

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
tese será disponibilizado
somente a partir de 01/09/2027.

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

BÁRBARA CAMPOS JORGE

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO AO BENZO(A)PIRENO NO
PERÍODO JUVENIL ATÉ A PERIPUBERDADE: REPERCUSSÕES
IMEDIATAS EM RATOS MACHOS E EFEITOS
MULTIGERACIONAIS E TRANSGERACIONAIS NA PROLE SOB
PARÂMETROS REPRODUTIVOS**

BOTUCATU-SP

2023

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências de Botucatu
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia

Influência da exposição ao benzo(a)pireno no período juvenil até
a peripuberdade: repercussões imediatas em ratos machos e
efeitos multigeracionais e transgeracionais na prole sob
parâmetros reprodutivos

Bárbara Campos Jorge

Orientadora: Profa. Dra. Arielle Cristina Arena

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de
Biociências de Botucatu como requisito para a
obtenção do título de Doutora em Farmacologia e
Biotecnologia.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Arielle Cristina Arena – Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi - Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Profa. Dra. Raquel Fantin Domeniconi - Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
- UNESP

Profa. Dra. Glauro Scantamburlo Alves Fernandes – Centro de Ciências Biológicas - UEL

Botucatu - SP

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Jorge, Barbara Campos.

Influência da exposição ao benzo(a)pireno no período juvenil até a peripuberdade : repercussões imediatas em ratos machos e efeitos multigeracionais e transgeracionais na prole sob parâmetros reprodutivos / Barbara Campos Jorge. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Arielle Cristina Arena
Capes: 21000000

1. Poluentes Ambientais. 2. Benzo(a)pireno. 3. Puberdade.
4. Esteroidogênese. 5. Hormônios esteroidianos.

Palavras-chave: Contaminante ambiental; Esteroidogênese; Herança transgeracional; POHaD; Puberdade.

Dedico esta tese à Maria e ao Otávio, ao Hugo e à Arielle

AGRADECIMENTOS

Agradecer é uma forma de mostrar a gratidão e reconhecer todo o suporte acadêmico, psicológico e financeiro dado por muitos. Obrigada a todos, que de forma direta ou indireta me ajudaram na realização deste sonho. Eu nem me imaginava em um dia em ser doutora, mas hoje não me vejo fazendo outra coisa.

Quero agradecer primeiramente ao meu pai (Otávio) e à minha mãe (Maria do Carmo), por sempre acreditarem e me apoiarem em toda a minha vida, por me aconselharem e realizarem tudo o que estava em seu alcance, e o que não estava também. Amo vocês eternamente. Se eu for metade do ser humano que vocês são, eu já estou feliz. E todos os meus familiares também, obrigada. Quando estava prestes a cair, sabia que vocês estariam ali para me colocar de pé de novo.

Quero agradecer ao meu namorado, Plug, pelo companheirismo e amor, por todas as noites em claro comigo, por todos os chocolates, por me tranquilizar em todas as crises de ansiedade, por todas as risadas e por construir sua vida comigo, obrigada. Tem sido maravilhoso e incrível compartilhar minha vida com você. E, não poderia também deixar de agradecer as pessoas da minha nova família, que também sempre acreditaram em mim, mesmo quando eu não acreditava mais. Sócrates, Nairóbi e Dominic, vocês são minha vida.

Quero agradecer a todos os meus amigos e colegas de vida. Tenho em mim um pouquinho de cada um de vocês, e todas as experiências que vivemos, me fez ser quem sou hoje. Todos os momentos estarão marcados em mim para sempre.

Quero agradecer à minha orientadora, Profa. Dra. Arielle Cristina Arena, por sempre acreditar no meu potencial, pelos conselhos acadêmicos e de vida, por todas as conversas, orientações e pela compreensão. Por me dar toda a oportunidade de me desenvolver cientificamente e na área da docência. Não chegaria até aqui se não tivesse me dado a minha primeira oportunidade na carreira acadêmica no meu segundo ano de graduação, em 2014. Foram 9 anos de trabalho, orientação e companheirismo, aprendi muito neste tempo todo. Sei que não encerramos nossa relação aqui e iniciaremos uma nova fase de aprendizado e vivências que estou muito animada e ansiosa para acontecer.

Quero agradecer a todas as pessoas que passaram pelo Laboratório de Toxicologia de Produtos Naturais e Sintéticos. Primeiro à Aline, que ensinou os primeiros passos. À Murta e o Pakas, que me ajudaram a realizar o trabalho da ciclo. À Paola, Andressa, Fitinha e Flávia, pelos dias difíceis e intermináveis do Ibuprofeno. À Su e Letícia, pelas eutanásias mais animadas da Serjanina. À Marcela, Mayra e Léo, pela inesquecível e estressante experiência da Macela. Ao Léo e a Su, pela experiência maravilhosa da teratogênese. À Color, Júlia, Dayana e Ana pela parte dois do Ibuprofeno. À Bia e a Su, por voltarem a trabalhar com a diferenciação com o tamoxifeno e venlafaxina. À Ju, que topou a loucura de fazer as pipers comigo. À Velma, por realizar o BaP fêmeas e a diferenciação e terato da ondansetrone mesmo durante a pandemia. À Lívia e a Laura por conduzirem muito bem mais plantas. À Ju, pelo trabalho maravilhoso com o LDX. À Bia e a Lê por mais diferenciação e camundongos. Todos esses projetos e cada um em especial me fizeram crescer, aprender e amar cada vez mais o meu trabalho.

Quero agradecer, logicamente, as pessoas essenciais para a realização dessa tese. Primeiro à Profa. Arielle, que abraçou a ideia do projeto e me deixou à vontade para

escolher com o que eu queria trabalhar. À Velma, Ju, Jéssica, Lab, Bia e Su por colocarem a mão na massa comigo, por todos os biotérios e experimentos. E todos os laboratórios que abriram as portas para que eu desenvolvesse parte dos meus experimentos.

Quero agradecer aos animais utilizados no estudo, por contribuírem para a formação de novos conhecimentos. Sempre tratarei vocês com o maior respeito e da forma mais ética possível.

Quero agradecer ao Prof. Dr. Rafael Nóbrega e Maira por abrir seu laboratório para a parceria na realização da técnica de PCR. Agradecer ao Prof. Dr. Barbisan e ao Guilherme por tentar a padronização do cometa. Agradecer à Profa. Dra. Valéria e ao Hélio, pelo auxílio com o Multiplex. Agradecer ao Prof. Dr. Francisco, à Profa. Dra. Patrícia, à Vanessa e à Alana pela técnica de estresse oxidativo. À Profa. Dra. Wilma e ao Jorge, pela ajuda com as imuno-histoquímicas.

Quero agradecer a todo suporte dado pelo Instituto de Biociências de Botucatu e do departamento de Morfologia. Especialmente ao José Eduardo, pela amizade, fabricação das lâminas histológicas e todo suporte científico dado. À Luciana, sempre disposta a ajudar. E ao Helton, pela ajuda com o Biotério

Quero agradecer ao Programa de Pós-Graduação de Farmacologia e Biotecnologia por aceitarem e darem apoio a nossa pesquisa. Ao Prof. Dr. Érick, por todo o aprendizado e paciência na matéria de Farmacologia Endócrina e suporte acadêmico.

Quero agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro com a bolsa de estudos no doutorado (nº do processo: 140826/2019-0) e reserva técnica durante os dois primeiros anos.

Quero agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro com a bolsa de estudos no doutorado (nº do processo: 2019/03264-5) e reserva técnica durante os dois últimos anos.

Quero agradecer novamente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro em forma de auxílio à pesquisa (nº do processo: 2019/03284-6) dada à Profa. Dra. Arielle para o desenvolvimento deste trabalho.

Quero agradecer aos professores Anthony, Marina e Patrícia Pinheiro e aos membros suplentes que aceitaram em fazer parte da banca da qualificação e dar suas valiosas contribuições. E, por último, aos professores que aceitaram o convite para fazer parte da banca de defesa, Profa. Arielle Arena, Prof. Luiz DiStasi, Profa. Raquel, Profa. Fabiana e a Profa. Glaura, por se disponibilizarem a contribuir com a tese. Muito obrigada!

