador da expressão do gene *CYP1B1*. Em nosso modelo, coincidentemente a expressão do miR-3613-3p está regulada negativamente enquanto o gene alvo está super expresso, mostrando a modulação da expressão do gene pelo seu miR correspondente. É importante destacar que o CYP1B1 humano está ligado à conversão de 17 β -estradiol em 4-hydroxyestradiol, além da bioativação de muitos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) (Hayes et al., 1996). A atividade de 4-hidroxilação do estradiol é elevada nos tumores de mama e de útero, em relação aos tecidos circundantes. Isto sugere que pode haver mais CYP1B1 funcional nestes tumores e que este pode ter papel na tumorigênese, além da ativação mutagênica (Liehr et al., 1995). Até o momento, não há estudos que correlacionem o CYP1B1 com o sertolioma testicular, embora um estudo tenha relatado o envolvimento desse gene no câncer de células germinativas (Starr et al., 2005). Mandal et al. demonstraram que o CYP1B1 não contribuiu para o desenvolvimento do tumor de células de Leydig (Mandal et al., 2001). O'Neill et al. (2015) mostraram expressão regulada positivamente de TIPARP na linhagem celular LNCap (células de adenocarcinoma de próstata humana) em comparação com as células do grupo controle. Consequentemente, a regulação positiva de TIPARP e CYP1B1 corrobora com a teoria de que o TCDD poderia desempenhar um papel oncogênico em células de Sertoli humanas.

As células de Sertoli desempenham um papel fundamental na criação de microambientes essenciais para a auto-renovação das espermatogônias-tronco (SSCs) e na diferenciação celular (Rastegar et al., 2015). Rastegar et al. (2015) mostraram que as células de Sertoli na presença do Fator Inibidor de Leucemia (LIF) poderiam efetivamente manter as SSCs no estado indiferenciado e na ausência de LIF, as células de Sertoli promoveriam a

diferenciação destas células. Eles também demonstraram que na ausência de LIF, as SSCs expressaram genes primários de espermatócitos e espermátides específicos. Em nosso modelo, após 72 h de exposição ao TCDD, as células de Sertoli humanas apresentaram super expressão de *LIF* e seu miRNA modulador (miR-18a-3p) coincidentemente hipoexpresso, evidenciando a modulação da expressão do gene pelo seu miR correspondente. Se *LIF* é regulado positivamente, ele poderia interromper a espermatogênese, uma vez que manteria as células germinativas em um estado indiferenciado. Esta situação de desequilíbrio poderia levar à infertilidade masculina devido à ausência de espermatozoides maduros.

Outro gene interessante que se apresentou desregulado em nosso modelo foi o *GPR68*. O receptor 68 acoplado a proteína G e também conhecido como Proteína 1 Relacionada ao Câncer de Ovário (OCR1) é um receptor envolvido na homeostase do pH (Parry et al., 2016). Ele representa um sensor de pH osteoblástico que regula as respostas mediadas por células à acidose no osso. Mede sua ação por associação com proteínas G que estimulam a produção de fosfato de inositol (IP) e liberam cálcio das reservas intracelulares (Ludwig et al., 2003). O receptor é praticamente inativo no pH 7,8 mas totalmente ativado no pH 6,8. Funciona também como um gene supressor de metástases no câncer de próstata e está envolvido na resposta inflamatória (Parry et al., 2016). Existem poucas publicações sobre este gene/proteína e nada relacionado ao testículo. A expressão de *GPR68* está regulada positivamente nas células de Sertoli humanas após 72 h de exposição ao TCDD e seu miRNA (miR-18a-3p) regulador está hipoexpresso, mostrando o mecanismo de regulação da expressão do gene. É importante ressaltar que as células de Sertoli são dependentes da estabilidade do pH para manter a BTB funcionando corretamente. Um estudo recente demonstrou que a superexpressão de *GPR68* em células Caco-2, que é um importante modelo para barreira intestinal, resultou em aumento da formação da barreira após acidificação do ambiente (de Vallière et al., 2015). Este achado poderia explicar o possível papel do GPR68 na BTB.

