



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



PG-BGA

**TOXICOLOGIA REPRODUTIVA DE RATOS ADULTOS
EXPOSTOS AO 2,3,7,8-TETRACLORODIBENZO-P-DIOXINA
(TCDD) *IN UTERO***

MARCIANA SANABRIA

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

Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas

**BOTUCATU – SP
2014**

Instituto de Biociências - Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3880-0780 posgraduacao@ibb.unesp.br



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

TOXICOLOGIA REPRODUTIVA DE RATOS ADULTOS
EXPOSTOS AO 2,3,7,8-TETRACLORODIBENZO-P-DIOXINA
(TCDD) *IN UTERO*

MARCIANA SANABRIA

PROFA. DRA. WILMA DE GRAVA KEMPINAS

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

Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas

**BOTUCATU – SP
2014**

Instituto de Biociências - Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel(14)3880-0780posgraduacao@ibb.unesp.br

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

Sanabria, Marciana.

Toxicologia reprodutiva de ratos adultos expostos ao
2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) in utero / Marciana Sanabria. -
Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Wilma de Grava Kempinas

Capes: 20600003

1. Dioxinas. 2. Desreguladores endócrinos. 3. Tetraclorodibenzodioxina. 4.
Epidídimo. 5. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Desreguladores endócrinos; Dioxina; Efeitos transgeracionais;
Epidídimo; Rato.

*"Que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente, que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois...
A vida é construída nos sonhos e concretizada no amor"*
(Chico Xavier)

Dedicatória

*Aos meus pais pelo exemplo de vida, generosidade e por todo
incentivo e grande amor!*

Agradecimientos

"Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso."

Charles Chaplin

A realização desta Tese marca o fim de uma importante etapa da minha vida e início de outra. Durante esses anos só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza me ensinaram acreditar na beleza da vida e me proporcionaram um crescimento pessoal único. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês que contribuíram de forma decisiva para a concretização deste sonho.

Agradeço a Deus, porque é a luz, fortaleza, proteção e sabedoria que dá sentido à minha vida e por ter colocado pessoas tão especiais ao meu lado.

A minha Orientadora Profa. Dra. Wilma, por acreditar que eu era capaz e pela orientação. Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, palavras de incentivo, “puxões de orelha”, paciência e dedicação. Talvez eu tenha sido apenas “uma orientada” de inúmeras orientações que a senhora já teve, mas certamente a senhora será ÚNICA na minha vida! Não encontro palavras que consigam te agradecer, simplesmente fico completamente envolvida por um enorme sentimento: gratidão. Muito obrigada por me permitir realizar esse sonho!

Aos meus pais pelo apoio incondicional, amor, cumplicidade, por acreditarem em mim e estarem ao meu lado sempre, por tudo que me deram e me ensinaram.

Aos meus avós (in memoriam) que apesar da pouca convivência (ou nenhuma), somente pelas histórias que sempre escutei, me ensinaram a ser nobre na essência da palavra. Vó Bartola pela garra, perseverança e otimismo contagiantes até hoje.

Aos meus irmãos, Rodrigo e Ana Paula meu agradecimento especial, pois, a seu modo, sempre se orgulharam de mim e confiaram em meu trabalho.

Aos meus sobrinhos e afilhado por tornarem meus dias mais alegres e completos.

Ao meu tio Marlon e tia Rafaela que vibraram comigo, desde a aprovação no vestibular até a concretização dessa etapa, e sempre fizeram “propaganda” positiva a meu respeito.

Agradeço também a meu cunhado Adalberto e cunhada Pollyanna pelo incentivo e apoio.

A equipe do ReptoX, a ajuda de vocês foi essencial para a realização desse trabalho. Aqui também manifesto minha eterna gratidão aos que já fizeram parte dessa equipe, certamente levo muito de vocês em minha vida.

Aos meus amigos do doutorado, pelos momentos divididos juntos, especialmente à Aline, Gabriel, Juliana, Máira e Marina, que se tornaram verdadeiros amigos. Obrigada por dividir comigo as alegrias e me “suportarem”. Foi muito bom poder contar com vocês!

Às minhas amigas de longa data: Daniele e Beatriz por sempre estarem juntas, me apoiando e ajudando nas minhas decisões.

Aos amigos especiais que seguiram seus destinos, mas sempre aparecem quando é preciso: Andrea, Camila, Ianny, Inara, Leticia, Lucimara, Marina e Thales. Obrigada pela amizade que me ajuda a dividir os problemas e a somar alegrias.

Às famílias Nutritivas, Ksa das Barbi, Curva de Rio, Labamba e Vânia: irmãs e companheiras que encontrei em Botucatu, sempre dispostas a ajudar. Obrigada pelas risadas, conversas e companheirismo.

Aos casais Marina e Uilian, Carla e André por me acolherem e me darem um “lar” e uma “família” nos momentos em que meu coração apertava de tanta saudade da minha de sangue.

A Amandinha e Luana que fizeram dos meus finais de semana mais divertidos e me proporcionaram desfrutar de ótimas companhias

Aos meus irmãos e amigos de fé: Chicão, Mãe Zezé, Mãe Bárbara, Pai Maguila, Simone, Laurinha, Renatinha, Leandro, Juan e André que preenchem minha vida com muito amor, fé e alegrias! Amo vocês!

Aos meus mentores e guias espirituais que me conduziram e auxiliaram integralmente durante essa jornada, que em tantos momentos me carregaram no colo, não permitindo que eu me afastasse de meu propósito.

Ao Programa de Pós-Graduação Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP e funcionários pelo suporte acadêmico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo nº 2012/00365-6), pelo auxílio no desenvolvimento deste projeto na forma de bolsa.

Aos ratos, nobres seres fundamentais em prol do desenvolvimento da ciência.

Ao técnico do Laboratório de Embriologia, José Eduardo, e à secretária do departamento de Morfologia, Luciana, sempre a disposição em me ajudar.

À Dra. Janete Aparecida Anselmo-Franci e seus colaboradores da USP – Ribeirão Preto, pelas dosagens hormonais.

À Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete e sua orientada Raquel Frenedoso pela ajuda na realização das imunohistoquímicas.

Aos membros Titulares e Suplentes da Banca, pela disposição.

Sumário

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Influência dos Contaminantes Ambientais na Regulação Endócrina.....	02
1.2. Dioxinas.....	04
1.2.1. Nota Histórica.....	04
1.2.2. Estrutura química das dioxinas.....	06
1.2.3. Fonte de dioxinas.....	07
1.2.4. Toxicidade das dioxinas.....	08
1.2.5. Efeitos do TCDD na reprodução masculina de ratos.....	11
1.3. Aspectos Estruturais do Epidídimo.....	12
1.4. Funções Epididimárias.....	16
1.4.1. Transporte dos Espermatozoides.....	16
1.4.2. Maturação dos Espermatozoides.....	17
1.4.3. Estocagem dos Espermatozoides.....	18
1.4.4. Proteção dos Espermatozoides.....	19
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO.....	21
3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA.....	36
4. OBJETIVOS.....	38
4.1. Objetivo Geral.....	39
4.2. Objetivos Específicos.....	39
5. CAPÍTULO.....	40

5.1. Manuscrito.....	41
Title Page.....	43
Abstract.....	44
Introduction.....	45
Material and Methods.....	46
Results.....	51
Discussion.....	53
Conclusion.....	58
Funding.....	58
References.....	59
Tables.....	67
Figures.....	71
6. CONCLUSÕES FINAIS.....	75
7. APÊNDICES.....	77

Resumo

As dioxinas são subprodutos orgânicos policlorados provenientes de vários processos industriais e têm como forma mais tóxica o 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD). O homem está propenso à exposição ao TCDD, principalmente, devido à ingestão de alimentos contaminados e em períodos críticos de desenvolvimento, sobretudo, durante a vida intrauterina e pós-natal. A exposição ao TCDD promove disfunções no sistema genital masculino, como redução dos pesos dos órgãos reprodutores, atraso no início da maturação sexual, diminuição do número de espermátides no testículo, queda nos níveis séricos de testosterona, estresse oxidativo no epidídimo, queda na concentração espermática, alterações da motilidade e no tempo de trânsito dos espermatozoides. Considerando-se que na literatura os trabalhos acerca dos efeitos do TCDD na saúde reprodutiva da descendência masculina são escassos e precisam ser confirmados e elucidados, tanto em animais de experimentação como em humanos, principalmente, sua ação sobre as funções reprodutivas e na qualidade espermática. Deste modo, avaliou-se os efeitos transgeracionais da exposição *in utero* ao TCDD no sistema genital masculino da prole quando adulta, com ênfase nas funções epididimárias e na qualidade espermática. Para isso, ratas prenhes foram expostas a baixas doses de TCDD (0,1; 0,5 e 1,0 μ g), no dia gestacional 15, sendo feitas, na prole masculina adulta, análises espermáticas e investigação da fertilidade após inseminação artificial *in utero* (IA). Além disso, foram realizadas dosagens dos hormônios testosterona, folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). A exposição intrauterina ao TCDD ocasionou, na prole masculina adulta, alterações nos níveis séricos hormonais de testosterona, morfologia espermática e diminuição no tempo de trânsito espermático na cauda do epidídimo. Além disso, houve redução da proporção de implantes por corpos lúteos após o procedimento de IA, de tal modo que essas alterações ocorreram ao menos em uma das doses testadas nas três gerações. No entanto, não houve alteração no peso dos órgãos sexuais masculinos e na motilidade espermática. Os resultados indicam que a exposição ao TCDD, nessas condições experimentais, interferiu, negativamente, sobre processos que ocorrem no epidídimo do rato, prejudicando a qualidade espermática, e alguns desses efeitos persistiram por várias gerações, provavelmente, pela interferência de fatores epigenéticos. Sabendo-se que a eficiência reprodutiva nos ratos é maior do que a de homens, esses resultados podem indicar riscos reprodutivos associados à exposição pré-natal e lactacional ao TCDD na espécie humana.

Palavras-chave: Desreguladores endócrinos, Dioxina, Rato, Epidídimo, Efeitos Transgeracionais

Abstract

Dioxins are organic polychlorinated byproducts derived from several industrial processes whose most toxic form is 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), which persists in the environment due to its cumulative character. Humans are prone to TCDD exposure, principally by ingesting contaminated foods and during critical periods of development, especially during intrauterine and postnatal life. It is known that exposure to TCDD promotes dysfunctions of the male genital system such as reduced weights of reproductive organs, delayed initiation of sexual maturation, diminished number of testicular spermatids, diminished serum testosterone levels, oxidative stress in the epididymis, decreased sperm concentration, alterations in motility and in sperm transit time. Considering the scarcity in the literature of works on the effects of TCDD on the reproductive health of male offspring, its action on reproductive functions and sperm quality should be confirmed and elucidated in both humans and experimental animals. Thus, we evaluated the effect transgenerational of *in utero* exposure to TCDD about genital system of adult male offspring, with emphasizing the epididymal functions and sperm quality. For this, pregnant rats were exposed to low doses of TCDD (0.1; 0.5 and 1.0 μ g), on gestational day 15 and subsequently their adult male offspring were investigated for fertility after artificial insemination *in utero* (AI). The hormones testosterone, follicle stimulating (FSH) and luteinizing (LH) were also measured. Intrauterine exposure to TCDD provoked, in adult male offspring, alterations in serum testosterone levels and sperm morphology, and diminution in sperm transit time in the cauda epididymis. Furthermore, there was reduction in the proportion of implants per corpus luteum after *in utero* artificial insemination, such that these alterations occurred under at least one of the doses tested in the three generations. Nevertheless, there was no alteration in the weight of male sex organs or in sperm motility. The results indicate that TCDD exposure, under these experimental conditions, negatively interfered in rat epididymal processes, harming sperm quality; some of these effects persisted for at least three generations, possibly through interference of epigenetic factors. Given that rats display greater reproductive efficiency than men, these results may indicate reproductive risks associated with prenatal and lactational exposure to TCDD in humans.

Keywords: Endocrine disrupters, Dioxin, Rat, Epididymis, Transgenerational effects

1. Introdução

1.1. Influência dos Contaminantes Ambientais na Regulação Endócrina

A saúde de um indivíduo é determinada pela interação entre dois fatores: o ambiente interno do corpo e o ambiente externo a ele. Sendo assim, o ar limpo, água potável e alimento livre de toxinas são requisitos fundamentais para garantir uma vida saudável (Bratt, 2000). No entanto, é cada vez maior a contaminação do ambiente devido às atividades agrícola e industrial, usados para atender às crescentes necessidades da sociedade acarretando em consequências na saúde humana (Bratt, 2000; Bordjiba et al., 2001). No homem a rota dessa exposição pode ocorrer via ingestão, inalação, absorção pela pele ou administração intravenosa (WHO, 2002).

O campo de estudo destes compostos, coletivamente denominados desreguladores endócrinos (DE), tem crescido rapidamente e engloba áreas como imunologia, toxicologia, fisiologia da reprodução, comportamento e ecologia (Hotchkiss et al., 2002). Essas substâncias são agentes exógenos capazes de interferir na síntese, reserva, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais do organismo responsáveis pela regulação da homeostase e dos processos de desenvolvimento (Kavlock et al., 1996).

Uma correlação entre a contaminação ambiental e o aparecimento de alterações reprodutivas na população humana e em animais, realizada nos Estados Unidos no início de 1947, começou a preocupar a opinião pública (Tarin, 1972). A partir dessas evidências iniciou-se uma série de debates entre a comunidade científica de diversos países e as agências regulatórias internacionais a respeito dos efeitos adversos que podem resultar da exposição aos DE.

Entre essas alterações está um significativo declínio na qualidade e quantidade do sêmen humano (Auger et al., 1995). Ao mesmo tempo, a incidência da Síndrome de Disgenesia Gonadal, que incluem hipospádia, criptorquidia, câncer testicular e de próstata, entre outros, vem crescendo consideravelmente (Nethersell et al., 1984; Czeizel, 1985; Pike et al., 1987; Sociedade Brasileira de Urologia, 2010).

Em investigações laboratoriais, os DE que incluem plastificantes, praguicidas isolados ou em misturas, dentre outros, apresentaram atividades que mimetizam ou antagonizam aquelas dos hormônios sexuais esteroidais, e que, portanto tornam esses compostos fortes candidatos a agentes causadores dessa deterioração da qualidade espermática e de desordens do trato genital masculino (Sharpe & Skakkebaek, 1993).

Nos últimos anos, alguns compostos têm sido associados à diminuição no número de espermatozoides estocados na cauda epididimária e ao menor número de gametas disponível para ejaculação, com pouca ou nenhuma diminuição na produção espermática testicular, reafirmando a hipótese de que o epidídimo seja um importante alvo direto e indireto de agentes tóxicos (Klinefelter & Suarez, 1997). Deste modo, os DE, exerceriam seus efeitos sobre o epidídimo e maturação espermática, resultando em prejuízo na qualidade e quantidade de espermatozoides disponíveis para ejaculação (Kempinas & Klinefelter, 2010).

Os DE denominados antiandrogênicos são aqueles que antagonizam os efeitos dos andrógenos endógenos. Dentre estes, alguns são capazes de agir diretamente nas células-alvo competindo pelos receptores de andrógenos (Gray et al., 2001). A população mundial está constantemente exposta a estes agentes químicos, os quais muitas vezes ocorrem em misturas complexas capazes de exercer efeitos cumulativos (Chapin et al., 1997; Gray et al., 2001; 2006; Blystone et al., 2009). Os efeitos de químicos antiandrogênicos sobre a reprodução masculina são dependentes da fase de exposição, sendo o período gestacional considerado um dos períodos mais susceptível (Stoker et al., 2000; Sharpe, 2006).

Estudos realizados em diferentes partes do mundo têm reafirmado uma forte associação entre a exposição *in utero* ou durante as fases iniciais da vida extrauterina a um agente ambiental e o aparecimento de doenças crônicas ao longo da vida de um indivíduo (Lucas, 1991; Mantovani, 2006). Em muitas espécies animais, estes contaminantes atingem o feto via mãe/placenta ou os filhotes via lactação (Silveira et al., 2007).

1.2. Dioxinas

As dioxinas abrangem um conjunto de compostos orgânicos policlorados e são classificadas em: dibenzo-p-dioxinas (PCDD) constituídas por 75 compostos, e em dibenzofuranos (PCDF) constituídas por 135 compostos, dos quais 17 são preocupantes (Comissão das Comunidades Europeias, 2007). O composto mais tóxico é o 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), pertencente a classe dos dibenzo-p-dioxinas, classificado pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) como um agente cancerígeno em humanos (Fiedler et al., 2000).

Segundo o Comitê Científico de Alimentação Humana (CCAH) da União Europeia, juntamente com a Organização Mundial de Saúde (WHO) as dioxinas possuem um limite de exposição diária aceitável de 4pg/Kg do peso corporal em humanos. No entanto, numa exposição abaixo desse limite, ainda podem surgir alguns efeitos nocivos como a endometriose, efeitos neurotóxicos e imunossupressores (WHO, 1998; Comissão das Comunidades Europeias, 2007).

As dioxinas são extremamente resistentes à degradação química e biológica, persistindo no ambiente e tornando-se cumulativa nas cadeias alimentares humanas e animal (Comissão das Comunidades Europeias, 2007), de tal modo que mais de 90% da exposição humana é decorrente da alimentação, sendo os gêneros alimentícios de origem animal responsável por 80% dessa exposição (Comissão das Comunidades Europeias, 2013). Portanto, a contaminação do solo, ar e água são consideradas potenciais fontes de dioxinas (Conselho da União Europeia, 2001).

1.2.1. Nota Histórica

As primeiras descrições de efeitos tóxicos causados por compostos orgânicos policlorados remontam a 1947, quando na Baía de Hudson, nos EUA, foram encontrados teores elevados de policlorados no tecido adiposo dos peixes, e conseqüentemente, aumento das

incidências de câncer na população local. Desde então, muitos outros episódios têm sido descritos (Deutsche Welle, 1976).

Durante a guerra do Vietnã, entre 1965 e 1971, as tropas americanas aplicaram cerca de 72 milhões de litros de herbicidas contendo o TCDD, junto ao perímetro de suas bases. Posteriormente, em 1996, foram encontrados nos indivíduos que viviam nas proximidades das bases militares, níveis equivalentes a 1832 ppt de TCDD no leite materno, 103 ppt no tecido adiposo e 33 ppt no sangue. No entanto, amostras colhidas em habitantes do norte do Vietnã, onde o tóxico não foi utilizado, foram encontrados teores de TCDD inferiores a 2,9 ppt no total das amostras avaliadas (Schechter et al., 1995; Gochfeld, 2001; Schechter et al., 2001; Dwernychuk et al., 2002).

Um dos casos mais conhecidos de intoxicação por TCDD foi relatado em Seveso, na Itália, em 1976, numa fábrica de praguicidas em que, um dos reatores de armazenagem rompeu liberando o TCDD num raio de 6 km, acarretando em diversos distúrbios na saúde humana e em outros animais. Foram deslocados cerca de 730 habitantes desta região, que ficaram expostos ao tóxico durante 15 dias (Deutsche Welle, 1976). Inicialmente, nas crianças expostas, foram detectados os habituais sinais cutâneos; registrando-se posteriormente (nos 15 anos subsequentes) aumento significativo da incidência de leucemia e de mielomas em mulheres (Bertazzi et al., 1998).