RESUMO

Introdução: O benzo(a)pireno (BaP) é uma substância formada pela combustão incompleta de compostos orgânicos e está difundido no ambiente de forma ubíqua. Além disso, é uma substância com potencial de desregulação endócrina que pode alterar a geração que foi diretamente exposta à injúria (F0), assim como a geração seguinte (F1). A exposição humana ao BaP é dada através de várias vias e, utilizando um modelo experimental de roedores, avaliamos o BaP em baixa dose, com ênfase no sistema reprodutor, durante o período juvenil e a peripuberdade (janela crítica de desenvolvimento dependente de hormônios). Desse modo, esse estudo avaliou as consequências da exposição paterna (geração F0) ao BaP, desde o período juvenil à peripuberdade, nas gerações F0, F1 e F2 em parâmetros reprodutivos em ratos. Ademais, visamos contribuir com novos achados para o paradigma das origens paternas da saúde e da doença (POHaD), um campo pouco explorado e altamente relevante para a toxicologia da reprodução. **Material e métodos:** Ratos machos Wistar (Dia pós-natal (DPN) 23) foram distribuídos em dois grupos (n=16 animais/grupo): grupo controle (óleo de milho + DMSO - veículo) e grupo exposto ao BaP (veículo + 0,1 µg/kg/dia de BaP). O tratamento ocorreu durante 31 dias consecutivos, por via oral (gavage). No DPN 54, metade dos animais foram mortos para a avaliação imediata em parâmetros toxicológicos e reprodutivos (n=8/grupo). No DPN 120, os ratos foram acasalados (geração F0 – n=8/grupo) com fêmeas não tratadas para obtenção da geração F1 (machos e fêmeas). Na vida adulta da geração F1, os machos foram acasalados com fêmeas não tratadas para obtenção da geração F2 da linhagem paterna (PF2) e as fêmeas da geração F1 foram acasaladas com machos não tratados para obtenção da geração F2 de linhagem materna (MF2); em ambas as linhagens, PF2 e MF2, avaliamos pontos-chaves para a avaliação da toxicologia reprodutiva. Na vida adulta (DPN 120) dos machos das gerações F0, F1 e F2, avaliamos os níveis hormonais, enzimas esteroidogênicas testiculares, estresse oxidativo no testículo e marcadores de proliferação e apoptose nos túbulos seminíferos. **Resultados:** No DPN 54, os animais apresentaram diminuição do peso relativo do rim, do fígado e diminuição de leucócitos. Além disso, houve uma redução no diâmetro, altura dos túbulos seminíferos e testosterona sérica (Ts), alterando a dinâmica espermatogênica, bem como ocorreu uma atrofia das células de Leydig (CL) e um aumento nos níveis de FSH. Todas as enzimas esteroidogênicas e proteínas transportadoras avaliadas foram reduzidas, exceto a proteína StAR no testículo. A expressão da *gstp1* e *ckit* foram diminuídas. Os níveis de antioxidantes (GSH, SOD e *selk*) foram aumentados, enquanto o MDA foi diminuído no testículo do grupo BaP. Em relação à geração PF2, os machos do grupo BaP mostraram uma diminuição na distância anogenital no DPN 1, assim como uma redução do potencial de fertilidade, dos espermatozoides do tipo A e do número de CL. As fêmeas do grupo BaP da geração PF2 apresentaram puberdade precoce, diminuição no *score* de lordose na fertilidade, além de alterações morfológicas do ovário/útero. Já em relação à geração MF2, os filhotes apresentaram um aumento do peso corporal em DPN 1 em ambos os sexos. Os machos da MF2 apresentaram um atraso na puberdade, alteração do peso dos filhotes no teste de fertilidade, redução dos níveis de FSH e aumento da testosterona intratesticular (Ti), além da diminuição do espermatozoide do tipo A, perturbações histológicas no epidídimo, redução da 5 α-redutase, aumento da proliferação testicular e aumento das enzimas antioxidantes testiculares no grupo BaP. As fêmeas da geração MF2 mostraram aumento da espessura uterina, diminuição da atividade sexual e diminuição da progesterona. Em relação às avaliações realizadas na vida adulta dos machos (DPN 120) das três gerações (F0, F1 e PF2) obtivemos os seguintes resultados: o MDA foi aumentado em todas as gerações do grupo BaP. FSH e LH diminuíram na F0 e

a Ts e Ti diminuíram nas gerações F0 e F2. As enzimas esteroidogênicas e as proteínas transportadoras não foram alteradas na F0. No grupo BaP da F1, apenas a enzima 17 β -HSD foi diminuída. Na geração PF2, todas as enzimas e proteínas avaliadas foram diminuídas, exceto a *cyp17a1*. Na F1 e PF2, os marcadores de proliferação celular (PCNA e *ckit*) foram diminuídos nos túbulos seminíferos. A expressão de Bax foi aumentada na F1 e F2, enquanto Bcl-2 foi aumentada apenas na geração F0 do grupo BaP. **Conclusões:** O BaP provocou várias alterações reprodutivas na geração F0, F1, PF2 e MF2 que foram prejudiciais em níveis diferentes para a fertilidade destes animais. Além disso, reforçamos a necessidade de ampliação nos estudos sobre o paradigma de POHaD e a relevância paterna na saúde da prole.

Palavras-chave: herança transgeracional, POHaD, esteroidogênese, contaminante ambiental, puberdade, toxicologia da reprodução.

ABSTRACT

Introduction: Benzo(a)pyrene (BaP) is a substance formed by the incomplete combustion of organic compounds and is ubiquitously spread in the environment. Moreover, it is a substance with endocrine-disrupting potential that can alter the generation that was directly exposed to the injury (F0) as well as the next generation (F1). Human exposure to BaP is given through several pathways, and using an experimental rodent model, we evaluated low dose BaP with emphasis on the reproductive system during the juvenile and peripubertal period (development critical window of hormone dependent). Thus, this study evaluated the consequences of paternal (F0 generation) exposure to BaP, from juvenile to peripuberty, in F0, F1 and F2 generations on reproductive parameters in rats. Furthermore, we aimed to contribute new findings to the paradigm of the paternal origins of health and disease (POHaD), an under-explored field highly relevant to reproductive toxicology. **Materials and methods:** Male Wistar rats (Postnatal Day (PND) 23) were distributed into two groups (n=16 animals/group): control group (corn oil + DMSO - vehicle) and BaP-exposed group (vehicle + 0.1 µg/kg/day BaP). Treatment occurred for 31 consecutive days, orally (gavage). On PND 54, half of the animals were killed for immediate evaluation in toxicological and reproductive parameters (n=8/group). On PND 120, the rats were mated (F0 generation - n=8/group) with untreated females to obtain the F1 generation (males and females). In the adult life of the F1 generation, males were mated with untreated females to obtain the paternal lineage F2 generation (PF2) and females of the F1 generation were mated with untreated males to obtain the maternal lineage F2 generation (MF2); in both lineages, PF2 and MF2, we evaluated key points for the evaluation of reproductive toxicology. At adulthood (PND 120) of males of the F0, F1 and F2 generations, we evaluated hormone levels, testicular steroidogenic enzymes, oxidative stress in the testis and markers of proliferation and apoptosis in the seminiferous tubules. **Results:** On PND 54, the animals showed a decrease in the relative weight of the kidney and liver and a decrease in leukocytes. In addition, there was a reduction in diameter, height of the seminiferous tubules and serum testosterone (sT), altering spermatogenic dynamics, as well as Leydig cell (LC) atrophy and an increase in FSH levels. All steroidogenic enzymes and transporter proteins evaluated were reduced, except for StAR protein in the testis. Expression of *gstp1* and *ckit* were decreased. The levels of antioxidants (GSH, SOD and *selk*) were increased, while MDA was decreased in the testis of the BaP group. Regarding to the PF2 generation, males in the BaP group showed a decrease in anogenital distance on PND 1, as well as a reduction in fertility potential, type A sperm and CL number. The females of the BaP group of the PF2 generation showed precocious puberty, decreased lordosis score in fertility, and morphological alterations of the ovary/uterus. As for the MF2 generation, the pups showed an increase in body weight on PND 1 in both sexes. The MF2 males showed a delay in puberty, altered weight of the pups in the fertility test, reduced FSH levels and increased intratesticular testosterone (iT), in addition to decreased type A sperm, histological disturbances in the epididymis, reduced 5 α-reductase, increased testicular proliferation, and increased testicular antioxidant enzymes in the BaP group. MF2 generation females showed increased uterine thickness, decreased sexual activity and decreased progesterone. Regarding the evaluations performed in the adult life of males (PND 120) of the three generations (F0, F1 and PF2) we obtained the following results: MDA was increased in all generations of the BaP group. FSH and LH decreased in F0 and sTs and iT decreased in F0 and F2 generations. Steroidogenic enzymes and transporter proteins were not altered at F0. In the BaP group of F1, only the 17β-HSD enzyme was decreased. In the PF2 generation, all enzymes and proteins evaluated were

decreased except *cyp17a1*. In F1 and PF2, cell proliferation markers (PCNA and *ckit*) were decreased in the seminiferous tubules. Bax expression was increased in F1 and F2, while Bcl-2 was increased only in the F0 generation of the BaP group. **Conclusions:** BaP caused several reproductive changes in the F0, F1, PF2 and MF2 generation that were detrimental at different levels to the fertility of these animals. Furthermore, we reinforce the need for expansion in studies on the POHaD paradigm and paternal relevance to offspring health.

Keywords: transgenerational inheritance, paternal origin of health and disease, steroidogenesis, environmental pollution, puberty, reproductive toxicology.

Resiliência não é sobre ter pressa. Ser resiliente é seguir a diante, seja na velocidade que for. É não ter medo de errar e recomeçar. É sobre adaptar-se quando for preciso.