Nossos dados mostram que existem vias importantes alteradas após exposição crônica ao TCDD. Vários genes estão super-expressos nas vias relacionados à resposta ao estresse e ao TCDD. Estes resultados confirmam que as vias foram ativadas pelo agente tóxico, desencadeando também expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória, como *IL1A*, *IL1B*, bem como vias relacionadas com o câncer. O TCDD está associado em vários estudos como um agente cancerígeno, especialmente no câncer de mama (CHEN et al, 2015;

PIO, 2015). Outras vias como proliferação, sinalização, crescimento e desenvolvimento celular, também têm muitos genes com expressão alterada. Todas estas vias estão diretamente relacionadas com funções específicas do AhR (Tian *et al.*, 2015). Se a fisiologia das células de Sertoli estiver comprometida, toda espermatogênese pode ser afetada, levando a infertilidade masculina.

Recentemente, várias publicações demonstram que os RNAs transportadores (tRNAs) não são moléculas estáveis em um sentido absoluto. Sob certo estresse fisiológico ou ambiental, eles são clivados em fragmentos de diferentes comprimentos no *loop* do anticódon ou no seu braço esquerdo. Essas clivagens não são um fenômeno de degradação aleatória. Em vez disso, uma nova classe de moléculas de sinalização, tais como metades de tRNAs (sitRNAs) podem ser produzidas, os quais estão estreitamente correlacionadas com a modulação da expressão gênica global (LI; ZHOU, 2009). No nosso modelo, existem 3 tRNAs, tRNA-prolina (2 locais diferentes no genoma) e tRNA-alanina, cuja expressão é regulada negativamente em comparação ao grupo controle. Considerando que o TCDD induz o estresse oxidativo celular, processo confirmado pela super expressão do *CYP1B1* e pela atividade reduzida das enzimas antioxidantes, a expressão de tRNA-prolina e tRNA-alanina pode ter sido modulada pelo estresse celular. Portanto, se esses t-RNAs são regulados negativamente, a expressão de certas proteínas, que tem esses aminoácidos específicos como códon, pode estar comprometida.

Nosso estudo também comparou a expressão de *PIWI interacting RNAs* (piRNAs) nos grupos controle e TCDD. Encontramos 30 piRNAs diferencialmente expressos entre os grupos. Os piRNAs são RNAs reguladores não-codificantes endógenos e milhões de piRNAs únicos são relatados em animais (Ghildiyal and Zamore, 2009). Embora os piRNAs, uma classe de pequenos RNAs associados a proteínas da família piwi, são geralmente expressos na linhagem germinativa (Houwing *et al.*, 2007), estudos mostram que os piRNAs poderiam ser encontrados em uma ampla gama de células somáticas (YAN *et al.*, 2011). Um estudo revelou um conjunto de piRNAs no sistema nervoso central, cujas funções foram associadas com a morfogênese espinhal (Lee *et al.*, 2011). Outros estudos sugeriram que os piRNAs podem estar envolvidos também com o câncer (Lu *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2011). Estes estudos ainda são preliminares, mas dão pistas sobre a importância dos piRNAs na regulação da expressão gênica em células somáticas. Considerando-se o contato íntimo entre as células de Sertoli e a linhagem germinativa, a alteração da expressão de certos piRNAs pode influenciar

todo o processo da espermatogênese e pode ser mais um dos efeitos deletérios da exposição ao TCDD.