O mar Báltico é considerado a região da Europa mais poluída com dioxinas. As indústrias do Leste despejaram efluentes durante décadas, sem qualquer tratamento. Atualmente, os Países ribeirinhos do Báltico (Suécia e Finlândia) mantêm um programa de vigilância ativa dos teores de dioxinas em diversos produtos de origem marinha (peixes), animais silvestres (renas e focas), alimentos (leites, aves, ovos) e o leite materno. Os alimentos provenientes de zonas muito poluídas (Báltico, Mar Negro e Ártico) ainda podem conter teores consideráveis de TCDD e,

portanto, atingir a alimentação humana (Watterson et al., 1999; Jensen, 2003; Roots et al., 2006; 2007).

No Brasil, entre 1997 e 1998, numa fábrica de subprodutos de sumos de citrinos, cascas destes frutos desidratados acidentalmente tiveram TCDD introduzidos. Estas matérias-primas foram exportadas para a Europa (França, Bélgica, Holanda e Alemanha) e utilizadas na alimentação de vacas leiteiras. Na sequência desta utilização, o teor de TCDD nos leites desses animais na Alemanha, aumentou de 0,6 pg/g, registrado em Agosto de 1997, para 1,4 pg/g, em Março de 1998. Em Abril desse mesmo ano foi proibida a incorporação da referida matéria-prima nas rações para animais (Fiedler, 2000; Malisch, 2000; Pereira, 2004).

Existem muitos outros incidentes relatados, de menor dimensão, mas que também resultaram na liberação de dioxinas com prejuízos graves para a saúde humana e para o ambiente. A existência de dioxinas no ambiente e na cadeia alimentar, não é um problema dos países em desenvolvimento, mas sim um problema global e permanente, visto que este poluente é eliminado diariamente em quantidades perigosas (Cardo, 2008).

1.2.2. Estrutura química das dioxinas

As dibenzo-*p*-dioxinas policloradas (PCDDs), frequentemente designadas por “Dioxinas”, é uma classe de compostos aromáticos, tricíclicos, de função éter e estrutura quase planar. Os anéis de benzeno encontram-se ligados a átomos de Hidrogênio, no entanto, esses átomos podem ser substituídos por átomos de cloro. Os derivados das PCDDs, cujas substituições de cloro ocorrem nas posições tetra-, penta-, hexa-, hepta- e octaclorados, são designados TCDD, PeCDD, HxCDD, HpCDD e OCDD, respectivamente (Assunção, 1999; Fiedler et al., 2000).

Dependendo do número de átomos de cloro (1 a 8) e do local da substituição, podem ser distinguidos 75 diferentes congêneres de dioxinas (Assunção, 1999; Fiedler et al., 2000). As

moléculas que possuem números diferentes de átomos de cloro são designadas de congêneres, e aquelas que possuem o mesmo, porém em posições diferentes são denominadas de isômeros. A toxicidade das dioxinas varia consideravelmente, e os congêneres em que a substituição ocorre nas posições 2,3,7 e 8 são especialmente importantes devido à sua toxicidade, estabilidade e persistência. (Assunção, 1999; Fiedler, 2000).

O TCDD é o composto sintético mais tóxico conhecido, capaz de induzir carcinogênese em humanos e outros animais (Figura 1). É lipofílico com capacidade bioacumulativa, sendo extremamente tóxico (Assunção, 1999; Fiedler, 2000). Em animais de laboratório, o TCDD induziu o aparecimento de uma grande variedade de alterações toxicológicas, entre elas: carcinogênese, hepatotoxicidade, fetotoxicidade e toxicidade reprodutiva (Assunção, 1999; Bryant, 2001; Weiss, 2006), sugerindo que há diferenças significativas quanto a sensibilidade e efeitos tóxicos, entre indivíduos da mesma espécie. Esta diferença pode ser observada, por exemplo, em relação a DL50, via oral para ratos, que varia entre 20 a 100 μ /Kg (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental-CETESB, 2011).

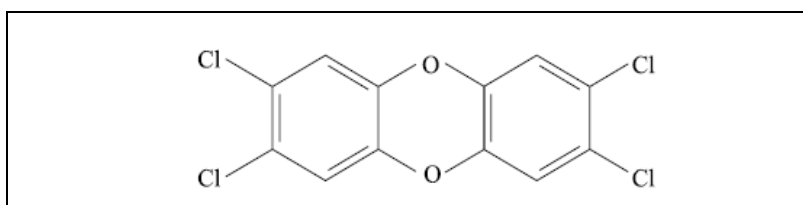


Figura 1: Estrutura química de 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD). Fonte: <http://biopolyverse.com/>. Acesso em 21/04/2014

1.2.3. Fonte de dioxinas

As dioxinas são contaminantes gerados não intencionalmente por atividades das indústrias químicas durante a síntese de praguicidas, água sanitária, plásticos (principalmente o PVC), solventes, tintas, no branqueamento de papel e celulose, durante a incineração de resíduos

urbanos, industriais e hospitalares. As dioxinas também podem ser geradas por fontes naturais (U.S. EPA, 1994; Comissão das Comunidades Europeias, 2007).

As principais fontes de dioxinas podem ser agrupadas em quatro grandes grupos (U.S. EPA, 2005; Comissão das Comunidades Europeias, 2007; Cardo, 2008), sendo elas:

- I. *Combustão* - Inclui a incineração de resíduos (urbanos e hospitalares), a queima de vários combustíveis (como carvão, madeira e derivados do petróleo), fontes de altas temperaturas (cimenteiras) e combustões pouco ou nada controladas (como os fogos florestais, incêndios de edifícios e a queima de lixo);
- II. *Fundições de metais e refinarias* – Podem ser formadas durante vários tipos de operações primárias ou secundárias com metais, incluindo a fundição de ferro e na produção de aço;
- III. *Indústria química* - Formadas como subprodutos da produção de pasta do papel, de fenóis clorados (como o pentaclorofenol), PCBs e herbicidas fenólicos;
- IV. *Processos biológicos* – Estudos recentes sugerem que as dioxinas podem ser formadas sob algumas condições ambientais, como a compostagem, pela ação de microrganismos sobre compostos fenólicos clorados e durante a eliminação dos gases para a superfície.

1.2.4. Toxicidade das dioxinas

Nos mamíferos, as moléculas de dioxinas se ligam a uma proteína solúvel específica, o Receptor Aril hidrocarboneto (AhR), e embora o mecanismo de ação ainda não seja completamente compreendido, sabe-se que as dioxinas podem produzir alterações na regulação de vários genes (expressão e/ou repressão) alterando a função celular (WHO, 1998). Estudos realizados nos últimos anos demonstram que os efeitos mais tóxicos das dioxinas, como toxicidade dérmica, imunotoxicidade, carcinogênese, toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento, são mediados pelo AhR presentes na maior parte dos tecidos de animais, incluindo o homem (Okey, 1994; McGregor et al., 1998). Apesar do AhR regular a expressão de

uma variedade de genes (Denison et al., 1998), os mais estudados são aqueles relacionados com a codificação dos DE, tais como CYP1A1 presentes na maioria das espécies de animais, e utilizado como sistema modelo para compreender o mecanismo pelo qual o AhR regula a expressão de tais genes (Denison & Nagy, 2003). A diversidade estrutural de indutores de CYP1A1 foi relatada pela primeira vez por Owens & Nebert (1975), que demonstrou a capacidade de numerosos compostos como as dioxinas, em induzir a atividade enzimática associada a CYP1A1.

A maioria dos compostos designados Hidrocarbonetos aromáticos halogenados (HAHs), tais como dibenzo-p-dioxinas, dibenzofuranos e bifenóis, apresentam elevada afinidade pelo AhR (Poland & Knutson, 1982; Gillner et al., 1993; Denison & Nagy, 2003), sendo o TCDD considerado o composto mais potente capaz de produzir efeitos toxicológicos diversificados, a maioria dos quais dependentes do AhR (Poland & Knutson, 1982; Safe, 1995).

A maior fonte de exposição para os ligantes AhR, em animais e humanos, são provenientes da dieta (Denison & Nagy, 2003). As dioxinas entram na célula por difusão passiva através da membrana celular e se ligam no citoplasma ao AhR, formando o complexo Dioxina-AhR, que sofre transformação ou ativação e move-se para o núcleo, onde interage com a proteína Aril hidrocarboneto núcleo-transferase (ARNT) para formar, por fosforilação, um complexo heterodímero ligado a cadeias específicas do DNA, e, deste modo, ativam ou reprimem a expressão de vários genes. A ligação das dioxinas ao AhR está correlacionada com o sistema enzimático oxidativo citocromo P-450 (grupo de enzimas quimicamente distintas, mas funcionalmente semelhantes) que se encontram principalmente no retículo endoplasmático dos hepatócitos (Heuvel & Lucier, 1993; Swanson & Bradfield, 1993; Sahlberg et al., 2002).

As enzimas citocromo P-450 são fundamentais para a síntese de esteroides e atuam no metabolismo de outros compostos endógenos. Algumas destas enzimas estão envolvidas nos

processos de biotransformação, conjugação, remoção e/ou bioativação dos DE (Environment Canada, 2003).

As dioxinas são eficazmente absorvidas no trato gastrointestinal e acumulam-se nos tecidos adiposos dos indivíduos, aumentando o risco carcinogênico com tempo prolongado de exposição (Weiss, 2006).

A EPA atribuiu potencial carcinogênico às dioxinas, sendo o TCDD considerado o composto mais tóxico. Os humanos estão expostos ao TCDD por via alimentar, inalatória, placentária e/ou lactação (McGregor et al., 1998; EPA, 2004). Um dos aspectos mais preocupantes da toxicidade da dioxina é, claramente, a extrema sensibilidade do feto e da criança em desenvolvimento. Os efeitos neurológicos e comportamentais podem persistir durante a vida adulta (Children's Environmental Health Protection Act, 2001).

Além do potencial carcinogênico, são atribuídos às dioxinas outros efeitos adversos para a saúde humana, tais como: alterações no desenvolvimento fetal, atrasos mentais, desregulação endócrina e alterações na reprodução (McGregor et al., 1998). A maior parte das informações disponíveis sobre o efeito das dioxinas na saúde humana é obtida de resultados *in vitro*, experimentação animal e de estudos epidemiológicos (Heuvel & Lucier, 1993; Grassman et al., 1998).

Uma exposição ocasional a concentrações altas de dioxinas (toxicidade aguda) pode conduzir ao aparecimento de perturbações da função hepática, perda de peso e lesões cutâneas típicas, conhecidas por “cloracne” que são caracterizadas por erupções acniformes e de manchas escuras na pele devido à hiperqueratose cutânea e hiperplasia (Luscombe, 1999; Charnley & Kimbrough, 2006).

Uma exposição mais prolongada induz ao câncer e conduz à debilidade do sistema imunitário, alterações dos sistemas nervoso e endócrino, da função reprodutiva e do desenvolvimento físico e mental (Luscombe, 1999).

Os efeitos das dioxinas na saúde humana são, portanto, muito diversificados e podem ser muito variáveis entre os indivíduos da mesma espécie, sugerindo que as diferenças genéticas produzem uma resposta diferente (Heuvel & Lucier, 1993; Otles & Yildiz, 2003).

Estudos na Europa e nos EUA mostram que a exposição perinatal às dioxinas tem efeitos no desenvolvimento do cérebro e da tireoide, capaz de induzir alterações no coeficiente de inteligência, alterações comportamentais e de desenvolvimento sexual; no fígado surgem alterações nas enzimas hepáticas; na medula óssea ocorre interferência na hematopoese, no timo pode aparecer involução precoce, podendo a função pulmonar ser também afetada. Um efeito também descrito é a alteração da relação entre as taxas de nascimento de indivíduos do sexo masculino e feminino, com um claro aumento da descendência feminina. Este fenômeno foi verificado após o acidente de Seveso em que, entre 1977 e 1996, a taxa verificada foi de 0,31% (328 homens e 346 mulheres nasceram de pais potencialmente expostos) quando o normal seria de 0,51% (106 homens e 100 mulheres) (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2000; Fiedler et al., 2000; Mocarelli et al., 2000; Okubo et al., 2000; Yoshimura et al., 2001).

1.2.5. Efeitos do TCDD na reprodução masculina de ratos

Tem sido evidenciado que a exposição ao TCDD promove disfunções no sistema genital masculino de ratos, como redução dos pesos dos órgãos reprodutores (Gray et al., 1995, 1997a; Ohsako et al., 2001, 2002), alterações no desenvolvimento da próstata e testículos (Magre et al., 2012), atraso no início da maturação sexual (Chahoud, 1989; Gray et al., 1997a, 1997b) e estresse oxidativo no epidídimo (Latchoumycandane et al., 2003).

Um estudo realizado por Faqi et al. (1998) observaram diminuição do tempo de trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo na prole masculina de ratos, cujas mães foram expostas a 25, 60 e 300ng/Kg de TCDD durante a gestação e lactação, sugerindo que este composto pode comprometer a maturação espermática.

Outro efeito tóxico do TCDD, em baixas doses, é a diminuição dos níveis séricos de testosterona (Mably et al., 1992a; Gray et al., 1997a), o que poderia afetar órgãos andrógeno dependentes, como é o caso do epidídimo. Diferentes doses de TCDD, administradas oralmente em ratas prenhes, no dia gestacional 15 (DG 15), coincidente com a janela do período crítico de desenvolvimento e diferenciação sexual do sistema reprodutor da prole (McIntyre et al., 2002), também promoveram feminização na prole masculina (Mably et al., 1992b; Bjerke et al., 1994) e diminuição do número de espermátides no testículo (Gray et al., 1995).

Segundo Van Waeleghem et al. (1996) a exposição ao TCDD durante o período gestacional e lactacional também provoca queda da motilidade espermática na descendência masculina em ratos, assim como, diminuição do número de espermatozoides na cauda epididimária (Gray et al., 1997a), no entanto, a espermatogênese não é afetada (Foster et al., 2010). Os mecanismos pelo qual a concentração espermática diminuiu são desconhecidos, sugerindo que, mesmo por um curto período de exposição ao TCDD, podem ser observados efeitos deste composto sobre a estrutura do trato genital e a função reprodutiva masculina (Foster et al., 2010).

1.3. Aspectos Estruturais do Epidídimo

Nos testículos, os túbulos seminíferos convergem formando a rede testicular, a qual se continua com os ductos eferentes, os quais, por sua vez convergem para formar um ducto único, longo e altamente enovelado denominado epidídimo (Robaire et al., 2006).

De acordo com as características anatômicas e histológicas do epidídimo, diferentes formas de divisão do órgão em regiões e segmentos têm sido propostas (Nicander, 1956; Hoffer & Karnovsky, 1981; Hermo, 1995; Turner, 2003). No entanto, a classificação mais utilizada para o epidídimo de ratos divide o órgão em quatro regiões distinguíveis macroscopicamente: I. Segmento inicial: porção mais proximal do ducto epididimário, diretamente ligada aos ductos

eferentes; II. Cabeça: região proximal do ducto epididimário em forma de bulbo; III. Corpo: porção estreita localizada na região média do órgão e IV. Cauda: região mais distal do epidídimo de onde emerge o ducto deferente (Figura 2) (Robaire & Hermo, 1988; Turner, 1995).

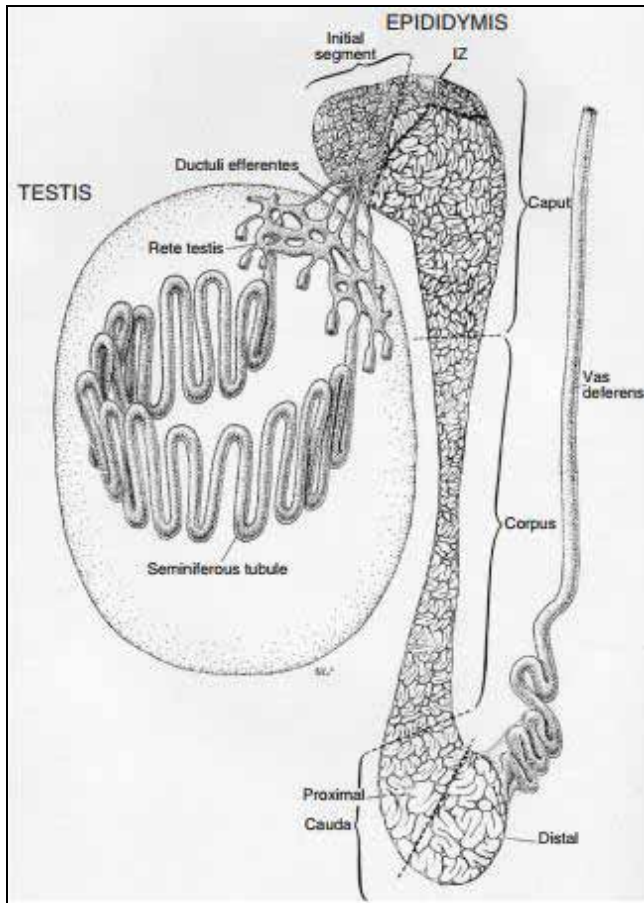


Figura 2: Diagrama representando o testículo contendo túbulos seminíferos e rede testicular, conjunto de ductos eferentes, o epidídimo de rato subdividido em segmento inicial, cabeça, corpo e cauda, e o ducto deferente. [Adaptado de Robaire B and Hermo L, 1988. Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions and their regulation. In *The physiology of Reproduction*, E Knobil and J D Neill, eds., pp. 999-1080. Raven Press, New York].

O epidídimo humano é dividido em apenas três regiões: cabeça, corpo e cauda. A ausência de segmento inicial se deve ao fato da maior parte da cabeça do epidídimo humano ser composta por ductos eferentes (Turner, 2008).

Os diversos tipos celulares que compõem o epitélio epididimário, classificado como pseudoestratificado cilíndrico com estereocílios (Figura 3), variam qualitativa e quantitativamente entre as diferentes regiões do tecido (Reid & Cleland, 1957). Dados da literatura mostram evidências crescentes de que as regiões e tipos celulares do epitélio epididimário são similares entre a maioria dos mamíferos, incluindo o homem (Robaire et al., 2006).

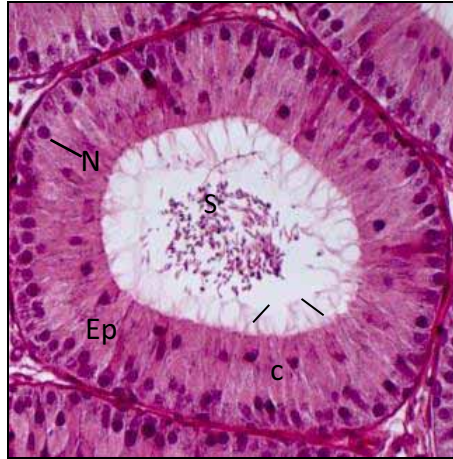


Figura 3: Fotomicrografia do Epidídimo. Ep: Epitélio Pseudoestratificado Cilíndrico com estereocílios; Sz: Espermatozoide; N: Núcleo; Sc: Estereocílios; In: Interstício. Hematoxilina e Eosina (H.E). Barra de escala: 100µm. **Fonte:** Laboratório de Biologia e Toxicologia da Reprodução e do Desenvolvimento – ReproTox.

As células que constituem o epitélio epididimário são classificadas como: células principais, estreitas, apicais, claras, basais e halo, de acordo com a característica celular, localização e abundância no epitélio (Figura 4) (Herms & Robaire, 2002).