LISTA DE ABREVIATURAS

AhR – receptor de hidrocarboneto de arila
AMH - hormônio antimülleriano
AMPc – adenosina monofosfato cíclico
ARNT – translocador nuclear do hidrocarboneto de arila
BaP - benzo(a)pireno
BPDE – benzo(a)pireno-diol-époxi
CAT - catalase
CG – células da granulosa
CGP – células germinativas primordiais
CL - células de Leydig
CL - células de Leydig
CS – células de Sertoli
CT – células da teca
DDT – dicloro-difenil-tricloroetano
DE – desreguladores endócrinos
DG - dia gestacional
DPN – dia pós-natal
FSH - hormônio folículo estimulante
GSH - glutatona reduzida
HAP – hidrocarboneto aromático policíclico
HHG – hipotálamo-hipófise-gônada
LDL – lipoproteína de baixa densidade
LH - hormônio luteinizante
LHRH - hormônio liberador do hormônio luteinizante
MDA - malondialdeído
MF2 - geração F2 de linhagem materna
OP – ovócitos primários
PF2 - geração F2 de linhagem paterna
POHaD - paradigma das origens paternas da saúde e da doença
ppb – partes por bilhão
proteína Star - proteína reguladora aguda esteroidogênica
SC – espermatócito
SF1 - fator de transcrição 1
SF1 – fator esteroidogênico 1
SG – espermatogônia
SOD - superóxido dismutase
StAR – proteína reguladora aguda esteroidogênica
SZ - espermatozoide
T – testosterona
Ti - testosterona intratesticular
Ts - testosterona sérica
VLDL – lipoproteínas de muito baixa densidade

ABBREVIATIONS LIST

ABP - androgen binding protein
AGA – adequate for gestational day
AGD – anogenital distance
AHH - aryl hydrocarbon hydroxylase
ALP – alkaline phosphatase
ALT – alanine aminotransferase
APA – adequate for pregnancy age
AST – aspartate aminotransferase
BaP – benzo(a)pyrene
BSA – bovine serum albumin
BTB – blood-testicular barrier
CAT – catalase
CEUA - Ethics Committee on Animal Use
CONCEA - Ethical Principles of the National Council for the Control of Animal Experimentation
CYP – cytochrome P450
DCW – developmental critical windows
DHT – dihydrotestosterone
DMSO - dimethyl sulfoxide
DOHaD – development origins of health and disease
DSP – daily sperm production
EDC – endocrine disrupting chemical
F0 – paternal generation
FSH – follicle-stimulating hormone
GD – gestational day
GEH – germinal epithelium height
GGT – gamma-glutamyl transferase
GSH – reduced glutathione
H&E – hematoxylin and eosin
HHG – hypothalamic-pituitary-gonadal
HSD – hydroxysteroid dehydrogenases
IMM – inner membrane in mitochondria
LC – Leydig cell
LCn – Leydig cell nuclei
LGA – large for gestational age
LH – luteinizing hormone
LHR – luteinizing hormone receptor
LPA – large for pregnancy age
LQ – lordosis quotient
MCH – mean corpuscular hemoglobin
MCHC – mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV – mean corpuscular volume
MDA – malondialdehyde
MF2 – F2 generation of maternal line
ncRNA – noncoding RNA
OMM – outer membrane in mitochondria
P,p'-DDE dichlorodiphenyldichloroethylene
PAH – polycyclic aromatic hydrocarbon
PCNA – proliferating cell nuclear antigen

PF2 – F2 generation of paternal line
PND – post natal day
POHaD – paternal origins of health and disease
POP – persistent organic pollutant
Q1-Q3 – interquartile range
RBC – red blood cells
RIA – radioimmunoassay
ROS –reactive oxygen species
SD – standard deviation
SEM – standard error mean
SGA – small for gestational age
SM – supplementary material
SOD – superoxide dismutase
SPA – small for pregnancy age
ST – seminiferous tubules
StAR – Steroidogenic acute regulatory protein
STsD – seminiferous tubules diameter
TBA – thiobarbituric acid
TSPO - translocator protein
VDAC1 – voltage-dependent anion channel 1

LISTA DE TABELAS

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

Tabela 2 – Comparação cronológica dos estágios de desenvolvimento dos ovários em ratas e humanos.

Tabela 3 - Aspectos estruturais e morfológicos da ovogênese.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo espermatogênico dos ratos.

Figura 2 - Possíveis modos de ação carcinogênica do BaP.

Figura 3 - Esquema representando a esteroidogênese gonadal e da adrenal.

Figura 4 - Possíveis mecanismos pelos quais a fumaça de cigarro pode afetar o sistema reprodutor masculino.

Figura 5 - Esquema de exposições ambientais multigeracionais versus transgeracionais.

Figura 6 - Janelas de suscetibilidade para mudanças epigenéticas induzidas ambientalmente através da linhagem germinativa paterna.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
1. Desenvolvimento ontogenético do sistema genital	15
1.1. Desenvolvimento pré-natal do testículo em ratos.....	16
1.2. Desenvolvimento pós-natal do testículo em ratos	17
1.3. Desenvolvimento pré-natal do sistema genital feminino em ratas.	20
1.4. Desenvolvimento pós-natal do sistema genital feminino em ratas.....	20
2. Peripuberdade como janela susceptível do desenvolvimento em estudos toxicológicos..	24
3. Desreguladores endócrinos	25
4. Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos.....	25
5. Benzo(a)pireno	26
5.1. Toxicocinética.....	27
5.2. Possíveis modos de ação do BaP	28
6. Benzo(a)pireno, sistema genital masculino e epigenética.....	30
7. Epigenética e os desreguladores endócrinos	32
8. Herança transgeracional provocada pelos desreguladores endócrinos	33
9. Programação do organismo e contribuição paterna	34
10. Dados já publicados utilizando o mesmo modelo experimental	36
11. Justificativa.....	37
12. Hipótese.....	38
13. Objetivo geral	39
13.1. Objetivos específicos.....	39
REFERÊNCIAS	40
CAPÍTULO I – “Exposure to environmentally relevant dose of benzo(a)pyrene in juvenile male rats generated reproductive deleterious effects by impairment of steroidogenic machinery and testicular oxidative imbalance”.	49

CAPÍTULO II – “Indirect exposure to low-dose benzo(a)pyrene of the F1 generation by the paternal line decreases fertility and causes reproductive impairment of both sex of the F2 generation in rats”.....	86
CAPÍTULO III – “Reproductive outcomes of the F2 generation of the maternal line rats after their ancestral (F0) were exposed to benzo(a)pyrene”.....	131
CAPÍTULO IV – “Can low-dose benzo(a)pyrene exposure at peripuberty negatively program the reproductive system of male rats and generate transgenerational inheritance?”.....	176
CONSIDERAÇÕES FINAIS	218
APÊNDICES	220

1 INTRODUÇÃO

2 Os ciclos reprodutivos masculino e feminino envolvem processos complexos e
3 sensíveis, os quais são controlados pelo sistema endócrino. Estes processos fisiológicos podem
4 ser perturbados após exposição a compostos tóxicos exógenos em diferentes estágios do ciclo
5 e por diversos modos de ação (Moore et al., 2016), acarretando em alterações estruturais e/ou
6 funcionais. Estas alterações podem ser identificadas imediatamente após a injúria ocorrer ou só
7 na vida adulta/ senescência e, se esta injúria for capaz de atingir as células germinativas, pode
8 alterar as gerações futuras em diferentes graus de intensidade.

9 Os mecanismos pelos quais as substâncias tóxicas exógenas gera toxicidade reprodutiva
10 no organismo e qual será a magnitude do dano dependem do estágio do desenvolvimento em
11 que a exposição ocorre, seja na vida intrauterina, na infância, na puberdade ou na vida adulta
12 (Mantovani e Fucic, 2014; Perobelli, 2014). As alterações reprodutivas mais frequentes incluem
13 criptorquidia, hipospadia, anomalias dos canais excretórios e de glândulas acessórias, tumores
14 testiculares/ovarianos, espermatogênese alterada e alteração do ciclo reprodutivo (Sousa et al.,
15 2017).

16 Para se identificar as alterações causadas por agentes externos, é necessário que se
17 conheça a formação e o funcionamento normal dos órgãos de interesse no modelo experimental
18 escolhido e, assim, pode-se identificar e quantificar as possíveis alterações desencadeadas por
19 substâncias tóxicas neste grupo de indivíduos. Neste estudo, utilizamos o modelo de roedores
20 (ratos) para esta avaliação.

21

22 1. Desenvolvimento ontogenético do sistema genital

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

31 Nos mamíferos, o sistema genital surge a partir do mesoderme intermediário. Logo após
32 a formação dos ductos mesonéfricos, inicia-se a formação adjacente dos ductos
33 paramesonéfricos (Arrotia et al., 2012). Nos machos, a diferenciação sexual gonadal se
34 caracteriza através da regressão dos ductos paramesonéfricos e o desenvolvimento dos ductos
35 mesonéfricos em órgãos reprodutivos característicos do sexo masculino, como o epidídimo, os
36 ductos deferentes e as glândulas seminais. Já nas fêmeas, os ductos mesonéfricos regridem e os
37 ductos paramesonéfricos diferenciam-se para formar o útero, as tubas uterinas e a parte
38 proximal da vagina (Hannema e Hughes, 2007).