Para finalizar o estudo, foi realizada a comparação do transcriptoma das células de Sertoli entre três espécies diferentes: camundongo (ZIMMERMANN et al, 2015), rato (JOHNSTON et al, 2008) e homem (relatado em nosso estudo). Ela destacou os desafios ao utilizar modelos animais para prever a resposta humana. Para este objetivo, utilizamos apenas o transcriptoma do grupo controle do nosso estudo. Dentre os 200 genes mais expressos nas células de Sertoli humanas, sete deles também foram os mais expressos entre os 200 genes mais expressos em ratos e camundongos. Entre os 200 genes mais expressos, há quinze genes em comum entre homem e camundongo, homem e rato 39 genes e camundongo e rato 26 genes. Nossos resultados são semelhantes a outros estudos que mostram que humanos e roedores compartilham semelhanças na espermatogênese, mas que estas espécies também são fisiologicamente diferentes em muitos aspectos (Amann, 2008; Hess and Renato de Franca, 2008; Xiao *et al.*, 2014). Por exemplo, para cada tipo de espermatogônias A1, os roedores produzem 4096 espermátides haplóides, enquanto que em humanos apenas 16 são produzidas (Ehmcke and Schlatt, 2006; Schlatt and Ehmcke, 2014). Roedores permanecem férteis quando a produção de espermatozoides é reduzida em 90%, mas esta redução leva a infertilidade, ou, pelo menos, subfertilidade no homem (Robaire, 2003). O baixo número de genes similares entre os mais expressos entre humanos, ratos e camundongos reflete a fisiologia de cada espécie. Isso enfatiza o cuidado ao utilizar modelos animais como substitutos para a exposição humana.

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.

Anexo I – Artigo Submetido à Revista Científica: Fertility & Sterility

Dear Professor Scarano,

Your submission entitled "Integrative transcriptome and microRNome analysis identifies dysregulated pathways in human Sertoli cells exposed to TCDD" has been received by Fertility and Sterility.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System of Fertility and Sterility as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/fns/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Sincerely,

Fertility and Sterility Editorial Office

*Manuscript(s)

[Click here to view linked References](#)

1 **1 Integrative transcriptome and microRNome analysis identifies dysregulated**
2 **2 pathways in human Sertoli cells exposed to TCDD**
3
4
5 3 Mariana A. Ribeiro^a, Molly S. Estill^b, Geysson J.Fernandez^a, Leonardo N. Moraes^a,
6
7 4 Stephen A. Krawetz^{b, c}, Wellerson R. Scarano^{a*}.
8
9
10 5 ^aDepartment of Morphology, Institute of Biosciences, UNESP- Univ. Estadual
11
12 6 Paulista, Botucatu, SP, Brazil. ^bDepartment of Obstetrics and Gynecology, Wayne
13
14 7 State University School of Medicine, Detroit, MI, United States. ^cCenter for Molecular
15
16 8 Medicine and Genetics, C. S. Mott Center for Human Growth and Development,
17
18 9 Wayne State University School of Medicine, Detroit, MI, United States.
19
20
21
22
23 10 **Running title:** Sertoli cells after exposure to TCDD
24
25
26
27
28
29 12 *** Corresponding author:**
30
31 13 Wellerson Rodrigo Scarano
32
33 14 Departamento de Morfologia
34
35 15 Instituto de Biociências – UNESP
36
37 16 Botucatu-SP
38
39 17 Zip Code 18618-970
40
41 18 Tel: +55 14 3880-0491
42
43 19 E-mail: scarano@ibb.unesp.br
44
45
46
47
48
49 22 **Capsule:**
50
51 23 Human Sertoli cells exposed to TCDD for 72h exhibited alteration of miRNAs
52
53 24 and mRNAs and consequently in important pathways that are related to crucial
54
55 25 functions of this cell type.
56
57 26
58 27
59 28
60
61
62
63
64
65

29

30 **Abstract**

31

32 **Objective:** To evaluate the mechanism of TCDD's action in human Sertoli cells,
33 through expression profiling of miRNAs and mRNAs.

34 **Design:** Experimental basic science study.

35 **Setting:** Academic research laboratory .

36 **Main Outcome Measure(s):** Human Sertoli cells were exposed to 10nM TCDD for
37 72h. Analysis of overall expression of miRNAs and mRNAs was performed in the
38 exposed and not exposed cells to TCDD by RNAseq and analysis of protein expression
39 of AHRR was done by Western blotting.