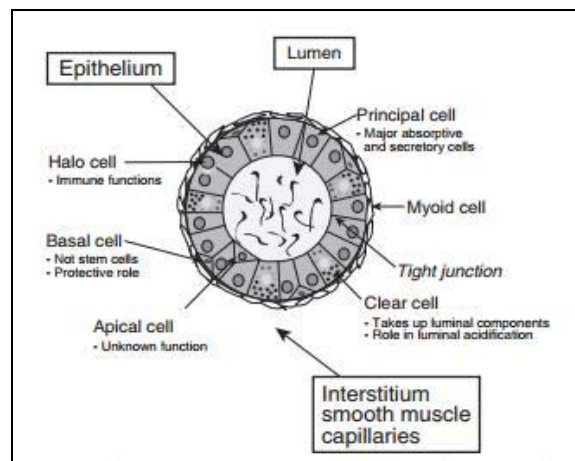


Figura 4: Organização esquemática dos principais tipos celulares presentes no epidídimo. Os três compartimentos do epidídimo, bem como, a posição relativa e a distribuição dos tipos celulares estão ilustradas. As principais funções associadas com cada tipo celular, também estão identificadas. **Fonte:** Robaire, B., Hinton, B., Orgebin-Crist, M.C (2006). The Epididymis. In *The physiology of reproduction* [E. Knobil & J.D. Neil, Eds.], 1071-1148. Elsevier, New York.

As células principais representam a maior população celular do ducto epididimário e dependendo da região pode representar de 65% a 80% da população celular total e, a estrutura e função deste tipo celular variam de acordo com a região do órgão, de modo que, essas diferenças

estão relacionadas à aparência e organização das organelas associadas com a secreção celular e a endocitose (Hermo & Robaire, 2002; Arrotéia et al., 2012). A presença de *tight junctions* na porção luminal de células principais adjacentes forma a barreira hemato-epididimária, fundamental para a manutenção do microambiente luminal e proteção do espermatozóide (Hinton et al., 1995; Robaire et al., 2006).

As células estreitas estão presentes no epidídimo do rato adulto somente no segmento inicial. São caracterizadas pela presença de numerosas vesículas apicais, envolvidas nos processos de endocitose e secreção de íons H^+ para o lúmen (Robaire et al., 2006), atuando na regulação do pH luminal (Adamali & Hermo, 1996; Breton et al., 1999; Pietrement et al., 2006).

Por sua vez, as células apicais são encontradas primordialmente no segmento inicial do epidídimo de rato, entretanto podem ser encontradas em outras regiões epididimárias em ratos com idade avançada (Hermo & Robaire 2002; Arrotéia et al., 2012). As funções específicas das células apicais ainda são pouco conhecidas, mas sabe-se que elas são capazes de realizar endocitose de substâncias luminais (Robaire et al., 2006).

As células claras são células grandes com intensa atividade endocítica presentes na região da cabeça, corpo e cauda do epidídimo, sendo mais numerosas na cauda. São encontradas no epidídimo de diversas espécies animais, incluindo humanos (Vierula et al., 1995; Hermo & Smith, 1998; Robaire et al., 2006). Este tipo celular apresenta ampla atividade endocítica, obtendo várias proteínas a partir da luz do ducto epididimário e fagocitando o conteúdo das gotas citoplasmáticas liberadas pelos espermatozoides ao longo do trânsito pelo epidídimo (Hermo & Robaire, 2002).

Com relação às células basais, sabe-se que elas estão presentes ao longo de todo o órgão e têm contato direto com a membrana basal e não possuem contato direto com a luz do ducto epididimário (Hermo & Robaire, 2002). Tem sido proposto um possível papel imune das células basais, bem como uma função de regulação do transporte de água e eletrólitos realizado pelas

células principais (Cheung et al., 2005) e de endocitose mediada por receptores (Robaire et al., 2006).

As células halo são células pequenas encontradas entre duas células principais adjacentes e estão presentes ao longo de todo ducto epididimário. Trata-se de células derivadas de monócitos, linfócitos T auxiliares ou linfócitos T citotóxicos (Serre & Robaire, 1999; Robaire et al., 2006). A presença destas células sugere que elas podem exercer uma função imunológica no epitélio do ducto epididimário (Hermo & Robaire, 2002).

1.4. Funções Epididimárias

A função primária do epidídimo é o transporte dos espermatozoides que chegam dos testículos (Orgebin-Crist, 1969; Brooks, 1983). No entanto, o epidídimo exerce um papel crucial sobre a maturação espermática, regulando o desenvolvimento da motilidade, a aquisição da capacidade de sofrer reação acrossômica e de reconhecer e fundir-se ao oócito, além de ser sítio de diversas e importantes modificações da membrana plasmática dos espermatozoides. Além disso, o epidídimo protege os gametas masculinos de espécies reativas de oxigênio (ROS) e estoca os espermatozoides na região da cauda (Cosentino & Cockett, 1986; Hermo & Robaire, 2002; Robaire et al., 2006). Estas funções acontecem dentro dos diferentes ambientes luminiais presentes ao longo do ducto epididimário (Rodríguez et al., 2002).

1.4.1. Transporte dos Espermatozoides

Os espermatozoides chegam ao epidídimo impulsionado pelo fluido testicular e provavelmente, pelo batimento ciliar ordenado das células epiteliais dos ductos eferentes. No entanto, é sugerida a existência de outros mecanismos de transporte dos gametas através do ducto epididimário, uma vez que, as células epiteliais do epidídimo apresentam estereocílios

imóveis e o fluido luminal é reabsorvido em grandes quantidades na região dos ductos eferentes e segmento inicial do epidídimo (Robaire et al., 2006).

O transporte dos espermatozoides através do epidídimo também tem sido atribuído à atividade contrátil da camada muscular externa ao ducto (Talo et al., 1979; Markkula-Viitanen et al., 1979; Jaakkola, 1983; Cosentino & Cockett, 1986), constituída por uma camada de células lisas que apresentam espessura e inervação crescentes da região proximal para as regiões mais distais do órgão (Baumgarten et al., 1971).

O tempo da passagem dos espermatozoides através do ducto epididimário é espécie-específica, podendo levar de 3 a 5 dias dependendo da espécie (Cosentino & Cockett, 1986). No rato esse tempo de trânsito dura cerca de 8 dias (Amann et al., 1976; Robb et al., 1978). É durante essa passagem dos gametas através do epidídimo que ocorre a maturação espermática (Dacheux et al., 2005), tornando os espermatozoides, provenientes dos testículos, funcionalmente maduros (Roberts, 2010).

1.4.2. Maturação dos Espermatozoides

Quando os espermatozoides de mamíferos saem dos testículos, eles possuem morfologia altamente especializada, no entanto, são imóveis e incapazes de fertilizar o oócito (Brooks et al., 1983; Hermo & Robaire, 2002; Gatti et al., 2004). É durante essa passagem através do ducto epididimário que muitas características morfológicas e fisiológicas dos gametas são modificadas (Orgebin-Crist, 1969), e deste modo, passam a apresentar movimento progressivo e adquirem habilidade fértil (Robaire et al., 2006; Kempinas & Klinefelter, 2010).

As etapas de maturação espermática, determinantes para a qualidade dos gametas, ainda não são completamente compreendidas (Dacheux et al., 2005; Roberts, 2010), no entanto, esse processo provavelmente depende de uma interação regulada entre a lâmina própria do ducto epididimário, suas células epiteliais, fluido luminal e os pelos próprios gametas (Orgebin-Crist,

1975; Kempinas & Klinefelter, 2010). Sabe-se que o microambiente intraluminal do epidídimo é fundamental durante o processo de maturação dos gametas, visto que, é rigorosamente regulado pela atividade secretora e absorviva das suas células epiteliais (Robaire et al., 2006).

Quando passam pela região de cabeça do epidídimo, os espermatozoides adquirem padrão de motilidade circular e quando saem da cauda epididimária já apresentam movimento progressivo (Cosentino & Cockett, 1986; Robaire et al., 2006). No entanto, no interior do epidídimo os espermatozoides permanecem em estado quiescente até o momento da ejaculação (Brooks, 1983).

A capacidade de reconhecimento e fusão do oócito envolve componentes e domínios específicos na membrana plasmática dos espermatozoides. De tal modo que, ocorrem alterações na membrana dos gametas, permitindo a exposição dos receptores de superfície necessários para o reconhecimento espécie-específica entre o espermatozóide e o oócito, possibilitando a fecundação (Brooks, 1983). Essas alterações incluem a remodelação dos domínios específicos da membrana plasmática dos gametas durante sua passagem pelo epidídimo, através da degradação e /ou liberação de componentes testiculares e integração de componentes secretados pelo epitélio epididimário associados a eventos de glicolização e deglicolização (Gatti et al., 2004).

1.4.3. Estocagem dos Espermatozoides

Nos mamíferos, a região mais importante de estocagem de gametas é a cauda epididimária, e dependendo da espécie de mamífero considerada, os gametas podem ser estocados na região de cauda por períodos em torno de 30 dias (Orgebin-Crist et al., 1975). As condições especiais que permitem a estocagem dos espermatozoides em um estado quiescente na cauda epididimária ainda não são completamente conhecidas, porém sabe-se que, o pH luminal e a presença da proteína imobilina são considerados fatores importantes durante esse processo (Carr et al., 1985).

Os espermatozoides que estão estocados na cauda do epidídimo apresentam idades diferentes, pois chegam em momentos distintos nesta região do órgão. Isso permite que eles respondam à capacitação e sofram reação acrossômica em momentos diferentes após a entrada no trato genital feminino, estratégia muito importante para animais de fecundação interna (Sullivan et al., 2005).

1.4.4. Proteção dos Espermatozoides

A barreira hemato-epididimária possibilita a formação de um microambiente luminal especializado, fundamental para a manutenção espermática. Esta barreira também protege os espermatozoides contra o sistema imunológico, ROS, agentes xenobióticos, dentre outros fatores. Os mecanismos de defesa incluem a restrição dos compostos que alcançam o ambiente luminal, a síntese e secreção de proteínas específicas e a síntese e secreção de compostos antioxidantes. O epidídimo também protege os gametas de mudanças acentuadas no potencial osmótico (Robaire et al., 2006).

Cada região ou segmento epididimário desenvolveu seus próprios mecanismos de proteção aos espermatozoides, devido ao fato de que a atividade metabólica difere entre as regiões do epidídimo, produzindo diferentes tipos de ROS e ao fato dos gametas apresentarem-se em diferentes graus de maturação, dependendo da região do ducto epididimário (Robaire et al., 2006).

2. Referências

Bibliográficas

- Adamali HI, Hermo L. Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *J Androl* 1996; 17(3): 208-222.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry [ATSDR]. Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs). <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp17.pdf/>; 2000 [acesso maio 2014].
- Amann RP, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Biol Reprod* 1987; 40: 183-197.
- Arrotéia KF, Garcia PV, Barbieri MF, Justino ML, Pereira LAV. Embriology, structure, function and its role in fertilization and infertility. In: Pereira LAV (Ed.). *The epididymis – Embriology, Updates and highlights on classic topics Croatia: InTech; 2012, p. 41-66.*
- Assunção J, Pesquero C. Dioxinas e furanos: origens e riscos. *Rev Saúde Públ* 1999; 33(5): 523-530.
- Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *New Engl J Med* 1995; 332: 281-285.
- Baumgarten BH, Holstein AF, Rosengren E. Arrangement, ultrastructure and adrenergic innervation of smooth musculature of the ductuli efferents, ductus epididymis and ducts deferens of man. *Z zellforsch Mikrosk Anat* 1971; 120(1): 37-79.
- Bertazzi P, Bernucci I, Brambilla G, Consonni D, Pesatori A. The Seveso Studies on Early and Long-Term Effects of Dioxin Exposure, Milan, Italy. *Environ Health Perspect* 1998; 106(2): 625-633. Review.
- Bjerke DL, Brown TJ, MacLusky NJ, Hochberg RB, Peterson RE. Partial demasculinization and feminization of sex behavior in male rats by in utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin is not associated with alterations in estrogen receptor binding or volumes of sexually differentiated brain nuclei. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; 127: 258–267.

- Blystone CR, Lambright CS, Cardon MC, Furr J, Rider CV, Hartig PC, Wilson V, Gray LE Jr. Cumulative and antagonistic effects of a mixture of the antiandrogens vinclozolin and iprodione in the pubertal male rat. *Toxicol Sci* 2009; 111(1): 179-188.
- Bordjiba O, Steiman R, Kadri M, Semadi A, Guiraud P. Removal of herbicides from liquid media by fungi isolated from a contaminated soil. *J Environ Qual* 2001; 30: 418-426.
- Bratt RV. Environmental influence on reproductive health. *Am J Obst Gynecol* 2000; 70: 69-75.
- Breton S, Tyszkowski R, Sabolic I, Brow D. Postnatal development of H⁺ ATPase (proton-pump)-rich cells in rat epididymis. *Histochem Cell Biol* 1999; 111(2): 97-105.
- Brooks DE. Epididymal functions and their hormonal regulation. *Aust J Biol Sci* 1983; 36: 205-221.
- Bryant P, Schmid J, Fenton S, Bckalew A, Abbott B. Teratogenicity of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice Lacking the Expression of EGF and/or TGF- α , North Carolina, USA. *Toxicol Sci* 2001; 62: 103-114.
- Cardo MJSO. Gestão de Risco de Dioxinas em Produtos Avícolas. Universidade Técnica de Lisboa 2008; 1-143.
- Carr DW, Usselman MC, Acott TS. Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. *Biol Reprod* 1985; 33: 588-5985.
- Chahoud I, Hartmann J, Rune GM, Neubert D. Reproductive toxicity and toxicokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 3. Effects of single doses on the testis of male rats. *Arch Toxicol* 1992; 66: 567-572.
- Chapin RE, Harris MW, Davis BJ, Ward SM, Wilson RE, Mauney MA, Lockhart AC, Smialowics RJ, Moser VC, Burka LT, Collins BJ. The effects of perinatal/juvenile methoxychlor exposure on adult rat nervous, immune and reproductive system function. *Fundam Appl Toxicol* 1997; 40: 138-157.

- Charnley G, Kimbrough R 2006. Overview of Exposure, Toxicity, and Risks to Children from Current Levels of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and Related Compounds in the USA. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 601–615.
- Cheung KH, Leung GP, Leung MC, Shum WW, Zhou WL, Wong PY. Cell-interaction underlies formation of fluid in the male reproductive tract of the rat. *J Gen Physiol* 2005; 125(5): 443-454.
- Children's Environmental Health Protection Act [CEHPA]. Polychlorinated Dibenzo *p*-dioxins (PCDDs), Dibenzofurans (PCDFs) and Biphenyls (PCBs). http://oehha.ca.gov/air/toxic_contaminants/pdf_zip/dioxin_Final.pdf/; 2001 [acesso Abril 2014].
- Comissão das Comunidades Europeias (CCE). Comunicação da Comissão ao Conselho ao Parlamento Europeu e ao Comitê Econômico e Social Europeu (COM (2001) 593): Sobre a aplicação prática da estratégia comunitária em matéria de dioxinas, furanos e policlorobifenilos. <https://infoeuropa.euroid.pt/registo/000039954/>; 2007 [acesso Janeiro 2012].
- Comissão das Comunidades Europeias (CCE). Recomendação da Comissão relativa à redução da presença de dioxinas, furanos e PCB nos alimentos para animais e nos gêneros alimentícios. http://www.vetbiblios.pt/LEGISLACAO_TECNICA/ALIMENTOS_PARA_ANIMAIS/Substancias_indesejaveis-Residuos/Recomendacao_2013-711_03-12.pdf/; 2002 [acesso Janeiro 2012].
- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental [CETESB]. Ficha de Informação de Produto Químico. <http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha>; 2011 [acesso em Dezembro 2012].

- Conselho da União Europeia [CUE]. Regulamento que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios. http://europa.eu/legislation_summaries/other/l21115k_pt.htm/; 2001 [acesso Janeiro 2012].
- Cosentino MJ, Cokett AT. Structure and function of the epididymis. *Urol Res* 1986; 14(5): 229-240.
- Czeizel A. Increasing trends in congenital malformations of male external genitalia. *Lancet* 1985; 8426: 462-463.
- Dacheux JL, Castella S, Gatti JL, Dacheux F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* 2005; 63: 319-341.
- Denison MS, Seidel SD, Rogers WJ, Ziccardi M, Winter GM, Heath-Pagliuso S. Natural and synthetic ligands for the Ah receptor. In: Puga A, Wallace KB (Eds.). Philadelphia: Taylor & Francis; 1998, p. 393-410.
- Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43: 309-34.
- Dwernychuk L, Cau H, Hatfield C, Boivin T, Hung T, Dung P, Thay N. Dioxin Reservoirs in Southern Viet Nam: A legacy of Agent Orange, Vancouver, Canada. *Chemosp* 2002; 47: 117-137.
- Deutsche W. Explosão provoca vazamento de dioxina em Seveso. <http://www.dw-world.de/article/0,,871315,00.html/>; 2011 [acesso novembro 2011].
- Environment Canada [EC]. National Science Assessment on Dioxins and Furans in the Canadian Aquatic Environmet. <http://publications.gc.ca/collections/Collection/En1-34-5-2003E.pdf/>; 2003 [acesso Abril 2014].
- Faqi AS, Dalsenter PR, Merker HJ, Chahoud I. Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 150: 383-392.

- Fiedler H, Hutzinger O, Welsch-Pausch K, Schmiedinger A. Evaluation of the Occurrence of PCDD/PCDF and POPs in Wastes and Their Potential to Enter the Foodchain. University of Bayreuth, Germany. *Ecol Chem Geoch* 2000; 127.
- Foster WG, Maharaj-Briceño S, Cyr DG. Dioxin-Induced Changes in Epididymal Sperm Count and Spermatogenesis. *Environ Health Perspect* 2010;118: 458-464. Review.
- Gatti JL, Castella S, Dacheux F, Ecruyd H, Métayer S, Thimon V, Dacheux JL. Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci* 2004; 82: 321-339.
- Gillner M, Bergman J, Cambillau C, Alexandersson M, Fernstro B, Gustafsson JA. Interactions of indolo [3,2-b]carbazoles and related polycyclic aromatic hydrocarbons with specific binding sites for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin in rat liver. *Molec Pharmacol* 1993; 44: 336-45.
- Grassman J, Masten S, Walker N, Lucier G. Animal Models of Human Response to Dioxins. National Institute of Environmental Health Sciences, North Carolina, USA. *Environ Health Perspect* 1998; 106(2): 761-775.
- Gray LE Jr, Ostby JS. In utero 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) alters reproductive morphology and function in female rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; 133: 285–294.
- Gray LE, Ostby JS, Kelce WR. A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male Long Evans Hooded rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997a; 146: 11–20.
- Gray LE, Wolf C, Mann P, Ostby JS. In utero exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters reproductive development of female Long Evans hooded rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997b; 146: 237–244.

- Gray LE Jr, Ostby J, Furr J, Wolf CJ, Lambright C, Parks L. Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 248-264.
- Gray LE Jr, Wilson VS, Stoker T, Lambright C, Furr J, Noriega N, Howdeshell K, Ankley GT, Guilletes L. Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. *Int J Androl* 2006; 29: 96-104.
- Gochfeld M. Dioxin in Vietnam – The Ongoing Saga of Exposure, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, USA. *J Occup Med* 2001; 43: 433-434.
- Hermo L, Barin K, Robaire B. Structural differentiation of the epithelial cells of the testicular excurrent duct system of rats during postnatal development. *Anat Rec* 1992; 233: 205-28.
- Hermo L. Structural features and functions of principal cells of the intermediate zone of the epididymis of adult rat. *Anat Rec* 1995; 242: 515-530.
- Hermo L, Smith CE. The structure of the Golgi apparatus: a sperm's eye view in principal epithelial cells of the rat epididymis. *Histochem Cell Biol* 1998; 109(5-6): 431-447.
- Hermo L, Robaire B. Epididymal cell types and their functions. In: Robaire B, Hinton BT (Eds). *The epididymis – from molecules to clinical practice*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher; 2002, p. 81-102.
- Heuvel J, Lucier G. Environmental Toxicology of Polychlorinated Dibenzo-p- Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans, National Institute of Environmental Health Sciences, Laboratory of Biochemical Risk Analysis, USA. *Environ Health Perspect* 1993; 100:189-200.
- Hinton BT, Palladino MA, Rudolph D, Labus JC. The epididymis as protector of maturing spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7(4):731-745.
- Hoffer AP, Karnovsky ML. Studies on zonation in the epididymis of the guinea pig: ultrastructural and biochemical analysis of the zone rich in large lipid droplets (zone II) *Anat Rec* 1981; 201: 623-633.