39 *1.1.Desenvolvimento pré-natal do testículo em ratos*

40 Os mamíferos apresentam uma mesma sequência de eventos para o desenvolvimento
41 testicular, diferindo-se somente no espaço de tempo. A sequência básica de maturação dos
42 testículos é: (I) formação pré-natal de cordões testiculares contendo gonócitos e células de
43 Sertoli (CS - células de sustentação do testículo); (II) transformação de gonócitos em
44 espermatogônias (células germinativas masculinas); (III) proliferação das espermatogônias e
45 das CS; (IV) maturação das CS e formação da barreira das CS; (V) desenvolvimento dos
46 espermatócitos, marcando o início da meiose; e (VI) a espermiogênese (citodiferenciação das
47 espermátides redondas para as alongadas - espermatozoides) (Picut, Ziejewski, Stanislaus,
48 2018).

49 Após a fertilização, o indivíduo XY possui o gene SRY (gene determinante de testículo
50 localizado no cromossomo Y) que é capaz de induzir a diferenciação da linhagem das células
51 de suporte em CS e, conseqüentemente, a transformação da gônada bipotencial em testículo
52 (Gubbay et al., 1990). Em roedores, do dia gestacional (DG) 10,5 ao 12,5, o gene SRY inicia a
53 indução da expressão do gene SOX9 (Sekido et al., 2008), no qual promove a organogênese do
54 testículo através da ativação de genes pró-testículo e repressão dos genes pró-ovário. A
55 expressão de *sox9* também desencadeia a cascata de genes essenciais à diferenciação das CS,
56 atuando sinergicamente com fator de transcrição 1 (SF1) para interagir com o promotor do gene
57 *amh* para iniciar a expressão do hormônio antimülleriano (AMH) (Arango, Lovell-badge,
58 Behringer, 1999). Esta expressão é mantida ao longo do desenvolvimento dos testículos por
59 meio de vários *loopings* de feedback positivo, estimulando assim a via da determinação
60 masculina gonadal (She e Yang, 2016).

61 Em conjunto, o *sox9* é essencial para o início da expressão de AMH nas CS e o *sox8*
62 reforça a função do *sox9* na regulação positiva dos transcritos do *Amh* (Lovell-badge, Canning,

63 Sekido, 2002). A expressão de *sox9* então orquestra a proliferação de CS, a expansão das células
64 somáticas, a migração e diferenciação necessárias para o desenvolvimento, a regressão dos
65 primórdios femininos (AMH) e a virilização somática (secreção de testosterona pelas células
66 de Leydig - CL).

67 Outros fatores importantes, o *fgf9* e *wnt4*, são inicialmente expressos em células de
68 suporte sexualmente indiferenciadas em ambas as gônadas XX e XY, e então sua expressão
69 dimórfica (com alta Fgf9/baixa Wnt4 na gônada XY e baixa Fgf9/alta Wnt4 na gônada XX)
70 torna-se aparente na gônada após DG 12,5 (Hiramatsu et al., 2009). Assim, o papel crucial da
71 sinalização de *fgf9* é suprimir a expressão de *wnt4* e outros genes específicos de fêmeas e, assim,
72 inibir a via feminina (Jameson, Lin, Capel, 2012). O *dmrt1* antagoniza *Foxl2* (gene específico
73 de fêmea) para manter o desenvolvimento do testículo pós-natal e o *Foxl2* também
74 reciprocamente suprime o *Dmrt1* para garantir o desenvolvimento do ovário adulto feminino
75 (Uhlenhaut et al., 2009).

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

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

91 1.2. Desenvolvimento pós-natal do testículo em ratos

92 Em roedores, horas após o nascimento (cerca de 2 horas), ocorre outro pico de
93 testosterona nos filhotes machos, e foi denominado por Picut e colaboradores (2017) como

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

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

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

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

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

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

104 *Período juvenil:* é caracterizado pelo início da espermatogênese com o desenvolvimento
105 dos espermatócitos e a diferenciação das células das linhagens germinativas dos túbulos
106 seminíferos e o início da espermiogênese. A produção de testosterona aumenta rapidamente
107 após o DPN 28, relacionando-se com a maturação das células de Leydig adultas (Picut et al.,
108 2015).

109 *Período peripubere:* há um aumento rápido e contínuo de testosterona, acompanhado
110 de um aumento acentuado do diâmetro dos túbulos seminíferos e o fim da diferenciação das
111 células germinativas, formando os espermatozoides (Picut et al., 2015) (Figura 1).

112 Após a puberdade, os ratos machos adquirem então a capacidade de produzir
113 espermatozoides. O ciclo espermatogênico dos ratos é complexo e envolve várias fases, como
114 a proliferação das espermatogônias e a espermiogênese, que ocorre nos túbulos seminíferos.

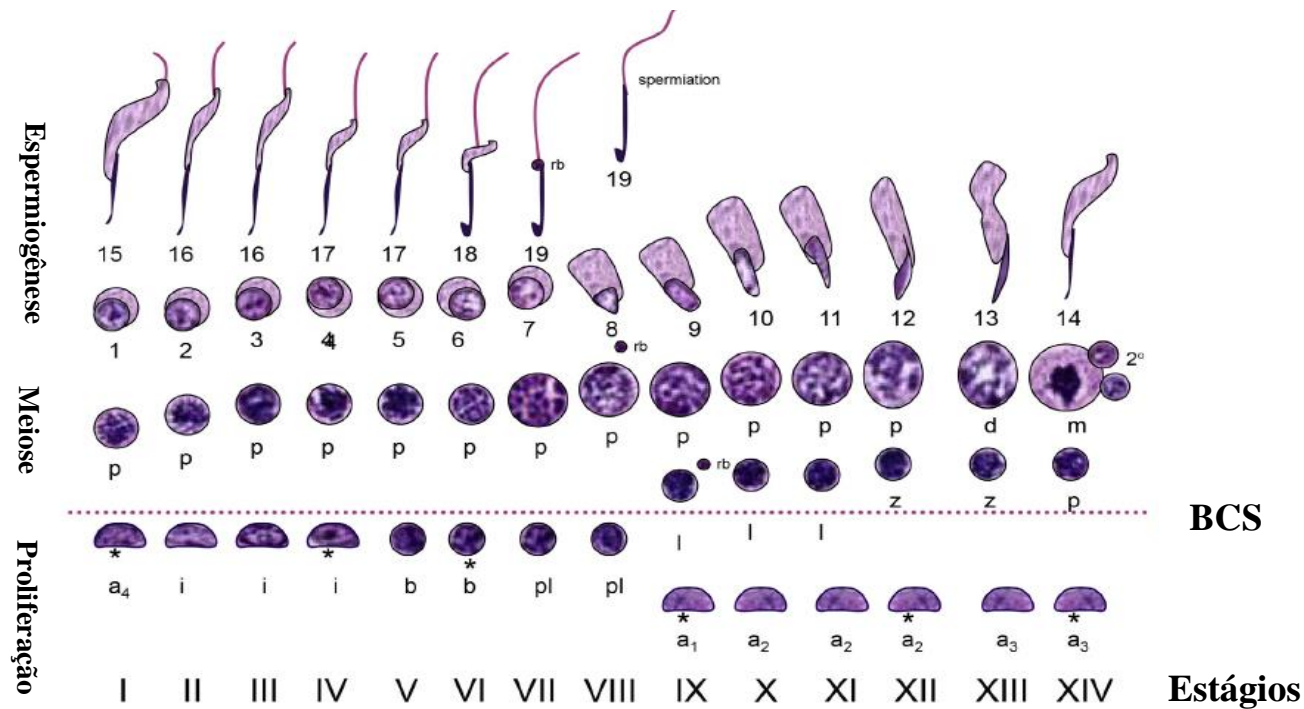


Figura 1 - Representação esquemática do ciclo espermatogênico dos ratos. A Figura 1, nos mostra as etapas (I-XIV) do ciclo e são representadas pelas colunas das células germinativas associadas. O início se dá pela espermatogônia do tipo A1 (a1) no estágio IX, passando por todo o seu desenvolvimento até a etapa de maturidade (espermátide 19) no estágio VII, ocorrendo então a espermição. Nesta representação, as letras *a*, *i*, e *b* denotam as espermatogônias do tipo A, do tipo intermediário, e do tipo B, respectivamente; os asteriscos indicam a divisão mitótica; e *pl*, *l*, *z*, *p*, *d*, *m*, e *2* denotam o pré-leptóteno, leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno, e espermátocitos secundários, respectivamente; *m*: divisão meiótica. Os numerais arábicos denotam etapas de maturação das espermátide, redonda (1-7) e alongada (8-19). BCS - barreira de células de Sertoli. Fonte: Whitney e Suttie, 2018

115 1.3. Desenvolvimento pré-natal do sistema genital feminino em ratas.

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

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

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

141 1.4. Desenvolvimento pós-natal do sistema genital feminino em ratas.

142 Nas fêmeas, há cinco períodos do desenvolvimento identificáveis, com alterações
143 microscópicas. Esses estágios incluem os períodos neonatal (DPN 0–7), infantil (DPN 8–
144 20), juvenil (DPN 21–32), peripubere (DPN 33–37) e púbere (DPN 38–46) (Tabela 2)
145 (Ojeda, Advis, Andrews, 1980; Ojeda e Skinner, 2006).