40 **Result(s):** 78 miRNAs presented altered expression, with positive regulation of 73 and
41 negative regulation of 5 miRNAs when compared to the control group. Regarding gene
42 expression profile, 51 genes were deregulated, of which 46 had positive regulation and
43 5 genes with negative regulation. Important pathways have been altered by the action
44 of TCDD as AhR pathway, GPR68, FGF2 and LIF.

45 **Conclusion(s):** There are important pathways altered after chronic exposure to TCDD.
46 Several stress pathway responsive genes are up regulated triggering genes involved in
47 inflammatory response as well as part of cancer related pathways. Other pathways,
48 such as proliferation, signaling, cell growth and development, are affected and are
49 directly related to specific functions of AhR. A novel finding is that TIPARP repress
50 TCDD pathway instead of AHRR canonical repressor which mir-106b-5p effectively
51 blocks AHRR. This has opened the door to new perspectives on the TCDD toxicity
52 pathway as it affects Sertoli cells physiology that can ultimately lead to male infertility.

53 **Key Words:** Sertoli cell, TCDD, miRNA, male fertility, AHR pathway.

54

55

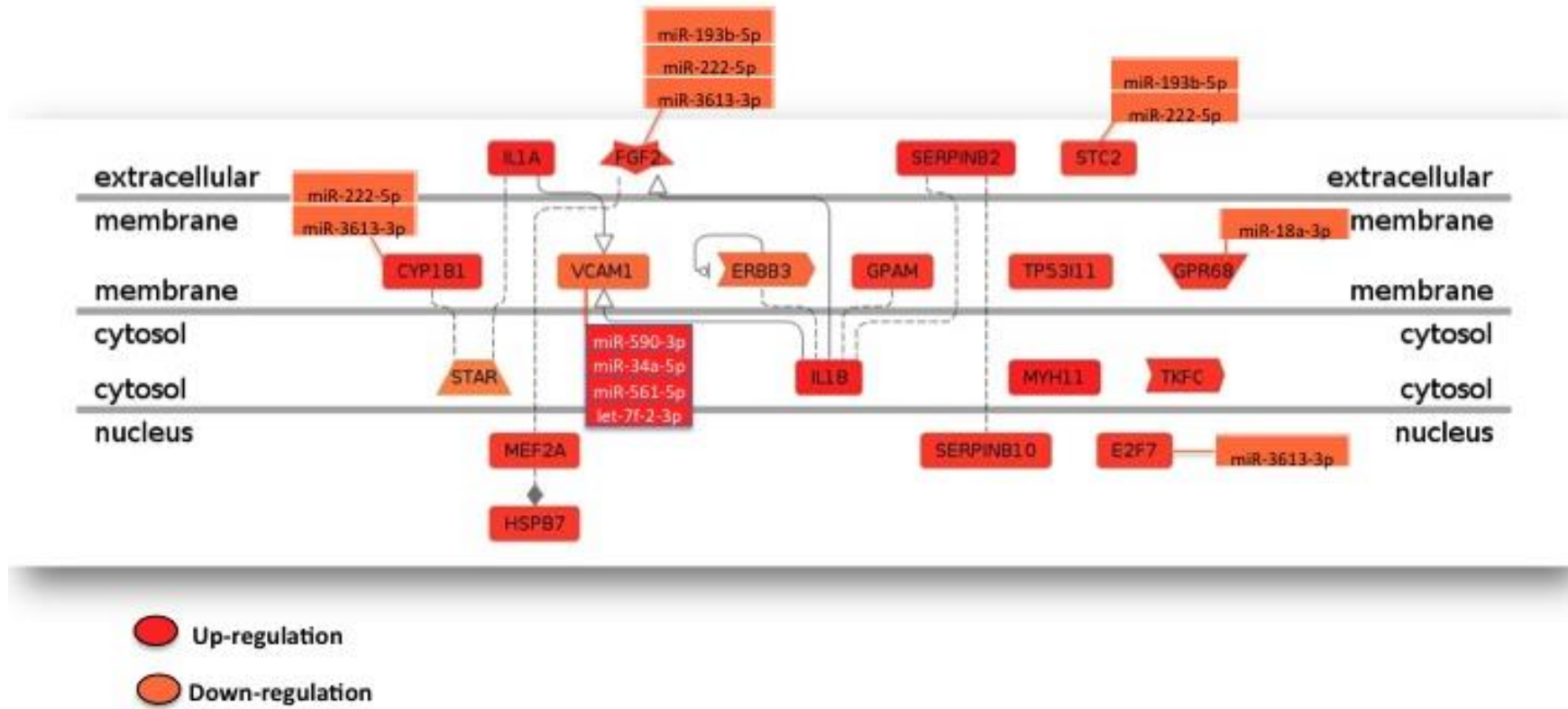
56

57

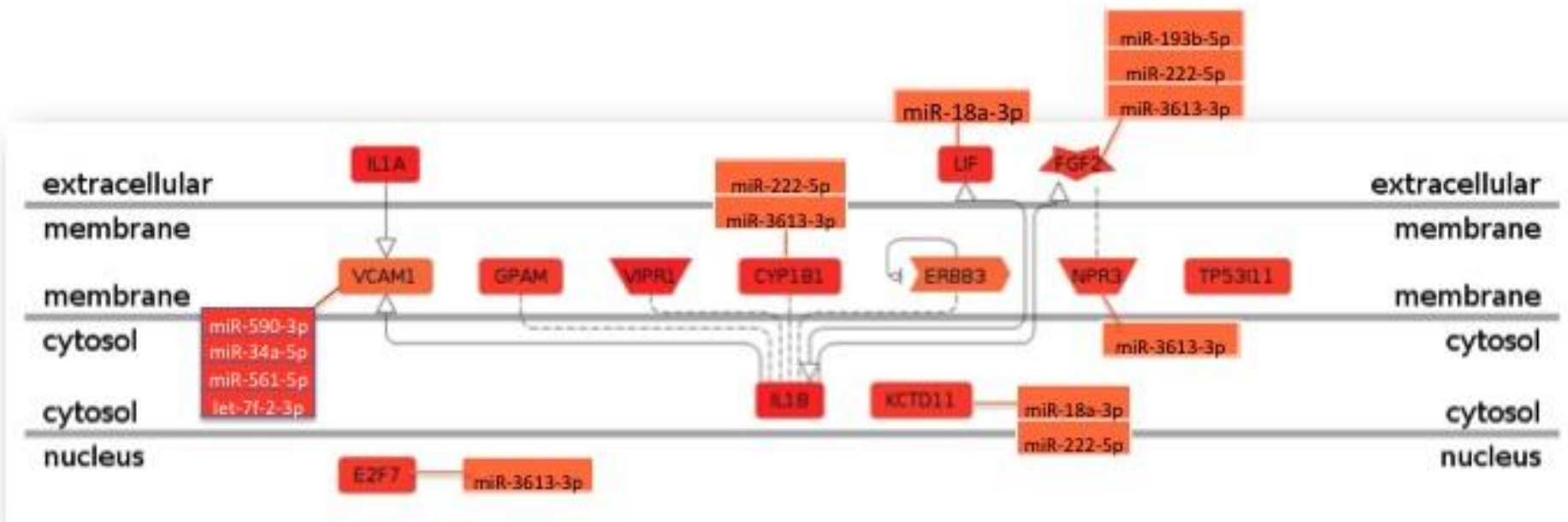
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

ANEXO II – Vias alteradas em células de Sertoli após exposição ao TCDD.