- Hotchkiss AK, Ostby JS, Vandenberg JG, Gray LE Jr. Androgens and environmental antiandrogens affect reproductive development and play behavior in the Sprague-Dawley rat. *Environ Health Perspect* 2002; 110(3): 435-439.
- Jaakkola UM. Regional variations in the transport of the luminal contents of the rat epididymis in vitro. *J Reprod Fertil* 1983; 68: 465-470.
- Jensen A. Dioxin pollution in the Baltic Sea – what have we learned? Danish EPA. *Res Rep* 2003;796: 1-3.
- Kavlock RJ. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 1996; 104: 715-740.
- Kempinas WDG, Klinefelter GR. The epididymis as a target for toxicants. In: Charlene A. McQueen (Ed.). *Comprehensive Toxicology*, Oxford: Academic press; 2010: p. 149-166.
- Klinefelter GR, Suarez, JD. Toxicant-induced acceleration of epididymal sperm transit: androgen-dependent proteins may be involved. *Reprod Toxicol* 1997; 11(4): 511-519.
- Latchoumycandane C, Chitra EKC, Mathur EPP. 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p -dioxin (TCDD) induces oxidative stress in the epididymis and epididymal sperm of adult rats. *Arch Toxicol* 2003; 77: 280–284.
- Lucas A. Proramming by early nutrition in man. In: Bock GR, Whelan J (Eds.). *The childhood environment and adult disease*. CIBA Foundation Symposium 156. Chichester, UK: Wiley; 1991, p. 38-55.
- Luscombe D. Dioxinas e furanos: efeitos sobre a saúde humana. São Paulo, Brasil. Greenpeace; 1999, p.19.
- Mably TA, Bjerke DL, Moore RW, Gendron-Fitzpatrick A, Peterson RE. 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* 1992a; 114: 118–126.

- Mably TA, Moore RW, Goy RW, Peterson RE. In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 2. Effects on sexual behavior and the regulation of luteinizing hormone secretion in adulthood. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992b; 114: 108–117.
- Magre S, Rebourcet D, Ishaq M, Wargnier R, Debard C, Meugnier E, Vidal H, Cohen-Tannoudji J, Magueresse-Battistoni BL. Gender Differences in Transcriptional Signature of Developing Rat Testes and Ovaries following Embryonic Exposure to 2,3,7,8-TCDD. *PLoS ONE* 2012; 7: e40306.
- Malisch R. Increase of the PCDD/F-contamination of milk, butter and meat samples by use of contaminated citrus pulp, Chemische Landesuntersuchungsanstalt Freiburg, Germany. *Chemosp* 2000; 40: 1041-1053.
- Mantovani A. Risk assessment of endocrine disrupters. The role of toxicological studies. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1076: 239–252.
- Markkula-Viitanen M, Nikkanum V, Talo A. Electrical activity and intraluminal pressure of the cauda epididymis of the rat. *J Reprod Fertil* 1979; 57: 431-435.
- McGregor D, Partensky C, Wilbourn J, Rice J. An IARC Evaluation of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans as Risk Factors in Human Carcinogenesis, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 755-760.
- McIntyre BS, Barlow NJ, Foster PM. Male rats exposed to linuron in utero exhibit permanent changes in anogenital distance, nipple retention, and epididymal malformations that results in subsequent testicular atrophy. *Toxicol Sci* 2002; 65: 62-70.
- Mocarelli P, Gerthoux P, Ferrari E, Patterson D, Kieszak S, Brambilla P, Vincoli N, Signorini S, Tramacere P, Carreri V, Sampson E, Turner W, Needham L. Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offspring, University Milano-Bicocca, Milano, Italy. *Lancet* 2000; 355: 1858-1863.

- Nethersell A.B., Drake L.K., Sikora K. The increasing incidence of testicular cancer in East Anglia. *Brit J Can* 1984; 50: 377-380.
- Nicander L, Osman DI, Ploen L, Bugge HP, Kvisgaard KN. Early effects of efferent ductule ligation on the proximal segment of the rat epididymis. *Int J Androl* 1983; 6(1): 91-102.
- Okey AB, Riddick DS, Harper PA. The Ah receptor: mediator of the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds, University of Toronto, Toronto, Canada. *Toxicol Let* 1994; 70(1): 1-22. Review.
- Okubo Y, Suwazono Y, Kobayashi E, Nogawa K. Altered Sex Ratio of Offspring in Chemical Industry Workers, Chiba University School of Medicine, Chiba, Japan. *J Occup Health* 2000; 42:147–148.
- Orgebin-Crist MC. Studies on the function of the epididymis. *Biol Reprod* 1969; 1: 155-175.
- Orgebin-Crist MC, Danzo BJ, Davies J. Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. In: Greep RO, Astwood EB (Eds.). *Handbook of Physiology*, Washington DC: American Physiology Society; 1969, p.319-38.
- Ohsako S, Miyabara Y, Nishimura N, Kurosawa S, Sakaue M, Ishimura R, et al. Maternal exposure to a low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) suppressed the development of reproductive organs of male rats: dose-dependent increase of mRNA levels of 5alpha-reductase type 2 in contrast to decrease of androgen receptor in the pubertal ventral prostate. *Toxicol Sci* 2001; 60: 132-143.
- Ohsako S, Miyabara Y, Sakaue M, Ishimura R, Kakeyama M, Izumi H, et al. Developmental stage-specific effects of perinatal 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure on reproductive organs of male rat offspring. *Toxicol Sci* 2002; 66: 283–292.
- Otles S, Yildiz H. Dioxin in food and human health, Ege University, Food Engineering Department, Izmir, Turkey, *Electron. J Environ Agric Food Chem* 2003; 2: 593- 608.

- Pereira M. Polychlorinated Dibenzo-*p*-dioxins (PCDD), Dibenzofurans (PCDF) and Polychlorinated Biphenyls (PCB): Main sources, environmental behaviour and risk to man and biota. Universidade Federal Fluminense, Rio Janeiro, Brasil. *Quim Nov* 2004; 27(6): 934-943.
- Pietrement C, Sun-Wada GH, Silva ND, Mckee M, Marshansky V, Brow D, Futai M, Breton S. Distinct expression patterns of different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymis. *Biol Reprod* 2006; 74(1): 185-194.
- Pike MC, Chilvers CE, Bobrow LG. Classification of testicular cancer in incidence and mortality statistics. *Brit J Can* 1987; 56: 83-85.
- Poland A, Knutson JC. 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1982; 22: 517-42.
- Rajalakshmi M. Appearance of specific proteins in rat epididymis during postnatal development. *Arch Androl* 1985; 15(1): 49-52.
- Reid BL, Cleaned KW. The structure and function of the epididymis. The histology of the rat epididymis. *Aus J Zool* 1957; 5(3): 223-251.
- Robaire B, Hermo L. Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions and their regulation. In: Knobil E, Neil JD (Eds.). *The physiology of reproduction*, New York: Raven Press Ltd; 1988, p. 999-1080.
- Robaire B, Hinton B, Orgebin-Crist MC. The Epididymis. In: Knobil E, Neil JD (Eds.). *The physiology of reproduction*, New York: Elsevier; 2006, p. 1071-1148.
- Robb GW, Amann RP, Killian GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil* 1978; 54(1): 103-107.
- Roberts KP. What are the components of male reproductive system? In: *The American society of andrology* (Eds.). *Handbook of Andrology*, Lawrence: Allen Press; 2010, p.1-5.

- Rodríguez CM, Kirby JL, Hinton BT. The Development of the Epididymis. In: Robaire B, Hinton BT (Eds). *The epididymis – from molecules to clinical practice*, New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher; 2002, p. 251-268.
- Roots O, Schramm K, Simm M, Henkelmann B, Lankov A. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in Baltic herring and sprat in the north-eastern part of the Baltic Sea. *Proc. Estonian Environmental Research Centre, Tallinn, Estonia. Estonian. Acad Sci Biol Ecol* 2006; 55(1): 51-60.
- Roots O, Simm M. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran and biophenyl content in selected groups of Baltic herring and sprat from Estonian coastal waters in 2006, Estonian Environmental Research Centre, Tallinn, Estonia. *Oceanol* 2007; 49(3): 293–303.
- Safe S. Modulation of gene expression and endocrine response pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related compounds. *Pharmacol Therap* 1995; 67: 247–81.
- Sahlberg C, Pohjanvirta R, Gao Y, Alaluusua S, Tuomisto J, Lukinmaa P. Expression of the mediators of dioxin toxicity, aryl hydrocarbon receptor (AHR) and the AHR nuclear translocator (ARNT), is developmentally regulated in mouse teeth. *Int J Dev Biol* 2002; 46: 295-300.
- Serre V, Robaire B. Distribution of immune cells in the epididymis of the aging Brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content. *Biol Reprod* 1999; 61(3): 705-714.
- Schechter A, Dai L, Thuy L, Quynh H, Minh D, Cau H, Phiet P, Nguyen N, Constable J, Baughman R. Agent Orange and the Vietnamese: the persistence of elevated dioxin levels in human tissues, University of New York Health Science, New York, USA. *Am J Public Health* 1995; 85(4): 516-522.
- Schechter A, Dai L, Papke O, Prang J, Constable J, Matsuda M, Thau V, Piskac A. Recent Dioxin Contamination from Agent Orange in Residents of a Southern Vietnam City, University of Texas School of Public Health, Dallas, USA. *J. Occup Environ Med* 2001; 43: 435-443.

- Sharpe RM, Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?. *Lancet* 1993; 35: 1392-1395.
- Sharpe RM. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006; 20(1): 91-110. Review.
- Silveira PP, Portella AK, Goldani MZ, Barbieri MA. Developmental origins of health and disease (DOHaD). *J Pediatr* 2007; 83(6): 494-504.
- Sociedade Brasileira de Urologia [SBU]. Tumores do Testículo. Câncer Urológico. <http://www.sbu.org.br/2010/03/tumores-do-testiculo/>; 2010 [acesso Novembro 2011].
- Stoker TE, Parks LG, Gary E, Cooper RL. Endocrine-disrupting chemicals: Prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. *Crit Rev Toxicol* 2000; 30(2): 197-252.
- Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis* 2005; 35: 1-10.
- Swanson HI, Bradfield CA. The Ah-receptor: genetics, structure and function, Northwestern University Medical School, Chicago, Illinois, USA. *Pharmacog* 1993; 3(5): 213-230.
- Talo A, Jaakkola UM, Markkula-Viitasmen M. Spontaneous electrical activity of the rat epididymis in vitro. *J Reprod Fertil* 1979; 57: 423-429.
- Tarin D. Tissue interactions and the maintenance of histological structure in adults. In: Tarin D (Ed.). *Tissue Interactions in Carcinogenesis*, London: Academic Press; 1972, p.81-94.
- Turner TT. On the epididymis and its role in the development of the fertile ejaculate. *J Androl* 1995; 16(4): 292-298.
- Turner TT, Bomgardner D, Jacobs JP, Nguyen AA. Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction* 2003; 125(6): 871-878.
- Turner TT. De Graaf's thread: the human epididymis. *J Androl* 2008; 29(3): 237-250.

- United States Environment Protection Agency [EPA]. The 1994 EPA Dioxin Reassessment, Health Assessment, Volume III: Risk Characterization. <http://www.cqs.com/dioxheal.htm/>; 1994 [acesso Maio 2014].
- United States Environmental Protection Agency [EPA]. Office of Research and Development, Information Sheet 2. Dioxin: Scientific Highlights from the NAS Review Draft of EPA's Dioxin Reassessment. <http://oaspub.epa.gov/eims/eimscom/>; 2004 [acesso Maio 2014].
- United States Environment Protection Agency [EPA]. The Inventory of Sources and Environmental Releases of Dioxin-Like Compounds in the United States: The Year 2000 Update. <http://http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=235432/>; 2006 [acesso Maio 2014].
- Vierula ME, Rankin TL, Orgebin-Crist MC. Electron microscopic immunolocalization of the 18 and 29 kilodalton secretory proteins in the mouse epididymis: evidence for differential uptake by clear cells. *Microsc Res Tech* 1995; 30(1): 24-36.
- Van Waelegheem K, De Clercq N, Vermeulen L, Schoonjans F, Comhaire F. Deterioration of sperm quality in young healthy Belgian men. *Hum Reprod* 1996; 11: 325–329.
- Watterson J, Buckley-Golder D, Woodfield M. Environmental Transport and Fate of Dioxins and the Modelling of these Processes, AEA Technology, Oxfordshire, UK, *Nat. Environ Techn Cent* 1999; 117.
- Weiss J. Human exposure to persistent organic pollutants. Department of Environmental Chemistry, Stockholm University, Stockholm, 2006; p 89.
- World Health Organization [WHO]. Assessment of the health risk of dioxins: re-evaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI). <http://www.who.int/ipcs/publications/en/exe-sum-final.pdf/>; 1998 [acesso Janeiro 2012].
- World Health Organization [WHO]. The WHO recommended classification of pesticides by hazard; http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard/; 2002 [acesso Janeiro 2012]

Yoshimura T, Kaneko S, Hayabuchi H. Sex ratio in offspring of those affected by dioxin and dioxin-like compounds: the Yusho, Seveso and Yucheng incidents, University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu, Japan. *Occup Environ Med* 2001; 58: 540-541.

3. Justificativa e Relevância do Tema

Sabe-se que o desenvolvimento adequado do sistema genital masculino depende de uma série de eventos que se iniciam na vida fetal e continuam após o nascimento. Todas estas fases são reguladas por mecanismos dependentes de fatores hormonais e genéticos.

A exposição a substâncias químicas podem contribuir para o surgimento de distúrbios em várias estruturas e funções envolvidas na reprodução de seres humanos e de outras espécies de animais, o que vem sendo motivo de grande preocupação nos últimos anos. Efeitos induzidos por essas substâncias podem ocorrer pela interação direta da substância com componentes do sistema genital ou indiretamente pela interferência na regulação endócrina, visto que, tanto o desenvolvimento quanto a manutenção do sistema reprodutivo é dependente de interações hormonais. Sendo assim, a interferência de qualquer tóxico na interação do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, responsável pela regulação endócrina, pode perturbar a homeostase reprodutiva e conseqüentemente levar a anormalidades.

O interesse em se estudar esses agentes químicos introduzidos ou disseminados pelo homem no ambiente tem aumentado, pois existem evidências de afetar drasticamente o desenvolvimento normal do sistema genital, promovendo alterações que se perpetuam no indivíduo, podendo inclusive diminuir a qualidade espermática humana e em outros animais.

O homem e outros animais estão propensos à exposição ao TCDD, principalmente, devido à ingestão de alimentos contaminados e em períodos críticos de desenvolvimento, sobretudo, durante a vida intrauterina e pós-natal. Considerando-se que na literatura os trabalhos acerca dos efeitos do TCDD na saúde reprodutiva da descendência masculina são escassos e precisam ser confirmados e elucidados, tanto em animais de experimentação como em humanos, principalmente, sua ação sobre as funções epididimárias e na qualidade espermática.

O presente estudo visou avaliar a exposição *in utero* ao TCDD (em baixas doses) e investigar os possíveis efeitos tóxicos sobre a função sexual da prole masculina quando adulta,

com ênfase nas funções epididimárias e na qualidade espermática, e se esses efeitos poderiam ser transmitidos para as próximas gerações.

Os resultados e discussão gerados a partir deste projeto estão apresentados a seguir na forma de um artigo científico a ser submetido à revista científica internacional da área.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos transgeracionais da exposição *in utero* ao TCDD no sistema genital masculino da prole quando adulta, com ênfase nas funções epididimárias e na qualidade espermática.

4.2. Objetivos Específicos

Para alcançar o objetivo descrito acima, foram realizadas análises espermáticas (número e tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo, motilidade e morfologia espermática), de fertilidade após inseminação artificial *in utero* e dosagem dos hormônios testosterona, FSH e LH.

5. Capítulo

Este presente estudo deu origem a um manuscrito que será apresentado a seguir.

5.1 Manuscrito

O manuscrito foi intitulado “Sperm quality and fertility in rats after prenatal exposure to low doses of TCDD: a three-generation study” e será submetido para publicação no periódico “*Reproduction*”, *The Journal of the Society for Reproduction and Fertility*, ISSN: 1470-1626, Fator de impacto: 3.262.

1 **Sperm quality and fertility in rats after developmental exposure to low doses of TCDD: a**
2 **three-generation study**

3 Marciana Sanabria¹, Maira Smaniotto Cuciolo¹, Marina Trevizan Guerra¹, Cibele dos Santos
4 Borges¹, Thais Petrochelli Banzato¹, Juliana Elaine Perobelli¹, Gabriel Adan Araújo Leite¹,
5 Janete Aparecida Anselmo-Franci² and Wilma De Grava Kempinas¹

6
7 ¹Laboratory of Reproductive Biology and Toxicology of Reproduction and Development,
8 Department of Morphology, Institute of Biosciences, UNESP - Univ Estadual Paulista, Botucatu,
9 SP, Brazil. ²Department of Morphology, Stomatology and Physiology, School of Dentistry, USP
10 – University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

11

12

13 Correspondence should be addressed to M Sanabria; Email: marcisanabria@gmail.com.

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23 **Abstract**

24 Fetal exposure to Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin (TCDD) causes defects in the male reproductive
25 system of the rat. This study evaluated the effects of developmental exposure to low doses of
26 TCDD in the male genital tract, with emphasis on sperm quality, and whether these effects
27 would be transmitted to the next generation. For this, pregnant rats were exposed to low doses of
28 TCDD (0.1; 0.5 and 1.0 μ g), on gestational day 15 and subsequently their adult male offspring, in
29 three-generation study, were investigated for reproductive parameters and fertility after artificial
30 insemination *in utero* (AI). TCDD accelerated sperm transit time through in the cauda
31 epididymis, and percentages of morphologically normal sperm and testosterone levels were
32 decreased in the TCDD-exposed rats (F0). The proportions of implants per corpora lutea was
33 also significantly decreased in all the generations, at least one dose of TCDD tested. In
34 conclusion, TCDD exposure, under these experimental conditions, decreases rat sperm quality
35 and fertility in adult male offspring and this effect is persistent in the next generation.

36

37 Keywords: dioxin, rat, epididymis, sperm quality, fertility, transgenerational effect

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48 **Introduction**

49 Dioxins, a class of persistent polychlorinated aromatic hydrocarbons and some of the
50 most potent environmental contaminants, induce a wide spectrum of toxic responses in
51 experimental animals, including reproductive, developmental and immunologic toxicities as well
52 as carcinogenicity (Williams & Iatropoulos 2001). The compound 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-
53 dioxin (TCDD), one of the most potent environmental contaminants, is formed not only as an
54 unwanted byproduct in the manufacture of chlorinated hydrocarbons, but also in incineration
55 processes, paper and pulp bleaching, and emissions from steel foundries and motor vehicles
56 (Skene *et al.* 1989). The lipophilicity and low rate of metabolism of TCDD leads to its
57 accumulation and persistence in adipose tissue (Enan *et al.* 1998).

58 The major source of human exposure to dioxins is through the diet (Porterfield 1994),
59 almost exclusively through consumption of animal foods including meat, fish and dairy products
60 (Environmental Protection Agency 2004). The dioxins can also be transferred during intrauterine
61 life through placenta and /or in the postnatal life via lactation (Faqi *et al.* 1998).