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

Tabela 2 - Comparação cronológica dos estágios de desenvolvimento dos ovários em ratas e humanos.

Período rata/humano	Ratas	Humanos
Neonatal/Recém-nascido	DPN 0 - 7	0 – 28 dias
Infantil/Bebê	DPN 8 - 20	28 dias – 2 anos
Juvenil/Infância	DPN 21 - 32	2 – 12 anos
Peripuberdade	DPN 33 - 37	ND
Púbere/Adolescente	DPN 38 – 46	12 – 16 anos

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

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

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

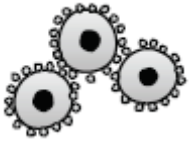
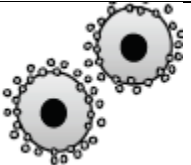
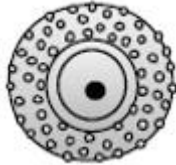
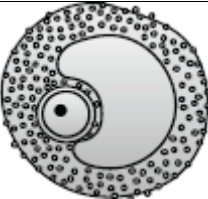
167 *Período juvenil:* a característica mais proeminente do período juvenil é a apoptose
 168 das células da granulosa e a atresia dos folículos. Os níveis séricos de FSH estão

169 continuamente diminuindo, atingindo seu nível mínimo no DPN 30 (Ojeda e Skinner,
170 2006). Os níveis de LH diminuem durante a primeira metade do período juvenil, mas ao
171 contrário dos níveis de FSH, começa a ser produzido em um padrão pulsátil e bimodal,
172 com um pequeno surto de manhã e tarde. A maturação do padrão de produção de LH
173 pulsátil e bimodal é devida ao início da retroalimentação positiva do estrógeno na
174 produção de LH por volta do DPN 24 (Davis, Travlos, McShane, 2001). Os folículos
175 corticais selecionados continuam a desenvolver-se devido, em parte, ao fato de os
176 receptores FSH/LH atingirem um nível máximo de adultos no DPN 30, resultando em
177 maior sensibilidade de certos folículos a níveis relativamente baixos de FSH sérica (Nicol
178 e Yao 2015).

179 *Período peripubere:* se dá a partir do aparecimento do folículo Graff (0,9 a 1,0
180 mm de diâmetro) no córtex externo (Picut, 2017). Esse período dura de 3 a 5 dias e é
181 definido como o momento em que há a secreção de LH em surtos, facilitando o
182 desenvolvimento de folículos Graff. Os níveis de FSH aumentam somente após o DPN
183 35 (Ojeda e Skinner, 2006).

184 *Período púbere:* é marcado como a primeira ovocitação de folículos de Graff (0,9
185 a 1,0 mm de diâmetro), formando os corpos lúteos. Ocorre um mini surto nos níveis de
186 LH, sendo dependente da maturação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG), tendo
187 assim níveis suficientes de estradiol sérico (Picut, 2017). O estradiol atua de maneira
188 positiva tanto no hipotálamo quanto na liberação do hormônio liberador do hormônio
189 luteinizante (LHRH) e na hipófise anterior, sensibilizando as células secretoras de LH ao
190 efeito estimulatório da LHRH (Davis, Travlos e McShane, 2001). Durante esse estágio
191 tardio do desenvolvimento folicular, os ovócitos primários (após a obtenção dos
192 cromossomos 4N) entram em sua primeira divisão meiótica e expelem um corpúsculo
193 polar. Portanto, na ovocitação, um ovócito secundário diploide é lançado para o oviduto.
194 O processo de ovogênese está resumido na Tabela 3.

Tabela 3 - Aspectos estruturais e morfológicos da ovogênese.

Folículo primordial	Folículo primário	Folículo secundário/ crescimento	Folículo de Graff/ antral
			
Estrutura folicular			
OP cercados por uma única camada achatada de CG.	OP cercado pela zona pelúcida (secretada pelas CG) e uma camada de GC com o formato cuboide.	OP rodeado por múltiplas camadas de GC com formato cuboide, mais as camadas internas e externas de CT.	A CG prolifera e produzem o fluido ovariano, formando o antro. As CGs que circundam o agora OS se diferenciam em coroa radiata e o cumulus oophorus mantém a ligação entre o oócito e o folículo.
Aspectos funcionais			
Formado na vida pré-natal e o OP está parado na meiose I.	Estágio independente de gonadotrofina: deslocamento cuboide por estímulos intra-ovarianos.	Estágio dependente de gonadotrofina: expressão aumentada dos receptores de FSH e de estrogênio nas CG. CT interna sintetiza andrógenos que podem ser então aromatizados por CG.	Funcionalmente preparado para a ovulação e transformação do OP para OS parados em metáfase II. A corona radiata e oophorus cumulus são expelidos junto ao oócito durante a oocitação.

Adaptado de Nicol e Yao (2015). OP: oócitos primários; OS: oócitos secundários; CG: células da granulosa; CT: células da teca

195 Como todos os processos de formação dos órgãos reprodutores são altamente
196 dependentes de hormônios e de uma complexa rede de ativação/repressão gênica que
197 necessita ocorrer no intervalo de tempo correto, qualquer interferência neste processo
198 pode gerar alterações significativas na fertilidade destes animais na vida adulta (Picut,
199 Ziejewski, Stanislaus, 2018). Estes períodos sensíveis a modificações permanentes nos
200 órgãos são chamados de janelas críticas do desenvolvimento, e são de grande importância
201 para os estudos toxicológicos (Mantovani e Fucic, 2014). No entanto, apesar da
202 importância destas fases, há uma escassez na literatura sobre os impactos de substâncias
203 tóxicas durante o período juvenil até a peripuberdade, tornando-se relevantes estudos
204 nesta área (Perobelli, 2014).

REFERÊNCIAS

- Agency for Toxicological Substances and Disease Registry (ATSDR). 1990. Toxicological Profile for Benzo[a]pyrene. US Department of Health and Human Services. Atlanta GA, US.
- Agency for Toxicological Substances and Disease Registry (ATSDR). 1995. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. US Department of Health and Human Services. Atlanta GA, US.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2009. “Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs).” *Case Studies in Environmental Medicine*, 1–68.
- Anderson D, Thomas S, Baumgartner A. 2014. “Male-Mediated Developmental Toxicity.” *Asian Journal of Andrology*. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.122342>.
- Arey J and Atkinson R. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. Photochemical reactions of PAH in the atmosphere, in: P.E.T. Douben (Ed.), PAHs: an ecotoxicological perspective, John Wiley and Sons Ltd, New York, 2003, 47–63.
- Arango, Nelson A, Robin Lovell-badge, and Richard R Behringer. 1999. “Targeted Mutagenesis of the Endogenous Mouse Mis Gene Promoter : In Vivo Definition of Genetic Pathways of Vertebrate Sexual Development.” *Cell* 99: 409–19.
- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*. 308:1466–9.
- Arrotia, Klen, Patrick Garcia, Mainara Barbieri, Marlia Justino, and Luis Violin. 2012. “The Epididymis: Embryology, Structure, Function And Its Role In Fertilization And Infertility.” *Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics*. <https://doi.org/10.5772/35847>.
- Arruda A, Cardoso C, Vieira M, Arena A. 2016. “Safety Assessment of *Hibiscus Sabdariffa* after Maternal Exposure on Male Reproductive Parameters in Rats.” *Drug and Chemical Toxicology* 39 (1): 22–27. <https://doi.org/10.3109/01480545.2014.1003938>.
- Aubert ML, Begeot M, Winiger BP. 1985. Ontogeny of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (GnRH) and pituitary GnRH receptors in fetal and neonatal rats. *Endocrinology* 116: 1565–1576.
- Barhoumi R, Mouneimne Y, Ramos KS, Safe SH. 2000. Analysis of benzo[a]pyrene partitioning and cellular homeostasis in a rat liver cell line. *Toxicology Science*, 53, 264–270.
- Baum MJ, Woutersen PJ, Slob AK. 1991. Sex difference in whole body androgen content in rats on fetal days 18 and 19 without evidence that androgen passes from males to females. *Biology Reproduction* 44:747–751.
- Ben Maamar M, Nilsson EE, Skinner MK. 2021. Epigenetic transgenerational inheritance, gametogenesis and germline development†. *Biology of Reproduction*, Sep 14;105(3):570-592.
- Biason-Lauber, A, D Konrad, F Navratil, and E J Schoenle. 2004. “A WNT4 Mutation Associated with Müllerian-Duct Regression and Virilization in a 46,XX Woman.”