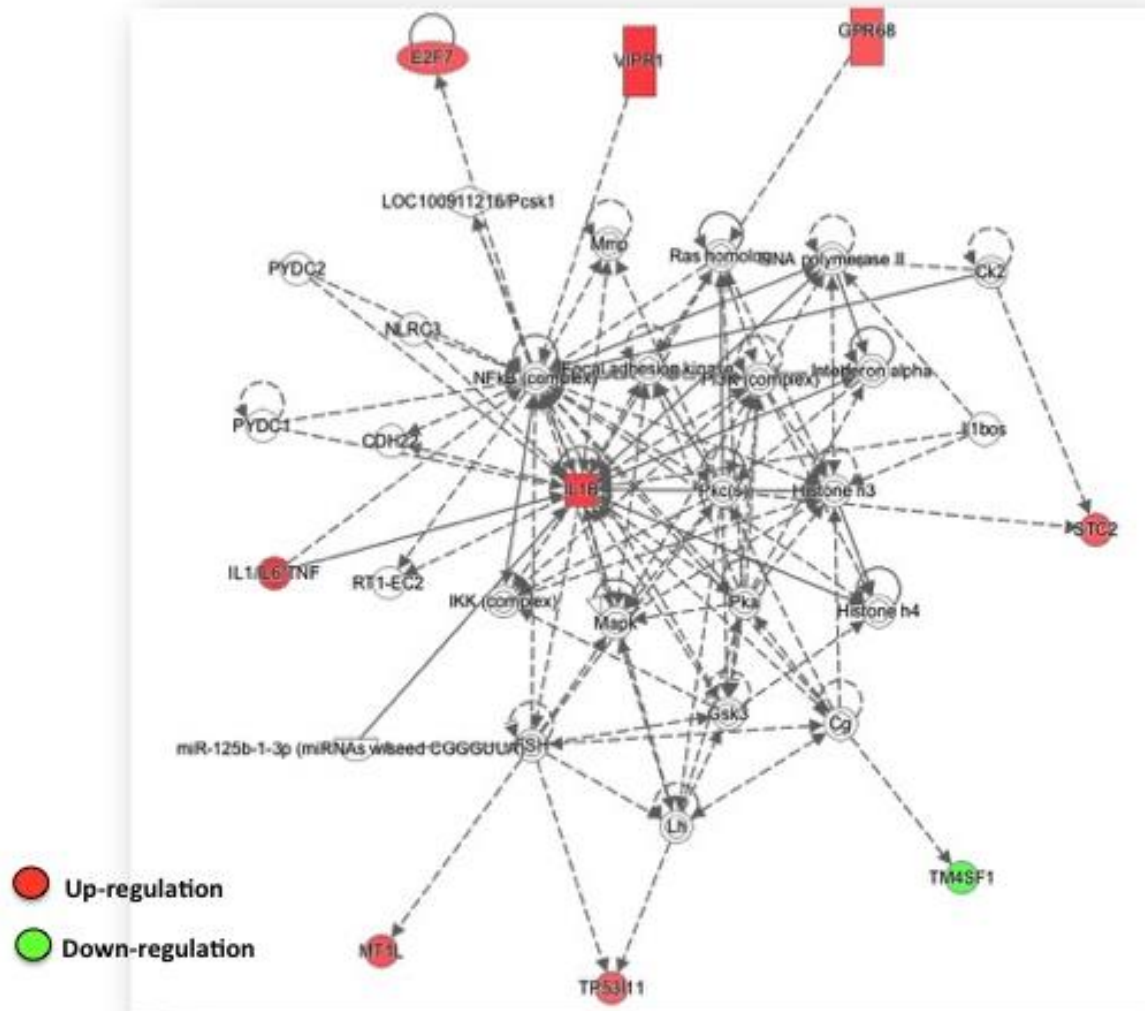
Resposta ao Estresse



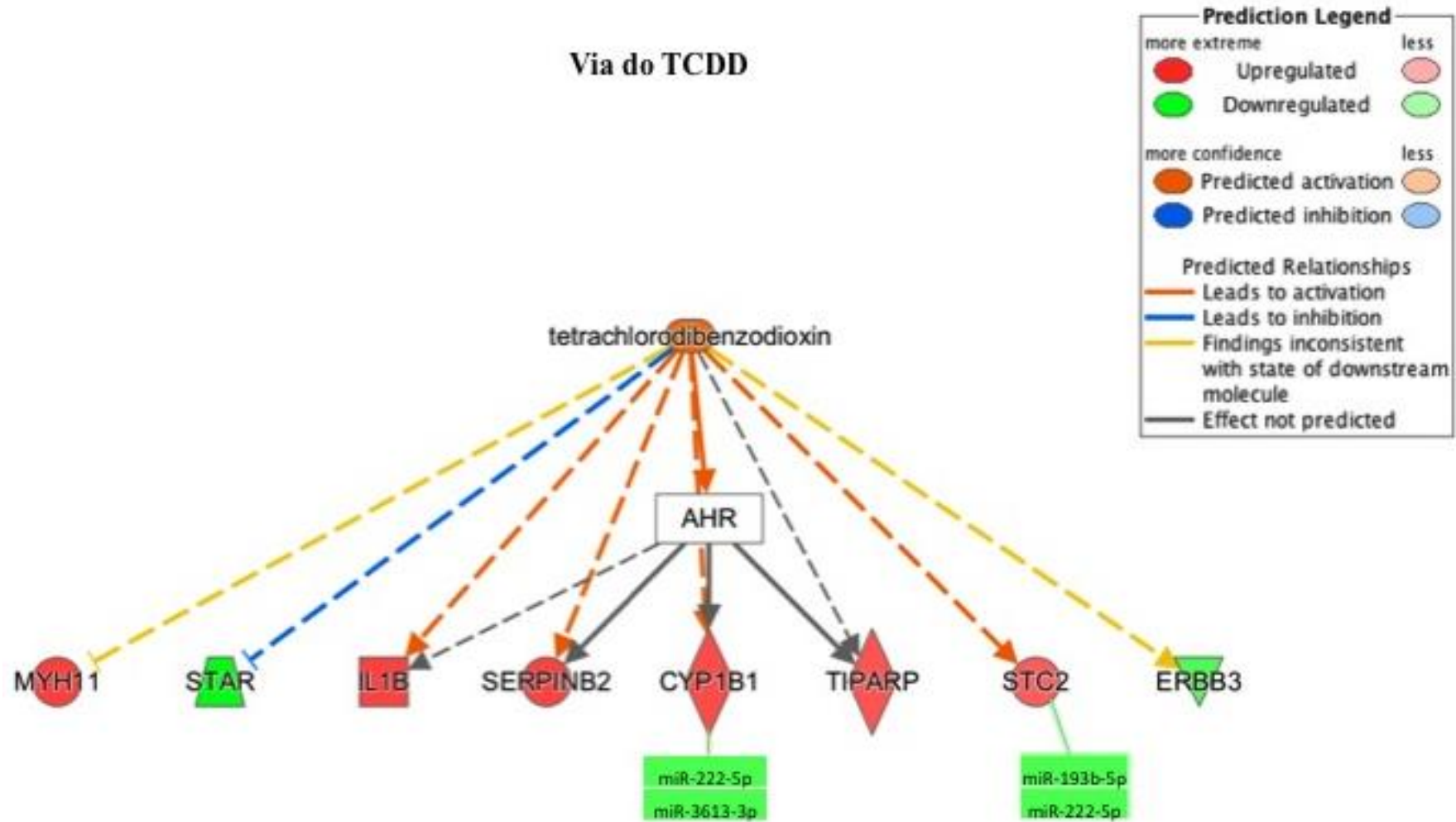
Proliferação Celular



Sinalização e interação célula-célula, Ciclo celular, Movimento celular



Via do TCDD



Cancer, crescimento e desenvolvimento celular