62 Several studies demonstrated a strong association between exposure to environmental
63 chemicals *in utero* or during initial phases of extrauterine life and the development of chronic
64 diseases in later life (Lucas 1991). In many animal species, these substances reach the fetus via
65 the mother/placenta and/or the offspring via the mother's milk (Silveira *et al.* 2007).

66 TCDD exposure during development alters the characteristics of different tissues, leading
67 to effects in adulthood. It has been recognized that chemicals that are able to reprogram
68 developing tissues can in principle also alter the characteristics of germ cells, leading to effects
69 that span generations after the exposure (Nilsson *et al.* 2012). Because these chemicals alter gene
70 expression and phenotype in a heritable manner, yet do not alter the DNA sequence in the
71 genome, these effects have been termed epigenetic (Baker *et al.* 2014).

72 Maternal exposure to TCDD has been reported to cause diverse changes in the
73 reproductive system of male offspring, including reduced sperm count, decreases of ventral
74 prostate size and anogenital distance, feminized sexual behavior and impaired prostate
75 development and testes (Bjerke *et al.* 1994a,b, Faqi *et al.* 1998, Gray *et al.* 1995, Gray *et al.*
76 1997a, Mably *et al.* 1992a,b,c, Magre *et al.* 2012).

77 During the past decades, several reports have suggested that the quality of semen in
78 normal men is declining due to chemical exposures (Auger *et al.* 1995), suggesting that the target
79 of these toxic substances is the epididymis (Klinefelter *et al.* 1997), an organ of the male
80 reproductive system that performs a variety of functions, including the transport, protection,
81 maturation, concentration and storage of sperm (Hermo & Robaire 2002).

82 Mammalian spermatozoa, as they leave the testes, are functionally immature cells that
83 necessitate a maturation process during the passage through the epididymis, to acquire the
84 capacity of recognition and fertilization of the oocyte (Hermo & Robaire 2002). During transit
85 through the epididymis, many morphological, physiological and biochemical characteristics of
86 the spermatozoa are modified, as part of the maturation process (Orgebin-Crist 1969).

87 TCDD-induced changes in cauda epididymal sperm counts provide clear evidence of
88 developmental toxicity without an effect on spermatogenesis. The mechanisms underlying
89 decreased epididymal sperm count are unknown; however, epididymal function is the key target
90 for the adverse effects of TCDD (Foster *et al.* 2010). The aim of the present study was to
91 investigate the effects of developmental exposure to TCDD in the male genital tract, with
92 emphasis on sperm quality, and whether these effects would be transmitted to the three
93 generations.

94

95 **Materials and Methods**

96 *Animals*

97 Adult female (60 days of age, weighing 230g) and male (90 days of age, weighing 400g)
98 Wistar rats were supplied by Central Biotherium of State University of São Paulo (UNESP) and
99 maintained in polypropylene cages (43x 30x 15cm) with laboratory grade pine shavings as
100 bedding. Rats were maintained under controlled temperature ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) and lighting conditions
101 (12L, 12D photoperiod, lights switched off at 07:00 h) and had free access to food and water.
102 The experimental protocol followed the Ethical Principles in Animal Research adopted by the
103 Brazilian College of Animal Experimentation and approved by the Biosciences Institute/ UNESP
104 Ethics Committee for Animal Research (Protocol number: 381).

105

106 ***Experimental Design***

107 Two non-gravid female rats were mated with one male, during the dark portion of the
108 lighting cycle, and the day of sperm detection in the vaginal smear was considered day zero of
109 gestation (gestational day 0 - GD0). The pregnant females were randomly assigned to the
110 experimental groups and housed individually in cages.

111 Pregnant rats were allocated into four experimental groups (n= 7-10 rats/group): exposed
112 groups that received low doses of TCDD (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., code 48599),
113 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ or 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, orally (gavage), single dose on GD15, which coincides with the
114 end of most organogenesis in the fetus and because the hypothalamic-pituitary-testis axis is just
115 beginning to function (Mably *et al.* 1992a,b,c, Gray *et al.* 1995, Gray *et al.* 1997a). These doses
116 were chosen based on TCDD Lowest observed adverse effect level (LOAEL) - 0.01 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{day}$,
117 of reproductive function for rats, and Median lethal dose (LD50) - 20-100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, by oral for rats
118 (Murray *et al.* 1979, Mably *et al.* 1992a, Gray *et al.* 1997a, Gray *et al.* 1997b). Other studies
119 have also demonstrated that maternal treatment with larger doses than 1.0 μg TCDD caused
120 maternal toxicity and high degree of mortality among the offspring (Mably *et al.* 1992a). The
121 control group that received corn oil (vehicle), following the same experimental protocol.

122 At PND 1 (with PND 0 being defined as the day of birth), litters were weighed and
123 reduced to eight, maintaining preferentially the male offspring (Nassr *et al.* 2010). At adulthood
124 (90 days old), part of the male offspring (F0) were mated with unexposed females to obtain F1
125 generation whereas another part of the male offspring (F1) were mated to obtain F2 generation.
126 All the procedures were performed at 90 (adulthood) to assess possible transgenerational effects
127 of TCDD and quality sperm, as described below (Fig. 1).

128

129 ***Experiment 1***

130 ***Euthanasia, Body Weight and Organ Weights of Male Offspring***

131 Male rats (7-10, one per litter) were weighed, euthanized by CO₂ inhalation followed by
132 decapitation (between 9:00 and 11:30 AM). The right testis, epididymis and vas deferens, ventral
133 prostate, seminal vesicle (without the coagulating gland and full secretion) were removed and
134 their absolute weights were determined.

135

136 ***Serum Hormone Levels***

137 After decapitation, blood was collected and serum was obtained by centrifugation (2400
138 rpm, 20 minutes at 4°C) and stored at -20°C until analysis. The concentrations of testosterone,
139 luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) were determined by the
140 technique of double antibody radioimmunoassay (RIA) kit (National Institute of Arthritis,
141 Diabetes and Kidney Diseases–NIADDK, USA). All the samples were analyzed in the same
142 assay to avoid inter-assay variability.

143

144 ***Daily Sperm Production per Testis, Sperm Number and Transit Time in the Epididymis***

145 Homogenization-resistant testicular spermatids (stage 19 of spermiogenesis) in the right
146 testis were counted as described previously (Robb *et al.* 1978), with adaptations adopted by

147 Fernandes *et al.* (2007). Briefly, the right testis, decapsulated and weighed soon after collection,
148 was homogenized in 5 mL of NaCl 0.9% containing Triton X100 0.5%, followed by sonication
149 for 30 seconds. After a 10-fold dilution, one sample was transferred to Neubauer chambers (four
150 fields per animal), and mature spermatids were counted. To calculate the daily sperm production
151 (DSP), the number of spermatids at stage 19 was divided by 6.1, which is the number of days of
152 the seminiferous cycle during which these spermatids are present in the seminiferous epithelium.
153 In the same manner, caput/corpus and cauda epididymis portions were cut into small fragments
154 with scissors and homogenized, and sperm counted as described for the testis. The sperm transit
155 time through the epididymis was determined by dividing the number of sperm in each portion by
156 DSP.

157

158 ***Experiment 2:***

159 ***In Utero Artificial Insemination***

160 Because rats produce and ejaculate an excess of qualitatively normal sperm, artificial *in*
161 *utero* insemination of a fixed, a critical number of sperm has been suggested as a means of
162 augmenting the sensitivity of a toxicant-induced decrease in sperm quality in the rat (Amann *et*
163 *al.* 1986). According to this technique, a fixed number of sperm collected in the cauda
164 epididymis is inseminated directly into the uterus permitting evaluation of sperm quality, without
165 the interference of other factors such as alterations in the sexual behavior pattern and number of
166 sperm available for ejaculation (Klinefelter 2002).

167 Females (n=80; 60 days old, weighing 230g) in estrus induced by LHRH (Luteinizing
168 Releasing Hormone) agonist (Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri), were paired with
169 sexually experienced vasectomized males for 1 h. Receptive females (that exhibited lordosis)
170 were selected for insemination. The isolation and preparation of distal cauda sperm for
171 insemination was similar to that described previously (Kempinas *et al.* 1998, Klinefelter *et al.*

172 1994). When insemination was complete, the abdominal musculature was sutured. Females of
173 the F0 and F1 generations were killed 20 days later to evaluate fertility. Since there were no
174 changes in relation to resorptions per implantation sites in the F0 and F1 generations, the females
175 of the F2 generation were killed 9 days later to evaluate fertility.

176

177 ***Fertility Evaluation***

178 The females were killed by decapitation. After collection of the uterus and ovaries, the
179 numbers of corpora lutea, implants and reabsorptions were determined. From these results the
180 following parameters were calculated: proportions of implant per corpus luteum and proportions
181 of resorptions per implantation sites.

182

183 ***Sperm Motility and Morphology***

184 Sperm motility was evaluated from sperm used for artificial insemination. The sperm
185 sample was collected and immediately diluted in 2 mL of modified HTF medium (Human
186 Tubular Fluid, Irvine Scientific®), pre-warmed at 34°C. An aliquot of 10µL of the diluted sperm
187 was placed in a Makler chamber (Irvine, Israel) and analyzed under a phase-contrast microscope
188 (Leica DMLS) at 400x magnification. One hundred sperm were evaluated per animal and
189 classified for motility into: type A: motile, with progressive trajectory; type B: motile, with non-
190 progressive trajectory; and type C: immotile (Perobelli *et al.* 2010).

191 The cauda sperm suspensions used for the artificial insemination were diluted 1:10 with
192 10% saline formol. To analyze the sperm morphologically, smears were prepared on histological
193 slides that were left to dry for 90 min after which 200 spermatozoa per animal were evaluated for
194 head and/or flagellar defects by phase-contrast microscopy (x400, total magnification) (Seed *et*
195 *al.* 1996).

196

197 ***Statistical analysis***

198 For comparison of results among the experimental groups, statistical tests for analysis of
199 variance (ANOVA) were utilized with the ‘a posteriori’ Tukey-Kramer test or the nonparametric
200 Kruskal–Wallis test with the ‘a posteriori’ Dunn test or Qui-Square test, according to the
201 characteristics of each variable. Differences were considered significant when $p < 0.05$. The
202 statistical analyses were performed by the software GraphPad InStat (version 3.02).

203

204 **Results**

205 ***Experiment 1***

206 Neither of the experimental groups presented a significant alteration in body weights
207 between the control and treated groups with different doses of TCDD in adult male offspring in
208 both generations. The absolute weights of reproductive organs also did not differ, as shown in
209 Table 1.

210 Serum testosterone levels were significantly diminished in generation F0, but this
211 alteration was not maintained in generation F1. In relation to generation F2, there was a sharp
212 but non-significant diminution as shown in Fig. 2. The serum levels of FSH and LH did not
213 present significant alterations among the experimental groups in all the generations (Fig. 2).

214 The sperm transit time was also similar between the control and treated groups, but in
215 generation F0 there was a reduction (acceleration) of transit time in the cauda epididymis of
216 animals exposed *in utero* to 1.0 μ g of TCDD in comparison to the control group, but the
217 difference was not statistically significant ($p=0.07$) as shown in Fig. 3. This reduction in transit
218 time (acceleration) was not observed in the subsequent generations (Fig. 3).

219 In relation to the number of mature spermatids in the testicle and DSP, there was no
220 statistically significant difference between the four experimental groups, in all the generations, as
221 shown in Table 2. In the epididymis the number of spermatozooids in the head regions was also

222 similar between the control and treated groups, as were the sperm reserves in the cauda region in
223 both generations (Table 2).

224

225 *Experiment 2*

226 The number and proportion of reabsorptions by implantation sites (%), did not differ
227 between the experimental groups in generations F0 or F1. In generation F2 this analysis was not
228 performed, since the laparotomy was carried out on DG9 (Table 3).

229 In generation F0 the proportion of implants per corpus luteum (I/CL) was reduced
230 statistically at the doses of 0.5 (9.37%, I/CL=61.95%) and 1.0 μ g (21.95%, I/CL=58.70%) of
231 TCDD when compared to the control group (I/CL=75.21%), as shown in Table 3. In generation
232 F1, this reduction was statistically significant at the dose of 0.1 μ g/Kg of TCDD (33.59%,
233 I/CL=41.11%) in relation to the control group (I/CL=61.90%). At the dose of 0.5 μ g/Kg of
234 TCDD this reduction was approximately 18.48% (I/CL=50.46%), but not significant. Although
235 the group receiving the highest dose also did not present a statistically significant reduction,
236 there was a diminution of 29.65% (I/CL=43.55%) ($p=0.06$) when compared to the control group,
237 as shown in Table 3.

238 Nevertheless in generation F2 this reduction was statistically significant in all the
239 experimental groups in relation to control group (I/CL=82.35%) of approximately 30.47%
240 (I/CL=50.67%); 31.29% (I/CL=56.58%) and 61.36% (I/CL=31.82%) at the doses of 0.1; 0.5 and
241 1.0 μ g/Kg of TCDD, respectively (Table 3).

242 The evaluation sperm motility demonstrated that, among the experimental groups, in both
243 generations, there was no statistically significant difference as to the number of Type A
244 spermatozoids: mobile with progressive trajectory; Type B: mobile with non-progressive
245 trajectory, and Type C: immobile (Fig. 4).

246 In relation to sperm morphology, the percentage of morphologically normal
247 spermatozooids was significantly diminished in the treated groups with 0.5µg/kg and 1.0 µg/kg of
248 TCDD (97.09% and 96.89%, respectively) in relation to control group (98.36%) in generation
249 F0, as shown in Table 4. Yet generations F1 and F2 showed no significant statistical differences
250 between the control and treated groups at different TCDD doses (Table 4).

251

252 **Discussion**

253 Several chemical environmental contaminants have been identified as having anti-
254 androgenic and / or estrogenic activity, thus acting as endocrine disruptors (Gray *et al.* 1999,
255 Parks *et al.* 2001). Laboratory experiments have shown that exposure *in utero* to endocrine
256 disruptors can provoke the appearance of chronic diseases and compromise reproductive
257 function throughout the life of the individual (Gray *et al.* 2006, Foster *et al.* 2008, Christiansen *et*
258 *al.* 2009).

259 The TCDD, a congener of dioxin considered the most toxic environmental contaminant
260 (Gray *et al.* 1999) capable of inducing several adverse effects on human health (Birnbaum *et al.*
261 1994, Larsen 2006, Schechter *et al.* 2006) with estrogenic, anti-estrogenic and anti-androgenic
262 activities, depending on dose and time of exposure (Gray *et al.* 2001), able to perturb the normal
263 development of the hypothalamus, leading to alterations in sexual differentiation (Takeda *et al.*
264 2014). It is known that this compound can be transferred to developing organisms through the
265 placenta or by lactation (Faqi *et al.* 1998), although we have not measured TCDD in milk.

266 In the present study, we have investigated the effect of *in utero* exposure to TCDD in the
267 male genital system, from offspring during their adulthood, with an emphasis on epididymal
268 functions and sperm quality and whether these effects may be transmitted to the next
269 generations. In adult male offspring, TCDD promoted alterations in sperm transit time and sperm
270 morphology, as well as diminutions in serum testosterone levels and implantations per corpus

271 luteum after the procedure of *in utero* artificial insemination, showing that the fertility of these
272 animals was compromised, such that these alterations occurred under at least one of the doses
273 tested in the three generations. Although there has been changes under at least one of the doses
274 tested, most effects and persistence are related to higher doses of TCDD exposure (0.5 and
275 1.0 μ g), showing a possible dose-response relationship.

276 The body weights of male offspring in adulthood (DPN90) and the weights of the
277 reproductive organs remained similar, suggesting that TCDD did not compromise the general
278 health status of these animals, which corroborates the results of Ohsako *et al.* (2001) obtained
279 with pregnant Holtzman rats treated with 12.5, 50, 200 or 800 ng/Kg TCDD doses under an
280 experimental design similar to that employed in the present work.

281 In a study carried out by Faqi *et al.* (1998), a 50% reduction of testosterone was observed
282 in adult male offspring whose mothers had been exposed (s.c.) at 300ng/Kg prior to mating and
283 during the period of pregnancy and lactation, followed by a weekly maintenance dose of
284 60ng/Kg (300/60ng of TCDD), results similar to those found by Mably *et al.* (1992a,b)
285 corroborating the data from the present study that presented expressive effects on serum
286 testosterone levels in generations F0 and F2. The concentrations of FSH and LH in the present
287 study were similar between the control and TCDD-treated animals in the three generations,
288 corroborating data from the literature (Mably *et al.* 1992a, Bjerke *et al.* 1994b, Ohsako *et al.*
289 2001, Foster *et al.*, 2010).

290 There was a reduction in serum testosterone and no changes of levels LH and FSH. It is
291 known that the Leydig cells, *in vivo*, are programmed to release testosterone in function not only
292 of LH stimulation but also in response to various local paracrine factors most likely related to
293 Sertoli cell function (Klinefelter & Kelce 1996). This would imply that Leydig cells are not
294 exposed through the testicular interstitial fluid to LH pulses as occur in circulation, and

295 therefore, do not it would be possible 'read' these pulses, indicating no immediate relationship
296 between LH peaks and testosterone response (Pierroz *et al.* 1999).

297 During the transit of spermatozoids through the epididymis, their morphological,
298 physiological and biochemical characteristics are modified, as part of the maturation process
299 (Orgebin-Crist 1969); thus, some alteration during this process can provoke qualitative damage
300 in this gamete (Toshimori 2003).

301 Faqi *et al.* (1998) reported that *in utero* and lactational exposure to TCDD (an initial
302 dose of 25-300 ng/Kg followed by 5-60 ng/Kg of TCDD throughout mating, pregnancy and
303 lactation) diminished the transit time of sperm through the epididymis in Wistar rats,
304 corroborating the data of the present study, which presented a reduction (acceleration), although
305 non-significant, in the transit time in the cauda epididymis of the animals exposed to 1.0µg of
306 TCDD. This rapid passage of spermatozoids through the epididymis promotes minimal exposure
307 of the gametes to the epididymal microenvironment, which is normally associated with processes
308 of post-testicular maturation (Bedford 1967); however, this was observed only in generation F0.
309 The present study also reaffirms the important role of testosterone in epididymal function during
310 the maturation and fertile capacity acquisition of spermatozoids, since the serum testosterone
311 levels were also altered, confirming that the acceleration in sperm transit time is dependent on
312 androgen (Fernandez *et al.* 2007).

313 The number of spermatids present in the testicle and the DSP are important indicators of
314 male fertility potential. Faqi *et al.* (1998) observed a 50% reduction of DSP in adult male
315 offspring exposed *in utero* to the concentrations of 25, 60 or 300ng/Kg of TCDD. In relation to
316 the number of spermatozoids in the epididymis, Ohsako *et al.* (2002) verified a diminution in
317 adult male offspring exposed *in utero* to 1.0µg/Kg of TCDD, similar to results reported in other
318 studies (Mably *et al.* 1992c, Bjerke *et al.* 1994b, Foster *et al.* 2010). In contrast to the previously

319 cited studies, none of the three TCDD doses tested in the present work (0.1; 0.5 and 1.0 µg/kg)
320 presented effects on sperm parameters such as the production and storage of spermatozoids.