- Busbee D, Norman J, Ziprin R. 1990. Comparative uptake, vascular transport, and cellular internalization of aflatoxin-B1 and benzo(a)pyrene. *Archives of Toxicology*, 64, 285–290.
- Chapin RE, Harris MW, Davis BJ, Ward SM, Wilson RE, Mauney MA, Lockhart AC, Smialowicz RJ, Moser VC, Burka LT, Collins BJ. 1997. The effects of perinatal/juvenile methoxychlor exposure on adult rat nervous, immune, and reproductive system function. *Fundamental and Applied Toxicology*, 40: 138-57.
- Chassot, Anne-amandine, Fariba Ranc, Elodie P Gregoire, Hermien L Roepers-, Makoto M Taketo, Giovanna Camerino, Dirk G De Rooij, et al. 2008. “Activation of β -Catenin Signaling by Rspo1 Controls Differentiation of the Mammalian Ovary.” *Human Molecular Genetics* 17 (9): 1264–77. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn016>.
- Chung JY, Kim YJ, Kim JY, Lee SG, Park JE, Kim WR, Yoon YD, Yoo KS, Yoo YH, Kim JM. 2011. Benzo[a]pyrene reduces testosterone production in rat Leydig cells via a direct disturbance of testicular steroidogenic machinery. *Environmental Health Perspectives*, 119(11): 1569-74.
- Collman GW. 2011. “Developmental Basis of Disease: Environmental Impacts.” *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 2 (1): 49–55. <https://doi.org/10.1017/S2040174411000031>.
- Davis L, Friedler G, Mattison D, Morris R. 1992. “Male-Mediated Teratogenesis and Other Reproductive Effects: Biologic and Epidemiologic Findings and a Plea for Clinical Research.” *Reproductive Toxicology* 6 (4): 289–92. [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(92\)90190-5](https://doi.org/10.1016/0890-6238(92)90190-5).
- Domingo J and Nadal M. 2015. “Human Dietary Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Review of the Scientific Literature.” *Food and Chemical Toxicology* 86: 144–53. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.10.002>.
- Esakky, P and Moley K. 2016. “Paternal Smoking and Germ Cell Death: A Mechanistic Link to the Effects of Cigarette Smoke on Spermatogenesis and Possible Long-Term Sequelae in Offspring.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 5 (435): 85–93. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402598>.Lipopolysaccharide.
- Ekstrom G, Von Bahr C, Glaumann H, Ingelman-Sundberg M. 1982. Interindividual variation in benzo(a)pyrene metabolism and composition of isoenzymes of cytochrome P-450 as revealed by SDS-gel electrophoresis of human liver microsomal fractions. *Acta Pharmacology and Toxicology*, 50, 251–260.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2008. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. The EFSA Journal, 724: 1-114.
- Falcó G, Domingo J, Llobet J, Teixidó A, Casas C, Müller L. 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: human exposure through the diet in Catalonia, Spain. *Journal of Food Protection*. 66, 2325–2331.
- Fujisawa-Sehara A, Yamane M, Fujii-Kuriyama Y. 1988. A DNA-binding factor specific for xenobiotic responsive elements of P-450c gene exists as a cryptic form in cytoplasm: its possible translocation to nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85, 5859–5863.

- Gore A, Martien K, Gagnidze K, Pfaff D. 2014. Implications of Prenatal Steroid Perturbations for Neurodevelopment, Behavior, and Autism. *Endocrine Reviews*, 35 (6): 961–991. doi: 10.1210/er.2013-1122.
- Gore A, Chappell V, Fenton S, Flaws J, Nadal A, Prins G, Toppari J, Zoeller. 2016. “EDC-2: The Endocrine Society’s Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals.” *Endocrine Reviews* 36: 1–150. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1010>.
- Gubbay, John, Jérôme Collignon, Peter Koopman, Blanche Capel, Androulla Economou, Andrea Munsterberg, Nigel Vivian, Peter Goodfellow, and Robin Lovell-Badge. 1990. “A Gene Mapping to the Sex-Determining Region of the Mouse Y Chromosome Is a Member of a Novel Family of Embryonically Expressed Genes.” *Nature*.
- Habert R, Picon R. 1984. Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol-17 beta levels in maternal and fetal plasma and in fetal testes in the rat. *Journal of Steroids and Biochemical*, 21:193–198.
- Hakura A, Tsutsui Y, Sonoda J, Kai J. 1998. Comparison between in vivo mutagenicity and carcinogenicity in multiple organs by benzo[a]pyrene in the lacZ transgenic mouse. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 398: 123–130.
- Hannema, Sabine E, and Ieuan A Hughes. 2007. “Regulation of Wolffian Duct Development,” 142–51. <https://doi.org/10.1159/000096644>.
- Hanson A and Gluckman. 2008. “Developmental Origins of Health and Disease: New Insights.” *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 102 (2): 90–93. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.00186.x>.
- Hanson, M A, and P D Gluckman. 2014. “EARLY DEVELOPMENTAL CONDITIONING OF LATER HEALTH AND DISEASE: PHYSIOLOGY OR,” no. Table 1: 1027–76. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2013>.
- Hanson, Mark A, and Michael K Skinner. 2016. “Developmental Origins of Epigenetic Transgenerational Inheritance,” no. January: 1–9. <https://doi.org/10.1093/eep/dvw002>.
- Hao C, Cheng X, Xia H, Ma X. 2012. The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. *Bioscience Reports*. 32:619–29.
- Hinton, Barry T, Maureen M Galdamez, A N N Sutherland, Daniela Bomgardner, Bingfang Xu, Rana Abdel-fattah, and Ling Yang. 2011. “How Do You Get Six Meters of Epididymis inside a Human Scrotum?” *Journal of Andrology* 32 (6): 558–64. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.013029>.
- Hiramatsu, Ryuji, Shogo Matoba, Masami Kanai-azuma, Naoki Tsunekawa, Yuko Katoh-fukui, Masamichi Kurohmaru, Ken-ichirou Morohashi, Dagmar Wilhelm, Peter Koopman, and Yoshiakira Kanai. 2009. “A Critical Time Window of Sry Action in Gonadal Sex Determination in Mice” 138: 129–38. <https://doi.org/10.1242/dev.029587>.

- Holder G, Tierney B, Bresnick E. 1981. Nuclear uptake and subsequent nuclear metabolism of benzo(a)pyrene complexed to cytosolic proteins. *Cancer Research*, 41: 4408–4414.
- Huhtaniemi I, Pelliniemi LJ. 1992. Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 201:125–140.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 2004. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans; IARC: Lyon, France. Vol. 83.
- Jameson, Samantha A, Yi-tzu Lin, and Blanche Capel. 2012. “Testis Development Requires the Repression of Wnt4 by Fgf Signaling.” *Developmental Biology* 370 (1): 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.06.009>.
- Jenkins, Timothy G, Carrell D. 2012. “The Sperm Epigenome and Potential Implications for the Developing Embryo.” *Reproduction* 143 (6): 727–34. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0450>.
- Jobling MS, Hutchison GR, van den Driesche S, Sharpe RM. 2011. Effects of di(n-butyl) phthalate exposure on fetal rat germ-cell number and differentiation: identification of age-specific windows of vulnerability. *International Journal of Andrology*, 34(2): 386–396.
- Jorge BC, Reis ACC, Stein J, Balin PDS, Sterde ÉT, Barbosa MG, de Aquino AM, Kassuya CAL, Arena AC. 2021. Parental exposure to benzo(a)pyrene in the peripubertal period impacts reproductive aspects of the F1 generation in rats. *Reproductive Toxicology*. 100. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2021.01.011>
- Jorge BC, Reis ACC, Sterde ÉT, Balin PS, Scarano WR, Hisano H, Arena AC. 2020. Exposure to benzo(a)pyrene from juvenile period to peripubertal impairs male reproductive parameters in adult rats. *Chemosphere* 263, 128016. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128016>
- Jones, Keith T. 2008. “Meiosis in Oocytes: Predisposition to Aneuploidy and Its Increased Incidence with Age.” *Human Reproduction Update* 14 (2): 143–58.
- Kasper-Sonnenberg, Monika, Jürgen Wittsiepe, Katharina Wald, Holger M. Koch, and Michael Wilhelm. 2017. “Pre-Pubertal Exposure with Phthalates and Bisphenol A and Pubertal Development.” *PLoS ONE* 12 (11): 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187922>.
- Kavlock RJ, Daston GP, De Rosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson HA. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environment Health Perspect*, 104: 715-40.
- Kelman B, Springer DL. 1982. Movements of benzo[a]pyrene across the hemochorial placenta of the guinea pig. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 169: 58–62.
- Kovac R, Khanna A, Lipshultz L. 2015. “The Effects of Cigarette Smoking on Male Fertility.” *Postgraduate Medicine* 127 (3): 338–41.

<https://doi.org/10.1080/00325481.2015.1015928>.