321 Artificial insemination *in utero* was employed to evaluate sperm quality, given that this
322 technique excludes the influence of sexual behavior and the number of gametes available for
323 ejaculation in a fertility test (Klinefelter 2002). In the present work, after this procedure, the
324 number of reabsorptions and the proportion of reabsorptions per implantation site (directly
325 related to post-implantation losses) were similar between the experimental groups in both
326 generations. Corroborating our result, Bell *et al.* (2007) observed an absence of toxic effects in
327 relation to the number of reabsorptions in female rats treated with TCDD on DG15, at the doses
328 of 50, 200 and 1000ng/Kg, indicating that TCDD does not induce an increase in fetal mortality
329 and consequently in post-implantation losses.

330 After *in utero* artificial insemination was performed, the animals treated with 0.5µg/Kg
331 and 1.0µg/Kg of TCDD showed a diminution of implants per corpus luteum in relation to
332 controls in generation F0. In generation F1 this alteration was observed only at the dose of
333 0.1µg/Kg, although at the highest dose there was also a non-significant reduction. However, in
334 generation F2 this reduction occurred in all the TCDD-treated groups when compared with the
335 controls, similar to results reported by Gray *et al.* (1995) in male Long Evans Hooded rats
336 exposed to 1.0µg/Kg of TCDD *in utero*, in which they observed a fertility reduction of
337 approximately 50%, measured by the number of implantations per female mated, suggesting that
338 TCDD diminished the fertility capacity of spermatozoids and/or caused death in the first stages
339 of development. Nevertheless, this result was not observed in other studies (Mably *et al.* 1992a,
340 Faqi *et al.* 1998, Ikeda *et al.* 2005).

341 Murray *et al.* (1979) reported diminished fertility only in generations F1 and F2 of
342 Sprague-Dawley rats exposed to low doses of TCDD and did not observe any fertility effect in
343 male offspring in generation F0, contrary to the observations in the present study, given that this

344 reduction occurred in all generations, at least in one dose of TCDD tested. Widely reported in the
345 literature is a dose-response relationship on the reproductive function of rats exposed to low
346 TCDD doses during the intrauterine period (Gray *et al.* 1997, Ohsako *et al.* 2001, Ikeda *et al.*
347 2005, Rowlands *et al.* 2006, Bell *et al.* 2007), which may be related to the effects found on the
348 I/CL and consequently in the fertility of the animals from the present study.

349 Sperm motility is one of the most important parameters utilized in the qualitative
350 evaluation of sperm from semen samples obtained *in vitro* (Mahadevan & Trounson 1984) and *in*
351 *vivo* (Bostofte *et al.* 1990, Barratt *et al.* 1993). Bell *et al.* (2007) verified that after exposure of
352 pregnant Wistar rats at DG15 to 1.0µg/Kg of TCDD did not provoke alterations in sperm
353 motility in their adult male offspring, corroborating the data of the present work.

354 Another important parameter in the evaluation of male fertility is the analysis of sperm
355 morphology (Plassmann & Urwyler 2001). An increase in the percentage of spermatozooids
356 presenting morphological abnormalities can be considered evidence that the toxicant in the study
357 had access to germ cells. By being one of the less variable sperm parameters among normal
358 individuals, morphology has been utilized as indicative of a spermatotoxic event (Clegg *et al.*
359 2001). The results from the literature show that *in utero* exposure to TCDD did not provoke
360 alterations in this parameter (Mably *et al.* 1992c); in contrast, Faqi *et al.* (1998) observed
361 significant effects in the percentage of morphologically abnormal sperm, confirming the results
362 of our present study.

363 As previously reported, the F1 and F2 generations had no direct exposure to TCDD. Any
364 mechanism describing F2 toxicity, must therefore account for the heritability of the effects
365 (Baker *et al.* 2014). One mechanism possible would be chromatin modifications that are
366 replicated with the DNA, e.g. changes in DNA methylation, histone modification, non-coding
367 DNA, or some other covalent or non-covalent effect that ultimately causing change in the
368 expression of genes that are critical for reproduction. Epigenetic changes are thought to play an

369 important role in cell differentiation: all cell types carry the same genomic sequence; yet vary in
370 gene expression. Therefore TCDD exposure can alter cell differentiation and promote
371 transgenerational effects (Nilsson *et al.* 2012).

372 In summary, in the present study, intrauterine exposure to TCDD provoked alterations in
373 serum testosterone levels and sperm morphology, and diminution in sperm transit time through
374 the cauda epididymis. Furthermore, there was a reduction in the proportion of implantations per
375 corpus luteum after performing artificial insemination *in utero*, such that these alterations
376 occurred in at least one of the doses tested in the three generations.

377 It may be concluded that exposure to TCDD, under these experimental conditions,
378 negatively interferes in the rat epididymal processes, harming sperm quality; some of these
379 effects persist for at least three generations, probably due to the interference of epigenetic
380 factors. Given the knowledge that reproductive efficiency is greater in rats than in men, these
381 results may indicate reproductive risks associated with prenatal and/or lactational exposure to
382 TCDD in humans.

383

384 **Declaration of interest**

385 The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as
386 prejudicing the impartiality of the research reported.

387

388 **Funding**

389 This work was supported by CNPq and the State of São Paulo Research Foundation
390 (FAPESP) as part of the PhD Scholarship of Sanabria M (grant 2012/00365-6) and the
391 Scholarship of Cuciello MS (grant 2012/13312-8).

392

393

394 **References**

- 395 **Amann RP** 1986 Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory
396 animals. *Environmental Health Perspectives* **70** 149-58.
- 397 **Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F & Jouannet P** 1995 Decline in semen quality among
398 fertile men in Paris during the past 20 years. *New England Journal of Medicine* **332** 281-285.
- 399 **Baker TR, Peterson RE & Heideman W** 2014 Using Zebrafish as a Model System for
400 Studying the Transgenerational Effects of Dioxin. *Toxicological Sciences* **138(2)** 403–411.
- 401 **Barratt CLR, Tomlinson MJ & Cooke ID** 1993 Prognostic significance of computerized
402 motility analysis for *in vivo* fertility. *Fertility and Sterility* **60** 520-525.
- 403 **Bedford JM** 1967 Effect duct ligation on the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis
404 of rabbit. *Journal Experimental Zoology* **166** 271–282.
- 405 **Bell DR, Clode S, Fan MQ, Fernandes A, Foster PM, Jiang T, Loizou G, MacNicoll A,**
406 **Miller BG, Rose M et al.** 2007 Toxicity of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the
407 Developing Male Wistar(Han) Rat. I: No Decrease in Epididymal Sperm Count after a Single
408 Acute Dose. *Toxicological Sciences* **99(1)** 214–223.
- 409 **Birnbaum LS** 1994 Endocrine effects of prenatal exposure to PCBs, dioxins, and other
410 xenobiotics: implications for policy and future research. *Environmental Health Perspectives*
411 **102** 676–679.
- 412 **Bjerke DL, Brown TJ, MacLusky NJ, Hochberg RB & Peterson RE** 1994a Partial
413 demasculinization and feminization of sex behavior in male rats by *in utero* and lactational
414 exposure to of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin is not associated with alterations in
415 estrogen receptor binding or volumes of sexually differentiated brain nuclei. *Toxicology*
416 *Applied Pharmacology* **127** 258-267.
- 417 **Bjerke DL, Sommer RJ, Moore RW & Peterson RE** 1994b Effects of *in utero* and lactational
418 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure on responsiveness of the male rat reproductive

- 419 system to testosterone stimulation in adulthood. *Toxicology Applied Pharmacology* **127** 250-
420 257.
- 421 **Bostofte E, Bagger P, Michael A & Stakemann G** 1990 Fertility prognosis for infertile men
422 from two different population evaluated by the Cox regression model. *Fertility and Sterility*
423 **54** 1100-1106.
- 424 **Christiansen S, Scholze M, Dalgaard M, Vinggaard AM, Axelstad M, Kortenkamp A &**
425 **Hass U** 2009 Synergistic disruption of external male sex organ development by a mixture of
426 four antiandrogens. *Environmental Health Perspectives* **117** 1839–1846.
- 427 **Clegg ED, Perreault SD & Klinefelter GR** 2001 Assessment of male reproductive toxicology.
428 In *Principles and Methods of Toxicology*, pp 1263-1299. Ed AW Hayes. Philadelphia: Taylor
429 & Francis.
- 430 **Denison MS & Nagy SR** 2003 Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally
431 diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual Review of Pharmacology*
432 *and Toxicology* **43** 309–334.
- 433 **Enan E, El-Sabeawy F, Overstreet J, Matsumura F & Lasley B** 1998 Mechanisms of gender-
434 specific TCDD-induced toxicity in guinea pig adipose tissue. *Reproductive Toxicology* **12**
435 357–369.
- 436 **Environmental Protection Agency** 2004. Recommended guidelines for Human Exposure to
437 CDD, CDF, and PCB Congeners. Properties, Environmental Levels, and Background
438 Exposures. In *Exposure and human health reassessment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-*
439 *dioxin (TCDD) and related compounds: National Academy of Sciences (NAS) review draft*, pp
440 4 – 146. National Center for Environmental Assessment. United States.
- 441 **Faqi AS, Dalsenter PR, Merker HJ & Chahoud I** 1998 Reproductive toxicity and tissue
442 concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male offspring rats

- 443 exposed throughout pregnancy and lactation. *Toxicology and Applied Pharmacology* **150**
444 383–392.
- 445 **Fernandes GS, Arena AC, Fernandez CDB, Mercadante A, Barbisan LF & Kempinas WG**
446 2007 Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reproductive Toxicology* **23(1)**
447 106-112.
- 448 **Fernandez CDB, Porto EM, Arena AC & Kempinas WG** 2007 Effects of altered epididymal
449 sperm transit time on sperm quality. *International Journal Andrology* **31** 427-437.
- 450 **Foster GW** 2008 Fetal and early postnatal environmental contaminant exposures and
451 reproductive health effects in the female. *Fertility and Sterility* **89(1)** 53-54.
- 452 **Foster WG, Maharaj-Briceño S & Cyr DG** 2010 Dioxin-Induced Changes in Epididymal
453 Sperm Count and Spermatogenesis (Review). *Environmental Health Perspectives* **118** 458-
454 464.
- 455 **Gray Jr LE, Kelce WR, Monosson E, Ostby JS & Birnbaum LS** 1995 Exposure to TCDD
456 during development permanently alters reproductive function in male Long–Evans rats and
457 hamster: Reduced ejaculated sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring
458 with normal androgenic status. *Toxicology and Applied Pharmacology* **131** 108–118.
- 459 **Gray Jr LE, Ostby J, Monosson E & Kelce WR** 1999 Environmental antiandrogens: low
460 doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat. *Toxicology*
461 *and Industrial Health* **15** 48-64.
- 462 **Gray LE Jr, Ostby JS & Kelce WR** 1997a A dose-response analysis of the reproductive effects
463 of a single gestational dose of 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male Long Evans
464 hooded rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology* **146** 11–20.
- 465 **Gray LE Jr, Wolf C, Mann P & Ostby JS** 1997b *In utero* exposure to low doses of 2,3,7,8-
466 tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters reproductive development of female Long Evans hooded
467 rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology* **146** 237–244.

- 468 **Gray LE Jr, Ostby J, Furr J, Wolf CJ, Lambright C & Parks L** 2001 Effects of
469 environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Human*
470 *Reproduction Update* **7** 248-264.
- 471 **Gray LE Jr, Wilson VS, Stoker T, Lambright C, Furr J, Noriega N, Howdeshell K, Ankley**
472 **GT & Guillette L** 2006 Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on
473 reproductive development in mammals. *International Journal of Andrology* **29** 96-104.
- 474 **Hermo L & Robaire B** 2002 Epididymal cell types and their functions. In: *The Epididymis -*
475 *From Molecules to Clinical Practice*, pp 81–102. Eds. B Robaire and BT Hinton. New York:
476 Kluwer Academic/Plenum Publisher.
- 477 **Ikeda M, Tamura M, Yamashita J, Suzuki C & Tomita T** 2005. Repeated *in utero* and
478 lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure affects male gonads in offspring,
479 leading to sex ratio changes in F-2 progeny. *Toxicology and Applied Pharmacology* **206** 351–
480 355.
- 481 **Kempinas WG, Suarez JD, Roberts NL, Strader L, Ferrell J, Goldman JM, Narotsky MG,**
482 **Perreault SD, Evenson DP, Ricker DD et al.** 1998 Fertility of rat epididymal sperm after
483 chemically and surgically induced sympathectomy. *Biology of Reproduction* **59(4)** 897-904.
- 484 **Klinefelter GR, Laskey JW, Kelce WR, Ferrell J, Roberts NL, Suarez JD & Slott V** 1994
485 Chloroethylmethanesulfonate- induced effects on the epididymis seem unrelated to altered
486 leydig cell function. *Biology of Reproduction* **51** 82-91.
- 487 **Klinefelter G & Kelce WR** 1996 Leydig cell responsiveness to hormonal and nonhormonal
488 factors in vivo and in vitro. In *The Leydig Cell*, edn 1, pp 535–553. Eds AH Payne, MP Hardy
489 and LD Russell. Cache River Press.
- 490 **Klinefelter GR & Suarez JD** 1997 Toxicant-induced acceleration of epididymal sperm transit:
491 androgen-dependent proteins may be involved. *Reproductive Toxicology* **11** 511–519.

- 492 **Klinefelter GR** 2002. The Epididymis. In *The Epididymis - From Molecules to Clinical*
493 *Practice*, pp 359-369. Eds B Robaire and BT Hinton. New York: Kluwer Academic/Plenum
494 Publisher.
- 495 **Larsen JC** 2006 Risk assessments of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated
496 dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in food. *Molecular Nutrition &*
497 *Food Research* **50** 885–896.
- 498 **Lucas A** 1991 Programming by early nutrition in man. In *The childhood environment and adult*
499 *disease*, pp 38–55. Eds Gr Bock and J Whelan. Chichester (UK): Wiley.
- 500 **Mably TA, Moore RW & Peterson RE** 1992a *In utero* and lactational exposure of male rats to
501 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 1. Effects on androgenic status. *Toxicology and Applied*
502 *Pharmacology* **114** 97–107.
- 503 **Mably TA, Moore RW, Goy RW & Peterson RE** 1992b *In utero* and lactational exposure of
504 male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 2. Effects on sexual behavior and the
505 regulation of luteinizing hormone secretion in adulthood. *Toxicology and Applied*
506 *Pharmacology* **114** 108–117.
- 507 **Mably TA, Bjerke DL, Moore RW, Gendron-Fitzpatrick A & Peterson RE** 1992c *In utero*
508 and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 3. Effects on
509 spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicology and Applied Pharmacology* **114**
510 118–126.
- 511 **Magre S, Rebourcet D, Ishaq M, Wargnier R, Debard C, Meugnier E, Vidal H, Cohen-**
512 **Tannoudji J & Magueresse-Battistoni BL** 2012 Gender Differences in Transcriptional
513 Signature of Developing Rat Testes and Ovaries following Embryonic Exposure to 2,3,7,8-
514 TCDD. *PLoS ONE* **7** e40306.
- 515 **Mahadevan MM & Trounson AO** 1984 The influence of seminal characteristics on the success
516 rate of human in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* **42** 400-405.

- 517 **Murray FJ, Smith FA, Nitschke KD, Humiston CG, Kociba RJ & Schwetz BA** 1979 Three-
518 generation reproduction study of rats given 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in
519 the diet. *Toxicology and Applied Pharmacology* **50** 241–252.
- 520 **Nassr AC, Arena AC, Toledo FC, Bissacot DZ, Fernandez CD, Spinardi-Barbisan AL,**
521 **Pires PW & Kempinas WG** 2010 Effects of gestational and lactational fenvalerate exposure
522 on immune and reproductive systems of male rats. *Journal of Toxicology Environmental Health*
523 *Part A* **73(13-14)** 952-64.
- 524 **Nilsson E, Larsen G, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C, Savenkova MI & Skinner MK**
525 2012 Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of ovarian disease.
526 *PLoS One* **7** e36129.
- 527 **Ohsako S, Miyabara Y, Nishimura N, Kurosawa S, Sakaue M, Ishimura R, Sato M,**
528 **Takeda K, Aoki Y & Sone H et al.** 2001 Maternal exposure to a low dose of 2,3,7,8-
529 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) suppressed the development of reproductive organs of
530 male rats: dose-dependent increase of mRNA levels of 5 alpha-reductase type 2 in contrast to
531 decrease of androgen receptor in the pubertal ventral prostate. *Toxicological Sciences* **60** 132–
532 143.
- 533 **Ohsako S, Miyabara Y, Sakaue M, Ishimura R, Kakeyama M, Izumi H, Yonemoto J &**
534 **Tohyama C** 2002 Developmental Stage-Specific Effects of Perinatal 2,3,7,8-
535 Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Exposure on Reproductive Organs of Male Rat Offspring.
536 *Toxicological Sciences* **66** 283–292.
- 537 **Orgebin-Crist MC** 1969 Studies on the function of the epididymis. *Biology of Reproduction* **1**
538 155–175.
- 539 **Parks LG, Lambrigh CS, Orlando EF, Guillette LJ Jr, Ankley GT & Gray LE Jr** 2001
540 Masculinization of female mosquitofish in Kraft mill effluent-contaminated Fenholloway River

- 541 water is associated with androgen receptor agonist activity. *Toxicological Sciences* **62** 257-
542 267.
- 543 **Perobelli JE, Martinez MF, Franchi CAS, Fernandez CDB, Camargo JL & Kempinas**
544 **WG** 2010 Decreased sperm motility in rats orally exposed to single or mixed pesticides.
545 *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* **73(13)** 991-1002.
- 546 **Pierroz DD, Aebi AC, Huhtaniemi IT & Aubert ML** 1999 Many LH peaks are needed to
547 physiologically stimulate testosterone secretion: modulation by fasting and NPY. *American*
548 *Journal of Physiology* **276 (Pt1)** E603-10.
- 549 **Plassmann S & Urwyler H** 2001 Improved risk assessment by screening sperm parameters.
550 *Toxicology Letters* **119** 157–171.
- 551 **Porterfield SP** 1994 Vulnerability of the developing brain to thyroid abnormalities:
552 Environmental insults to the thyroid system. *Environmental Health Perspectives* **102 Suppl 2**
553 125–130.
- 554 **Robb GW, Amman RP & Killian GJ** 1978 Daily sperm production and epididymal sperm
555 reserves of puberal and adult rats. *Journal of Reproduction and Fertility* **54**103-107.
- 556 **Rowlands JC, Budinsky AR, Aylward LL, Faqi AS & Carney EW** 2006 Sex ratio of the
557 offspring of Sprague–Dawley rats exposed to 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in
558 utero and lactationally in a three-generation study. *Toxicology and Applied Pharmacology*
559 **216** 29–33.
- 560 **Schechter A, Birnbaum L, Ryan JJ & Constable JD** 2006 Dioxins: an overview.
561 *Environmental Research* **101** 419–428.
- 562 **Seed J, Chapi RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RE, Hurtt ME, Klinefelter GR, Makris SL,**
563 **Perreault SD, Schrader S et al.** 1996 Methods for assessing sperm motility, morphology,
564 and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reproductive Toxicology* **10(3)** 237–
565 44.

- 566 **Silveira PP, Portella AK, Goldani MZ & Barbieri MA** 2007 Developmental origins of health
567 and disease (DOHaD). *Journal of Pediatrics* **83(6)** 494-504.
- 568 **Skene SA, Dewhurst IC & Greenberg M** 1989 Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and
569 polychlorinated dibenzofurans: the risk to human health. A review. *Human & Experimental*
570 *Toxicology* **8** 177–203.
- 571 **Takeda T, Fujii M, Hattori Y, Yamamoto M, Shimazoe T, Ishii Y, Himeno M & Yamada H**
572 2014 Maternal Exposure to Dioxin Imprints Sexual Immaturity of the Pups Through Fixing
573 the Status of the Reduced Expression of Hypothalamic Gonadotropin-Releasing Hormone.
574 *Molecular Pharmacology* **85** 74-82.
- 575 **Toshimori K** 2003 Biology of spermatozoa maturation: an overview with introduction to this
576 issue. *Microscopy Research and Technique* **61**1–6.
- 577 **Williams GM & Iatropoulos MJ** 2001 Principles of testing for carcinogenic activity. In:
578 *Principles & methods of toxicology*, pp 959-1000. Ed W Hayes. Philadelphia: Taylor &
579 Francis.
- 580
- 581
- 582
- 583
- 584
- 585
- 586
- 587
- 588
- 589
- 590
- 591
- 592
- 593

Table 1 Final body weight and absolute reproductive organ weights of adult male offspring control and TCDD-exposed groups in the three generations.

Parameters	Experimental Groups			
	Control	0.1µg/Kg	0.5µg/Kg	1.0µg/Kg
<i>F0 generation</i>				
Final Body weight (g)	404.28±17.22	409.86±14.92	422.16±11.96	398.84±23.19
<i>Absolute organ weights</i>				
Testis (g)	1.60±0.02	1.61±0.04	1.62±0.03	1.61±0.03
Epididymis (mg)	591.54±18.65	589.67±15.13	576.74±14.53	564.14±16.91
Ventral prostate (mg)	372.11±42.46	421.31±17.43	430.56±29.64	387.36±29.97
Vas deferens (mg)	82.16±3.71	79.77±3.91	83.12±4.24	85.66±5.27
Seminal vesicle, with secretion (g)	1.04±0.11	1.08±0.10	1.18±0.11	1.03±0.11
Seminal vesicle (mg)	496.12±62.83	453.56±35.65	519.44±40.18	481.54±44.82
<i>N</i>	9	9	10	10
<i>F1 generation</i>				
Final Body weight (g)	451.93±23.23	454.32±20.75	458.18±10.42	459.96±22.45
<i>Absolute organ weights</i>				
Testis (g)	1.77±0.05	1.63±0.09	1.67±0.02	1.78±0.05
Epididymis (mg)	606.28±21.54	609.85±22.90	598.85±15.88	635.07±27.36
Ventral prostate (mg)	439.70±37.97	540.23±35.17	488.70±48.63	575.83±24.17
Vas deferens (mg)	90.61±4.40	89.58±5.97	86.49±2.48	97.23±2.42
Seminal vesicle, with secretion (g)	1.22±0.12	1.21±0.12	1.12±0.10	1.32±0.06
Seminal vesicle (mg)	543.37±32.63	573.86±40.83	601.47±31.29	691.49±56.72
<i>N</i>	9	8	10	7
<i>F2 generation</i>				
Final Body weight (g)	373.93±10.93	398.86±20.52	396.80±13.52	390.90±11.50
<i>Absolute organ weights</i>				
Testis (g)	1.57±0.03	1.69±0.04	1.55±0.06	1.64±0.04
Epididymis (mg)	557.75±17.92	577.12±9.99	526.99±14.71	519.86±19.66
Ventral prostate (mg)	402.08±26.53	374.29±46.30	377.99±27.11	348.12±19.63
Vas deferens (mg)	82.71±4.14	84.02±3.25	87.68±6.47	76.98±4.57
Seminal vesicle, with secretion (g)	1.16±0.05	1.82±0.09	1.20±0.05	1.61±0.06
Seminal vesicle (mg)	480.53±31.49	521.53±50.14	490.31±20.49	430.26±43.05
<i>N</i>	9	7	8	6

Values expressed as mean ± SEM. ANOVA test with an a posteriori Tukey test.

Table 2 Sperm counts in the adult male offspring of control and TCDD-exposed groups in the F0, F1 and F2 generations.

Parameters	Experimental groups			
	Control	0.1µg/Kg	0.5µg/kg	1.0µg/Kg
<i>F0 generation</i>				
Sperm number in the testis (x10 ⁶)	190.10±12.61	198.75±10.88	200.05±13.69	201.81±18.21
Daily sperm production (x10 ⁶ /testis/day)	31.16±2.07	32.58±1.78	32.79±2.44	33.08±2.99
Sperm number in the caput/corpus epididymis (x10 ⁶)	115.36±6.01	108.98±6.53	112.89±5.40	121.31±7.69
Sperm number in the cauda epididymis (x10 ⁶)	245.18±13.32	237.34±14.10	239.66±10.02	207.67±11.65
<i>N</i>	7	8	8	7
<i>F1 generation</i>				
Sperm number in the testis (x10 ⁶)	223.63±8.46	219.26±10.94	203.47±10.30	225.63±18.34
Daily sperm production (x10 ⁶ /testis/day)	33.66±1.39	35.94±1.79	33.36±1.69	36.99±3.01
Sperm number in the caput/corpus epididymis (x10 ⁶)	118.66±7.02	128.60±7.561	134.66±6.50	138.41±11.93
Sperm number in the cauda epididymis (x10 ⁶)	251.55±35.86	284.52±16.27	236.30±23.05	275.71±28.85
<i>N</i>	9	7	10	7
<i>F2 generation</i>				
Sperm number in the testis (x10 ⁶)	198.93±9.61	208.72±5.46	197.85±8.34	216.50±10.11
Daily sperm production (x10 ⁶ /testis/day)	32.61±1.58	34.22±0.90	32.44±1.37	35.49±1.66
Sperm number in the caput/corpus epididymis (x10 ⁶)	108.58±7.15	110.10±9.38	114.83±10.65	116.29±9.50
Sperm number in the cauda epididymis (x10 ⁶)	220.44±10.33	279.87±12.63	212.52±13.74	227.79±16.97
<i>N</i>	9	7	8	7

Values expressed as mean ± SEM. ANOVA test with an a posteriori Tukey test.

Table 3 Fertility parameters after *in utero* artificial insemination of adult male offspring control and TCDD-exposed groups in the three generations.

<i>Parameters</i>	<i>Experimental groups</i>			
	Control	0.1µg/Kg	0.5µg/Kg	1.0µg/Kg
<i>F0 generation</i>				
<i>Body weight of dams (g) (mean ± SEM)</i>	342.17 ± 10.48	320.11 ± 17.20	333.39 ± 17.07	321.91 ± 12.68
N	9	7	9	7
<i>Implantation sites</i>				
Total (N)	91	58	70	54
Implants per corpora lutea (%)	75.21	68.24	*61.95	*58.70
Number of implants (mean ± SEM)	10.22 ± 1.02	8.29 ± 1.76	7.67 ± 1.09	7.71 ± 1.27
Number of corpora lutea (mean ± SEM)	13.44 ± 0.80	12.14 ± 0.74	12.56 ± 0.44	12.43 ± 0.37
<i>Resorptions</i>				
Total (N)	29	19	24	17
Per implantation sites (%)	68.13	67.24	65.71	68.52
Number of resorption (mean ± SEM)	3.22 ± 0.60	2.71 ± 0.97	2.67 ± 0.88	2.43 ± 0.81
<i>Fetal body weight (mean ± SEM)</i>	2.86 ± 0.08	3.00 ± 0.06	2.99 ± 0.14	3.22 ± 0.32
<i>F1 generation</i>				
<i>Body weight of dams (g) (mean ± SEM)</i>	313.18 ± 11.77	317.98 ± 15.71	314.66 ± 12.18	333.08 ± 6.30
N	6	7	8	5
<i>Implantation sites</i>				
Total (N)	39	37	55	27
Implants per corpora lutea (%)	61.90	*41.11	50.46	§43.55
Number of implants (mean ± SEM)	6.50 ± 1.54	5.14 ± 0.80	6.11 ± 1.11	5.40 ± 1.15
Number of corpora lutea (mean ± SEM)	10.50 ± 0.89	12.86 ± 0.40	12.11 ± 0.92	12.40 ± 0.51
<i>Resorptions</i>				
Total (N)	6	10	13	10
Per implantation sites (%)	84.62	72.97	76.36	62.96
Number of resorption (mean ± SEM)	1.00 ± 0.36	1.42 ± 0.30	1.44 ± 0.67	2.00 ± 0.55
<i>Fetal body weight (mean ± SEM)</i>	3.51 ± 0.28	3.62 ± 0.34	3.76 ± 0.28	3.44 ± 0.43
<i>F2 generation</i>				
<i>Body weight of dams (g) (mean ± SEM)</i>	243.70 ± 8.80	242.24 ± 7.29	229.83 ± 9.16	230.82 ± 14.09
N	6	7	8	6
<i>Implantation sites</i>				
Total (N)	56	38	43	21
Implants per corpora lutea (%)	82.35	*50.67	*56.58	*31.82
Number of implants (mean ± SEM)	9.33 ± 1.36	5.43 ± 0.92	5.63 ± 1.24	*3.50 ± 0.92
Number of corpora lutea (mean ± SEM)	11.33 ± 0.80	10.71 ± 0.36	10.63 ± 0.38	11.00 ± 0.58

N, number. Proportions (%) were compared by the Chi-square. Values expressed as mean ± SEM were compared by ANOVA test with an a posteriori Tukey test. *p<0.05; §p=0.06.

Table 4 Sperm morphology in the adult male offspring of the control and TCDD-exposed groups.

Parameters	Experimental groups			
	Control	0.1µg/Kg	0.5µg/Kg	1.0µg/Kg
<i>F0 generation</i>				
Normal sperm (%)	98.36	97.60	97.09*	96.89* ⁵⁹⁴
N	7	10	11	9 ⁵⁹⁵
<i>F1 generation</i>				
Normal sperm (%)	98.22	98.28	97.90	97.31 ⁵⁹⁶
N	9	9	10	8 ⁵⁹⁷
<i>F2 generation</i>				
Normal sperm (%)	98.77	98.54	98.90	97.94 ⁵⁹⁸
N	9	7	10	8 ⁵⁹⁹

Data expressed as Qui-square test. *p<0.05.

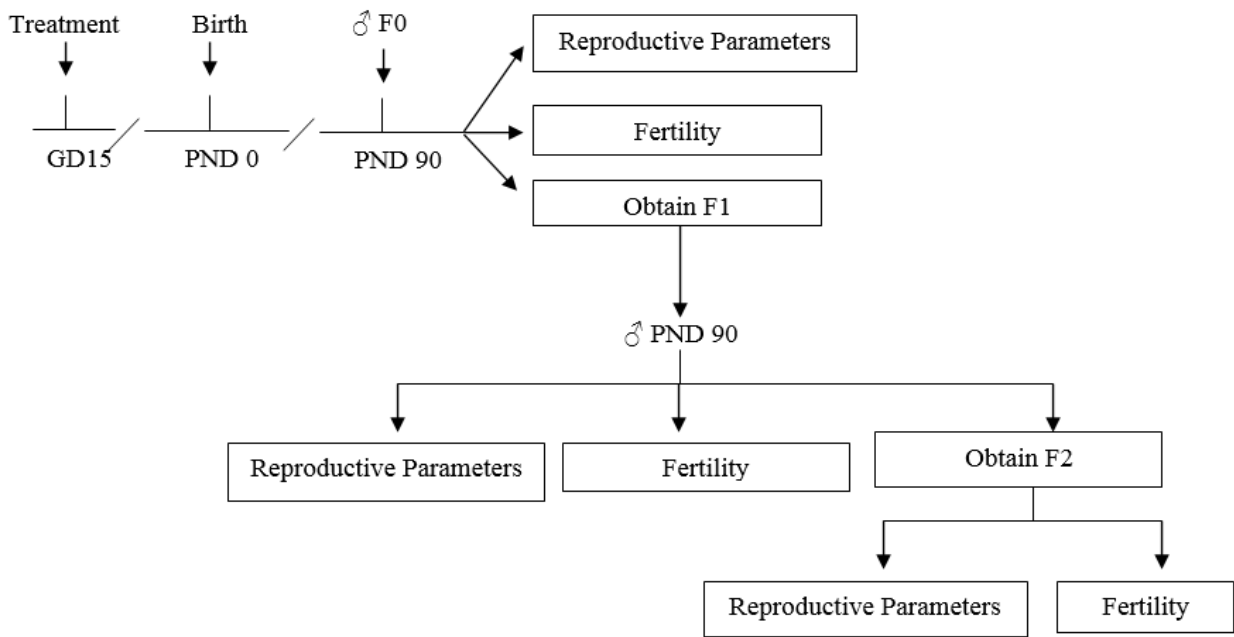


Figure 1. Experimental design. GD – gestational day, PND – post-natal day.

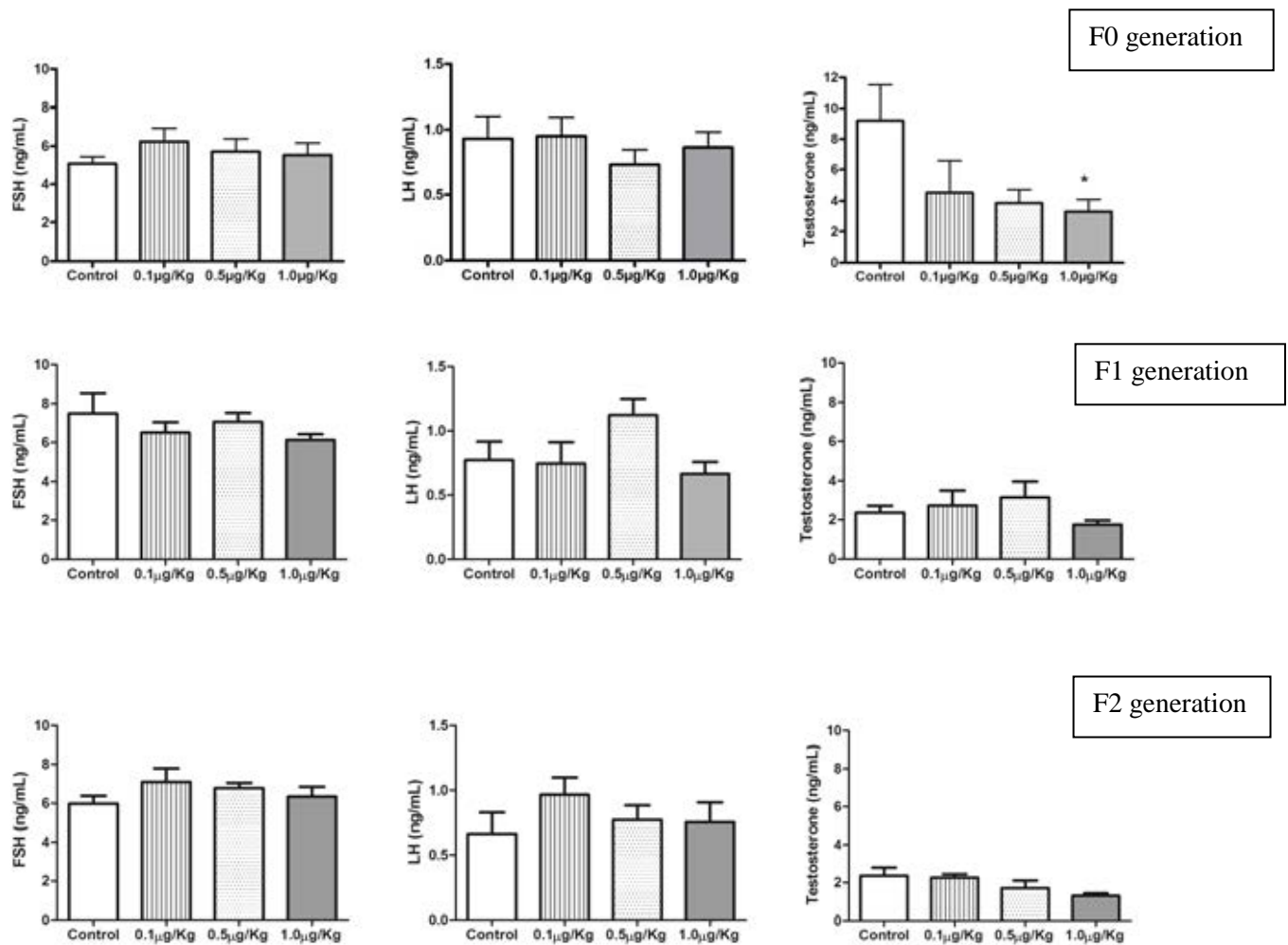


Figure 2. Serum sexual hormone concentrations (ng/mL) in the adult male offspring of the control and TCDD-exposed groups in the F0, F1 and F2 generations. Data expressed as mean \pm SEM. ANOVA test with an a posteriori Tukey test. * $p < 0.05$.

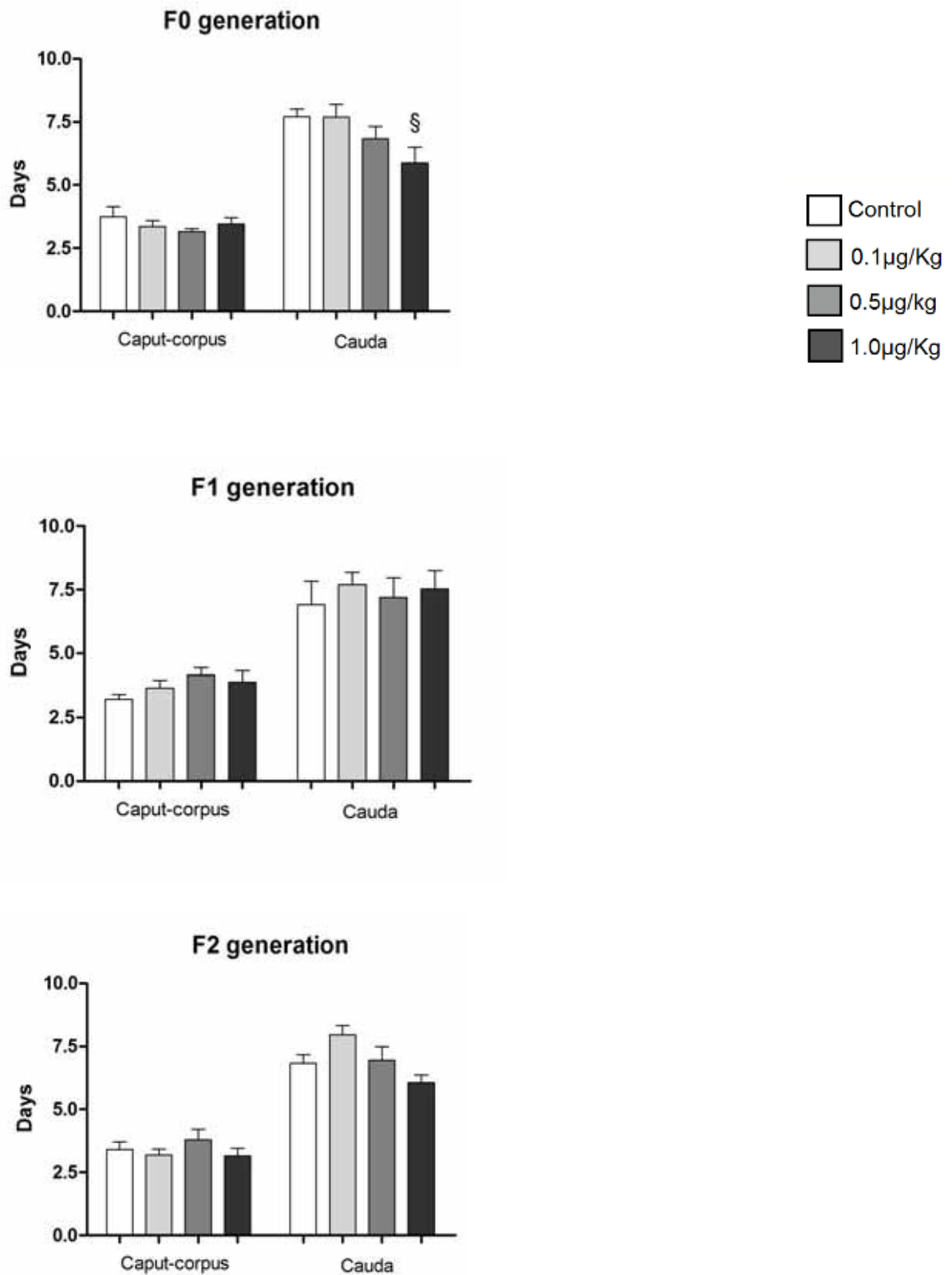


Figure 3. Sperm transit time in caput-corporis and cauda epididymis in the adult male offspring of the control and TCDD-exposed groups in the three generations. Values are expressed as mean \pm SEM. ANOVA test with an a posteriori Tukey test. §p= 0.07.