- Levin W, Wood A, Wislocki P, Chang RL. Mutagenicity and carcinogenicity of benzo[a]pyrene derivatives. In Gelboin, H.V., Ts'o, P.O.P. (Eds.), *Polycyclic Hydrocarbons and Cancer*, Academic Press, New York 1978, pp. 189–202.
- Limanowski A, Miskowiak B, Otulakowski B, 2001. Morphometric studies on rat epididymis in the course of postnatal development (computerised image analysis). *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 39: 201–202.
- Lovell-badge, Robin, Clare Canning, and Ryohei Sekido. 2002. “Sex-Determining Genes in Mice : Building Pathways” 244: 4–22.
- Manikkam M, Haque MM, Guerrero-Bosagna C, Nilsson EE, Skinner MK. 2014 Pesticide methoxychlor promotes the epigenetic transgenerational inheritance of adult-onset disease through the female germline. *PLoS ONE*. 9:e102091.
- Manuylov, Nikolay L, Fatima O Smagulova, Lyndsay Leach, and Sergei G Tevosian. 2008. “Ovarian Development in Mice Requires the GATA4-FOG2 Transcription Complex.” *Development* 3743: 3731–43. <https://doi.org/10.1242/dev.024653>.
- Mantovani A, and Aleksandra Fucic. 2014. “Puberty Dysregulation and Increased Risk of Disease in Adult Life: Possible Modes of Action.” *Reproductive Toxicology* 44: 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.06.002>.
- Martinez-Arguelles, D. B., E. Campioli, M. Culty, B. R. Zirkin, and V. Papadopoulos. 2013. “Fetal Origin of Endocrine Dysfunction in the Adult: The Phthalate Model.” *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 137: 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.01.007>.
- Martorell I, Perelló G, Martí-Cid R, Castell V, Llobet J, Domingo J. 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in foods and estimated PAH intake by the population of Catalonia, Spain: temporal trend. *Environment International*, 36, 424–432.
- Martorell I, Nieto A, Nadal M, Perelló G, Marcé R, Domingo J. 2012. Human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using data from a duplicate diet study in Catalonia, Spain. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 4103–4108.
- Marty MS, Allen B, Chapin RE, Cooper R, Daston GP, Flaws JA, Foster PMD, Makris SL, Mylchreest E, Sandler D, Tyl RW. 2009. Inter-laboratory control data for reproductive endpoints required in the OPPTS 870.3800/OECD 416 reproduction and fertility test. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology*, 86(6): 470–489.
- Mohamed EA, Song WH, Oh SA, Park YJ, You IA, Lee S, Choi JY, Kim YJ, Pang MG. 2010. The transgenerational impact of benzo(a)pyrene on murine male fertility, *Human Reproduction*, 25: 2427-3.
- Moore N, Beekhuijzen M, Boogaard P, Foreman J, North C, Palermo C, Schneider S, Strauss V, van Ravenzwaay B, Poole A. 2016. “Guidance on the Selection of Cohorts for the Extended One-Generation Reproduction Toxicity Study (OECD Test Guideline 443).” *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 80: 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.05.036>.
- Nicol, Barbara, and Humphrey H Yao. 2014. “Building an Ovary : Insights into Establishment of Somatic Cell Lineages in the Mouse” 27709: 243–51.

<https://doi.org/10.1159/000358072>.

- Nicol, Barbara, Humphrey H Yao, Triangle Park, and North Carolina. 2015. "Gonadal Identity in the Absence of Pro-Testis Factor SOX9 and Pro-Ovary Factor Beta-Catenin in Mice 1" 93 (June): 1–12. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.131276>.
- Nilsson E, and MK Skinner. 2015. "Environmentally Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Disease Susceptibility." *Translational Research* 165 (1): 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.02.003>.
- Ojeda SR, Advis JP, Andrews WW. 1980. Neuroendocrine control of the onset of puberty in the rat. *Federation Proceedings*, 39: 2365–2371.
- Ojeda, Sergio R., and Michael K. Skinner. 2006. "Puberty in the Rat." *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 2061–2126. <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50043-9>.
- Pailhoux, Eric, Bernard Vigier, Daniel Vaiman, and Nathalie Servel. 2002. "Ontogenesis of Female-to-Male Sex-Reversal in XX Polled Goats" 50 (November 2001): 39–50. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10083>.
- Parma, Pietro, Orietta Radi, Valerie Vidal, Marie Christine Chaboissier, Elena Dellambra, Stella Valentini, Liliana Guerra, Andreas Schedl, and Giovanna Camerino. 2006. "R-Spondin1 Is Essential in Sex Determination, Skin Differentiation and Malignancy." *Nature Genetics* 38 (11). <https://doi.org/10.1038/ng1907>.
- Perobelli J. 2014. The Male Peripubertal Phase as a Developmental Window for Reproductive Toxicology Studies. *Current Pharmaceutical Design* 20 (34): 5398–5415. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140205150059>.
- Picut CA, Remick AK, Rijk EP. 2015. Postnatal development of the testis in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. *Toxicology Pathology*, 43:326–342.
- Picut CA, Remick AK. 2017. Impact of age on the male reproductive system from the pathologist's perspective. *Toxicology Pathology*, 45: 195–205.
- Picut CA, Ziejewski MK, Stanislaus. 2018. Comparative Aspects of Pre- and Postnatal Development of the Male Reproductive System. *Birth Defects Research* 110 (3): 190–227. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1133>.
- Plant AL, Benson DM, Smith LC. 1985. Cellular uptake and intracellular localization of benzo(a)pyrene by digital fluorescence imaging microscopy. *Journal of Cellular Biology*, 100: 1295–1308.
- Prough RA, Patrizi VW, Okita RT, Master B. 1979. Characteristics of benzo(a)pyrene metabolism by kidney, liver, and lung microsomal fractions from rodents and humans. *Cancer Research*, 39: 1199–1206.
- Pryor JL, Hughes C, Foster W. 2000. Critical windows of exposure for children's health: the reproductive system in animals and humans. *Environment Health Perspective*, 108(3): 491–503.
- Ramesh A, Hood DB, Inyang F, Greenwood M, Archibong AE, Knuckles ME. 2002. Comparative metabolism, bioavailability and toxicokinetics of benzo(a)pyrene in

- rats after acute oral, inhalation, and intravenous administration. *Polycyclic Aromatic Compd*, 22: 969–80.
- Ramesh A, Inyang F, Hood DB, Archibong AE, Knuckles ME, Nyanda AM. 2001. Metabolism, bioavailability, and toxicokinetics of benzo(a)pyrene in F-344 rats following oral administration. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 53: 275–90.
- Ramesh A, Archibong A, Hood D, Guo Z, Loganathan B. 2011. Global Environmental Distribution and Human Health Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Global Contamination Trends of Persistent Organic Chemicals*, no. 97–126. <https://doi.org/10.1201/b11098-7>.
- Ramos A, Santos A, Silveira K, Kiss AC, Mesquita S, Gerardin D. 2016. Maternal Treatment with Fluoxetine Promotes Testicular Alteration in Male Rat Pups. *Reproduction, Fertility and Development* 28 (8): 1206–13. <https://doi.org/10.1071/RD14199>.
- Reddy PK, Girish BP, Reddy SP. 2015. Reproductive and paternal mediated developmental toxicity of Benzo(a)pyrene in adult male wistar rats. *Toxicology Research*, 4: 223-32.
- Revel A, Raanani H, Younglai E, Xu J, Han R, Savouret JF, Casper RV. 2001. Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis by benzo[a]-pyrene, *Reproduction Toxicology*, 15: 479-86.
- Rissman EF, Adli M. 2014. Minireview: transgenerational epigenetic inheritance: focus on endocrine disrupting compounds. *Endocrinology*, 155(8): 2770-80. doi: 10.1210/en.2014-1123.
- Robaire, Bernard, Barry T. Hinton, and Marie-Claire Orgebin-Crist. 2015. “The Epididymis.” In *Physiology of Reproduction, Forth Edition*, 691–771. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00017-X>.
- Rosenfeld CS. 2015. Bisphenol A and phthalate endocrine disruption of parental and social behaviors. *Frontiers in Neuroscience*. 9:57.
- Safe SH. 1995. Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem? *Environment Health Perspective*, 103: 346-51.
- Sagredo C, Ovrebo S, Haugen A, Fujii-Kuriyama Y, Baera R, Botnen IV. 2006. Quantitative analysis of benzo[a]pyrene biotransformation and adduct formation in Ahr knockout mice. *Toxicology Letters*, 167: 173–82.
- Schmidt JV, Bradfield C. 1996. Ah receptor signaling pathways. *Annual Revisit Cellular Developmental Biology*, 12: 55–89.
- Scott HM, Mason JI, Sharpe RM. 2009. Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. *Endocrinology Revisit*, 30: 883–925.
- Scsukova S, Rollerova E, Bujnakova MA. 2016. Impact of endocrine disrupting chemical on onset and development of female reproductive disorders and hormone-related cancer. *Reproductive Biology*, 16(4): 243-4.
- Sekido, Ryohei, Robin Lovell-badge, Fawzi A Razem, Ashraf El-kereamy, and Suzanne R Abrams. 2008. “Sex Determination Involves Synergistic Action of SRY and SF1 on a Specific Sox9 Enhancer The RNA-Binding Protein FCA Is an Abscisic Acid

- Receptor.” *Nature* 456 (December): 7646. <https://doi.org/10.1038/nature07622>.
- She, Zhen-yu, and Wan-xi Yang. 2016. “Sry and SoxE Genes: How They Participate in Mammalian Sex Determination and Gonadal Development?” *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.07.032>.
- Skinner MK. 2008. What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2. *Reproductive Toxicology*, 25: 2–6.
- Skinner MK. 2011. Environmental epigenetic transgenerational inheritance and somatic epigenetic mitotic stability. *Epigenetics*. 6:838–842.
- Sipinen V, Laubenthal J, Baumgartner A, Cemeli E, Linschooten J, Godschalk R, Van Schooten F, Anderson D, Brunborg G. 2010. In Vitro Evaluation of Baseline and Induced DNA Damage in Human Sperm Exposed to Benzo[a]Pyrene or Its Metabolite Benzo[a]Pyrene-7,8-Diol-9,10- Epoxide, Using the Comet Assay. *Mutagenesis* 25 (4): 417–25. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq024>.
- Soares S, Melo M. 2008. Cigarette Smoking and Reproductive Function. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology* 20 (3): 281–91. <https://doi.org/10.1097/GCO.0b013e3282fc9c1e>.
- Sobinoff A, Sutherland J, Beckett E, Stanger S, Johnson R, Jarnicki A, McCluskey A, St John J, Hansbro P, McLaughlin. 2014. Damaging Legacy: Maternal Cigarette Smoking Has Long-Term Consequences for Male Offspring Fertility. *Human Reproduction*, 29 (12): 2719–35. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu235>.
- Sousa M, Ferreira C, Rabaca A, As R. 2017. Assessing Male Reproductive Toxicity during Drug Development. *Andrology* 6 (2). <https://doi.org/10.4172/2167-0250.1000185>.
- Soubry, Adelheid, Cathrine Hoyo, Randy L Jirtle, and Susan K Murphy. 2014. “A Paternal Environmental Legacy: Evidence for Epigenetic Inheritance through the Male Germ Line,” 359–71. <https://doi.org/10.1002/bies.201300113>.
- Stocco DM and Clark BJ. 1996. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells, *Endocrinology Revisit*, 17(3): 221-44.
- Stocco DM. 2000. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *Journal of Endocrinology*, 164: 247-53.
- Sun EL, Flickinger CJ. 1979. Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis. *The American journal of anatomy*, 154:27–55.
- Surani, M Azim. 2015. “Human Germline: A New Research Frontier.” *Stem Cell Reports* 4 (6): 955–60. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.04.014>.
- Svingen, Terje, and Peter Koopman. 2013. “Building the Mammalian Testis : Origins , Differentiation , and Assembly of the Component Cell Populations,” 2409–26. <https://doi.org/10.1101/gad.228080.113>.
- Szczeklik A, Szczeklik J, Galuszka Z, Musial J, Kolarzyk E, Targosz D. 1994. Humoral immunosuppression in men exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and related carcinogens in polluted environments. *Environment Health Perspective*, 102: 302–4.
- Tingen, Candace, Alison Kim, and Teresa K Woodruff. 2009. “The Primordial Pool of Follicles and Nest Breakdown in Mammalian Ovaries.” *Molecular Human*

- Reproduction* 15 (12): 795–803. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap073>.
- Tomizuka, Kazuma, Kaori Horikoshi, Rina Kitada, Yuriko Sugawara, Yumi Iba, Ayako Kojima, Akiko Yoshitome, et al. 2008. “R-Spondin1 Plays an Essential Role in Ovarian Development through Positively Regulating Wnt-4 Signaling.” *Human Molecular Genetics* 17 (9): 1278–91. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn036>.
- Uhlenhaut, N Henriette, Susanne Jakob, Katrin Anlag, Tobias Eisenberger, Ryohei Sekido, Jana Kress, Anna-corina Treier, et al. 2009. “Somatic Sex Reprogramming of Adult Ovaries to Testes by FOXL2 Ablation” 1: 1130–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.021>.
- US-EPA. 2017. “Toxicological Review of Benzo[a]Pyrene,” no. January. https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/toxreviews/0136tr.pdf.
- US Environmental Protection Agency (US EPA). What are endocrine disruptors? 2007. Available at: <http://www.epa.gov/endo/pubs/edspoverview/whatare.htm> (accessed Dez 15, 2016).
- Verma N, Pink M, Rettenmeier A, Schmitz-Spanke S. 2012. Review on Proteomic Analyses of Benzo[a]Pyrene Toxicity. *Proteomics*, 12 (11): 1731–55. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100466>.
- Wistuba J, Schrod A, Greve B, et al. 2003. Organization of seminiferous epithelium in primates: relationship to spermatogenic efficiency, phylogeny, and mating system. *Biology Reproduction*, 69: 582–591.
- World Health Organization. 1997. Tobacco or Health: A Global Status Report; WHO: Geneva, 10-48.
- Wu A, Xu D, Lu D, Penning TM, Blair AI, Harvey RG. 2012. Synthesis of ¹³C 4- labelled oxidized metabolites of the carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene, *Tetrahedron*, 68: 7217-33.
- Yamazaki H, Terada M, Tsuboi A, Matsubara C. 1987. Distribution and binding pattern of benzo(a)pyrene in rat liver, lung and kidney constituents after oral administration. *Toxicology Environment Chemical*, 15: 71–81.
- Xin F, Susiarjo M, Bartolomei MS. 2015. Multigenerational and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals: A role for altered epigenetic regulation? *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 43:66-75.
- Yao, Humphrey Hung-chang, Jorie Aardema, and Kirsten Holthusen. 2006. “Sexually Dimorphic Regulation of Inhibin Beta B in Establishing Gonadal Vasculature in Mice.” *Biology of Reproduction* 74 (5): 978–83.
- Zoeller RT, Brown TR, Doan LL. 2012. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology*, 153(9): 4097– 110.

CAPÍTULO I – “Exposure to environmentally relevant dose of benzo(a)pyrene in juvenile male rats generated reproductive deleterious effects by impairment of steroidogenic machinery and testicular oxidative imbalance”. Será submetido ao periódico “*Environmental Pollution*” – Fator de impacto: 9,988

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados mostraram que o BaP na dose de 0,1 µg/kg causa baixa toxicidade sistêmica em ratos machos na puberdade. Em relação a toxicidade reprodutiva, esta dose ambientalmente relevante de BaP bloqueia a ação das enzimas esteroidogênicas em ratos púberes logo após o término da exposição, sem alterar a StAR e diminuindo a expressão da *tspo*. O BaP também promove uma diminuição nas enzimas antioxidantes, altera a morfologia dos túbulos seminíferos, desregula o eixo HHG e prejudica de forma direta as células de suporte testiculares na idade avaliada (DPN 54). Além disso, os efeitos deletérios sobre as células de suporte, túbulos seminíferos e alteração no eixo HHG foram causados imediatamente após a exposição ao BaP e permaneceram na vida adulta (DPN 120), assim como o aumento do marcador oxidativo.

Em relação à avaliação em escala transgeracional, obtivemos resultados importantes. Primeiramente, podemos afirmar que o BaP em baixa dose foi capaz de programar as células germinativas, a estrutura morfológica e vias moleculares do testículo destes machos. Demonstramos também que a janela crítica do desenvolvimento abordada no presente estudo, a puberdade, é crucial para o sistema reprodutivo e é negligenciada nos estudos toxicológicos. Ademais, o BaP é um desregulador endócrino capaz de gerar herança transgeracional.

Com relação a geração PF2, a exposição ao BaP em ratos machos na puberdade (F0) causou uma diminuição da fertilidade em sua descendência da geração PF2, tanto a prole feminina quanto a masculina. Na vida adulta da geração PF2, a produção hormonal de testosterona e estradiol diminuíram, sem alterar as concentrações de gonadotrofinas. Os machos PF2 apresentaram mais modificações reprodutivas do que a geração F1 masculina e as fêmeas PF2 mantiveram as mudanças reprodutivas da geração F1 feminina.

Com relação a geração MF2, a exposição ao BaP em ratos machos na puberdade (F0) provocou menos efeitos deletérios do que a PF2. Apesar disto, a diminuição da progesterona nas fêmeas de MF2 levou à hipertrofia uterina e reduziu o comportamento sexual destas ratas e nos machos da MF2, a diminuição da enzima 5 α-redutase desencadeou disfunções no epidídimo destes ratos.

Assim, o BaP causou toxicidade reprodutiva e programação das células germinativas dos ratos durante a puberdade e algumas destas alterações reprodutivas

permaneceram durante a vida adulta e nas gerações seguintes. Os machos da geração F1 foram a geração menos afetada pela exposição ao BaP indireta, porém, a PF2 (advinda da geração F1 masculina) foi a mais prejudicada das três gerações avaliadas. As fêmeas da geração F1 e PF2 foram afetadas de forma semelhante.

As lacunas de informações sobre efeitos reprodutivos do paradigma de POHaD, utilizando o BaP como um DE e uma dose ambientalmente relevante, foram preenchidas com os resultados e conclusões obtidas no presente estudo. Reforçar que o *status* da saúde paterna é tão importante quanto a materna eram um dos nossos principais objetivos.

Ressaltamos ainda que o gerenciamento e avaliação de risco deste poluente ambiental seja revisto e, em última instância, seja tratado como uma substância extremamente nociva para a reprodução. Além disso, os efeitos nocivos de baixas doses desta substância podem ser igualmente prejudiciais à saúde ou até mais grave do que altas doses, considerando o período e a duração da exposição.

Os mecanismos claros e diretos de como o BaP em dose ambientalmente relevante gera herança transgeracional via espermatozoide e quais *informações* ele transmite não são totalmente compreendidas e são necessários estudos focados em métodos epigenéticos.