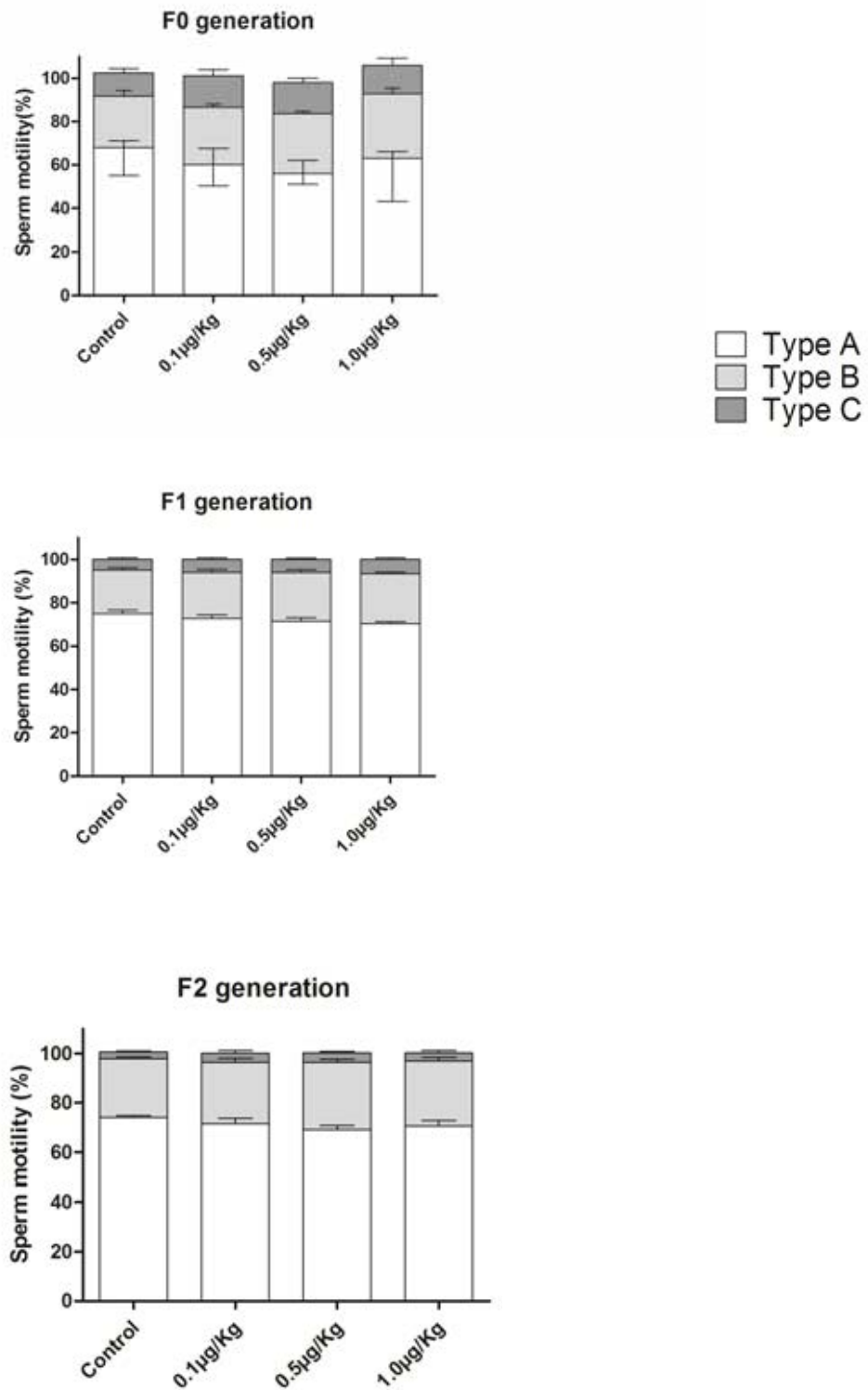


Figure 4. Sperm motility in the adult male offspring of the control and TCDD-exposed groups in the three generations. Values expressed as median. Kruskal-Wallis test with an a posteriori Dunn test.

6. Conclusões finais

Os resultados indicam que a exposição ao TCDD, nessas condições experimentais, interferiu, negativamente, sobre processos que ocorrem no epidídimo do rato, prejudicando a qualidade espermática, e alguns desses efeitos persistiram por várias gerações, pela interferência provavelmente, de fatores epigenéticos. Sabendo-se que a eficiência reprodutiva nos ratos é maior do que a de homens, esses resultados podem indicar riscos reprodutivos associados à exposição pré-natal e lactacional ao TCDD na espécie humana.

7. Apêndices

Figuras não apresentada no artigo

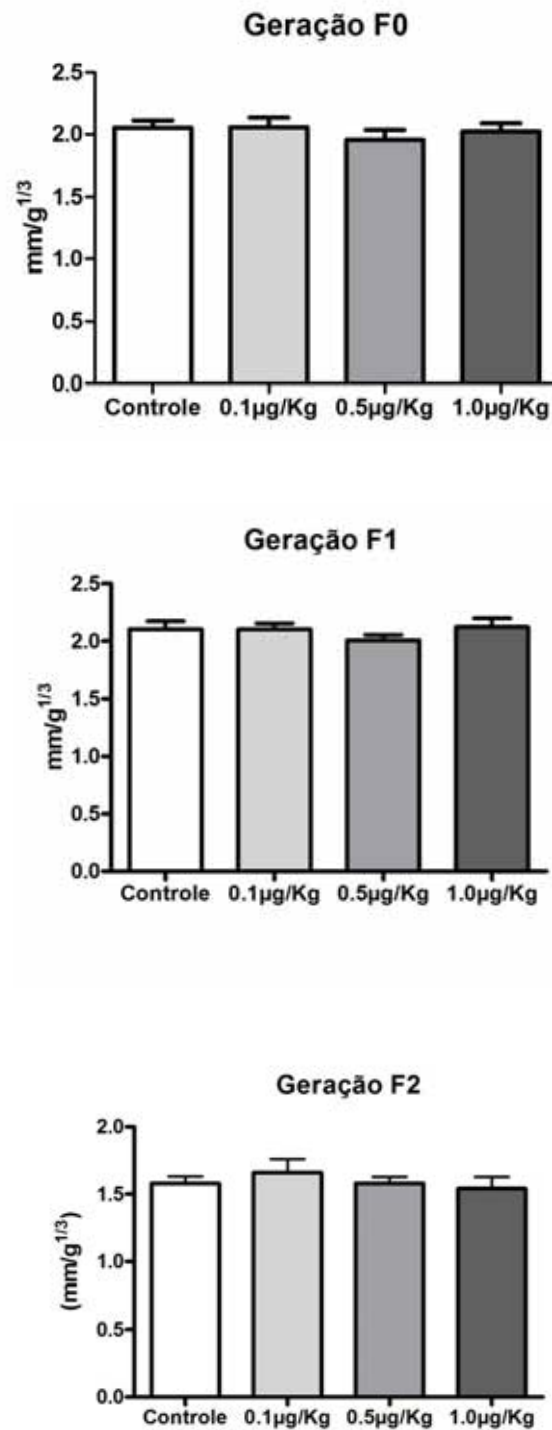


Figura 5. Distância anogenital da prole masculina dos grupos controle e tratados com diferentes doses de TCDD nas gerações F0, F1 e F2.

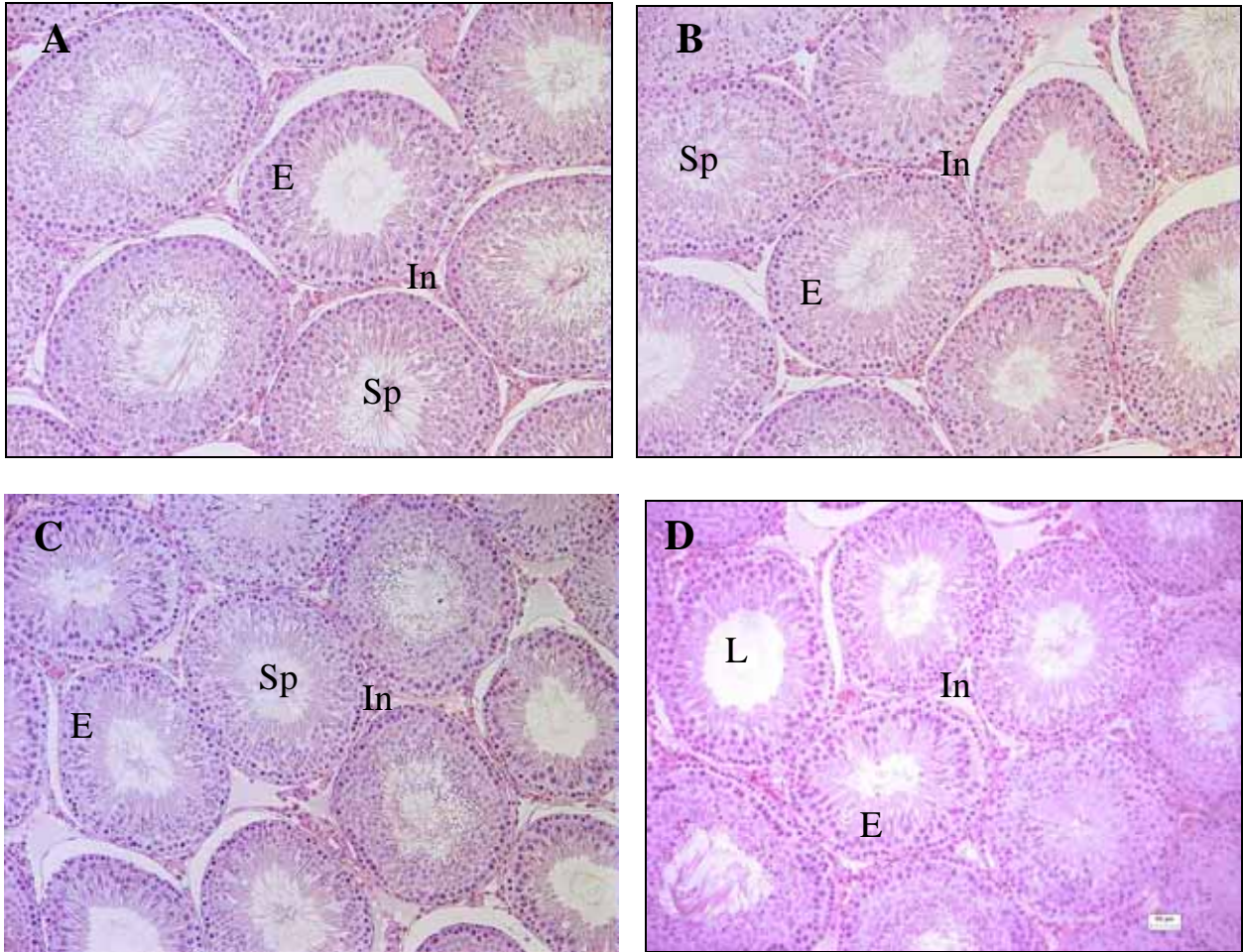


Figura 6. Fotomicrografias de cortes transversais de testículos da prole masculina adulta da geração F0; (A) Grupo Controle, (B) 0,1µg/Kg, (C) 0,5µg/Kg e (D) 1.0µg/Kg. E= Epitélio; In = Interstício; Sp= Espermatozoide. Hematoxilina e Eosina (HE). Escala bar = 60µm (200X).

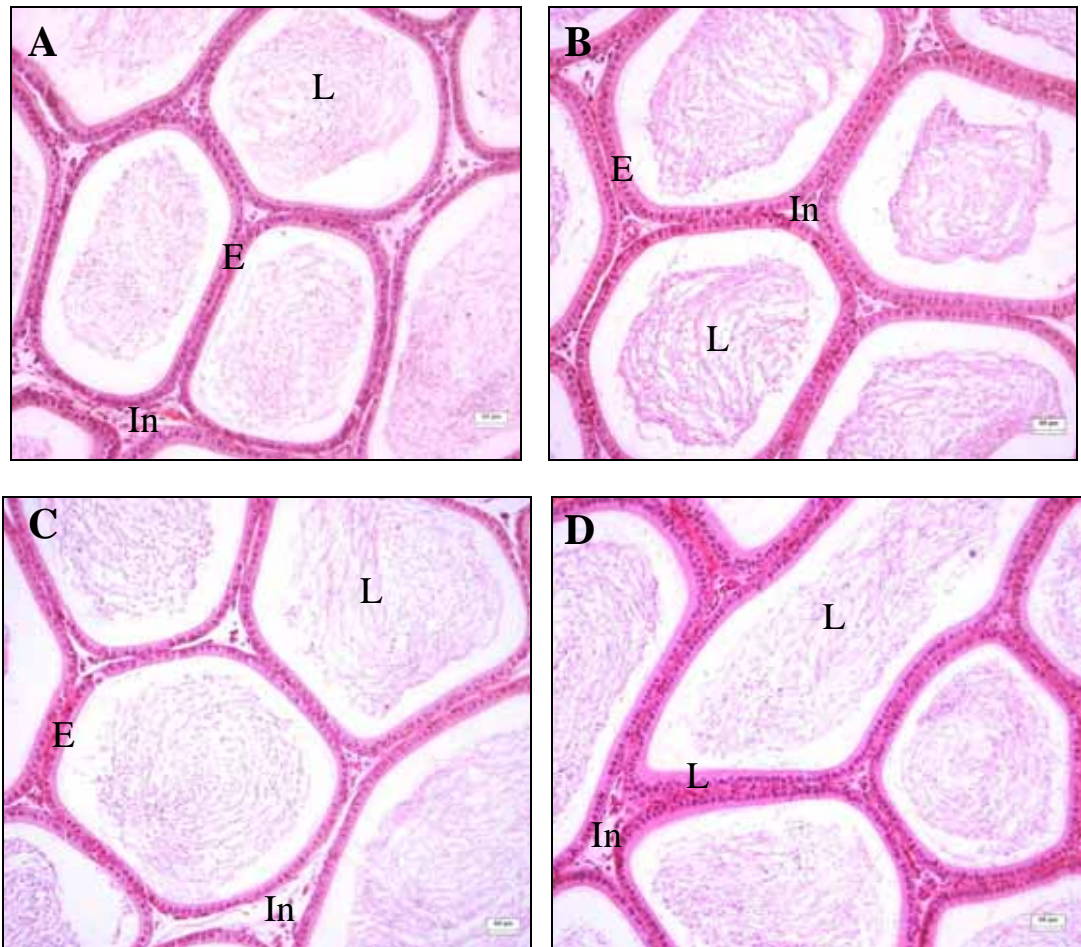


Figura 10. Fotomicrografias de cortes longitudinais de epidídimo da prole masculina adulta da geração F0; Cabeça. (A) Grupo Controle, (B) 0,1µg/Kg, (C) 0,5µg/Kg e (D) 1.0µg/Kg. E= Epitélio epididimário; In = Interstício epididimário; L= Luz do ducto. Hematoxilina e Eosina (HE). Escala bar = 60µm (200X).

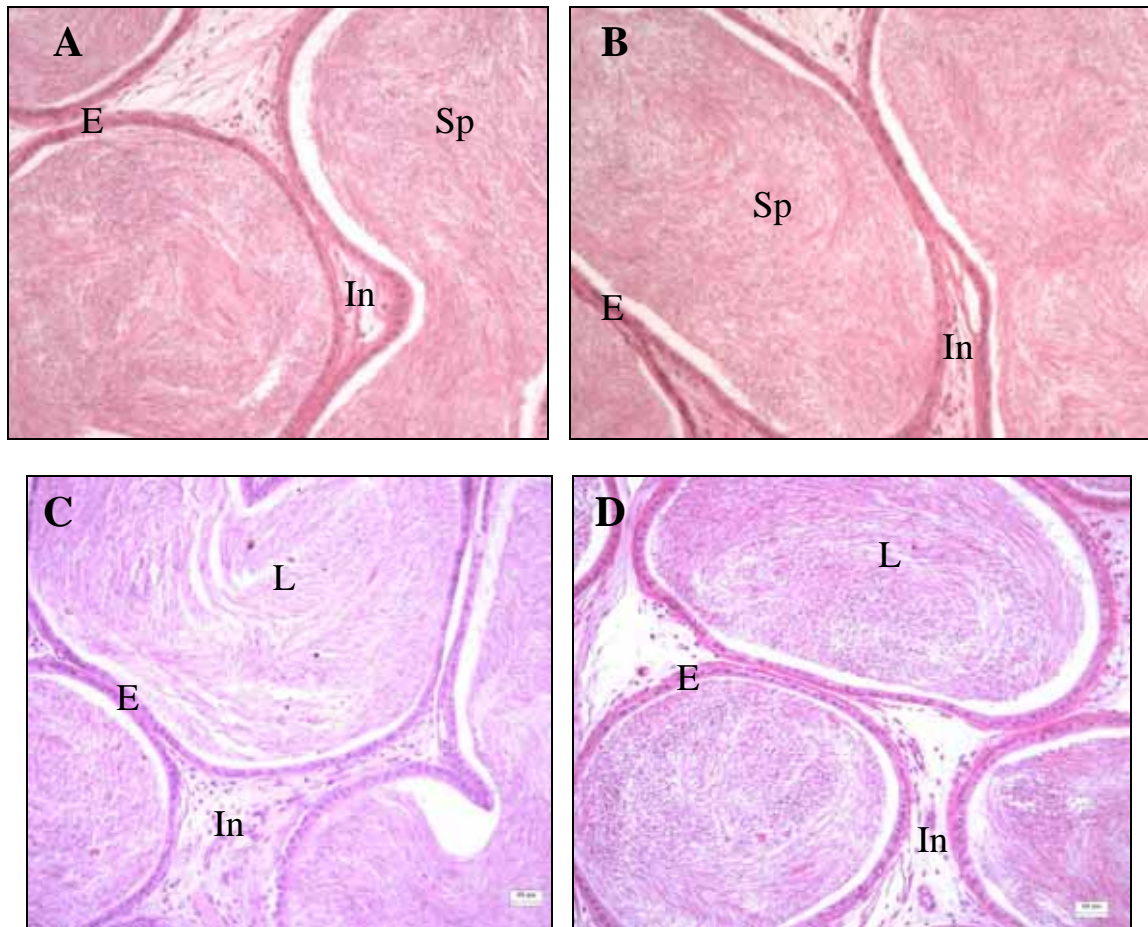


Figura 11. Fotomicrografias de cortes longitudinais de epidídimo da prole masculina adulta da geração F0; Cauda. (A) Grupo Controle, (B) 0,1 μ g/Kg, (C) 0,5 μ g/Kg e (D) 1.0 μ g/Kg. E= Epitélio epididimário; In = Interstício epididimário; L= Luz do ducto. Hematoxilina e Eosina (HE). Escala bar = 60 μ m (200X).

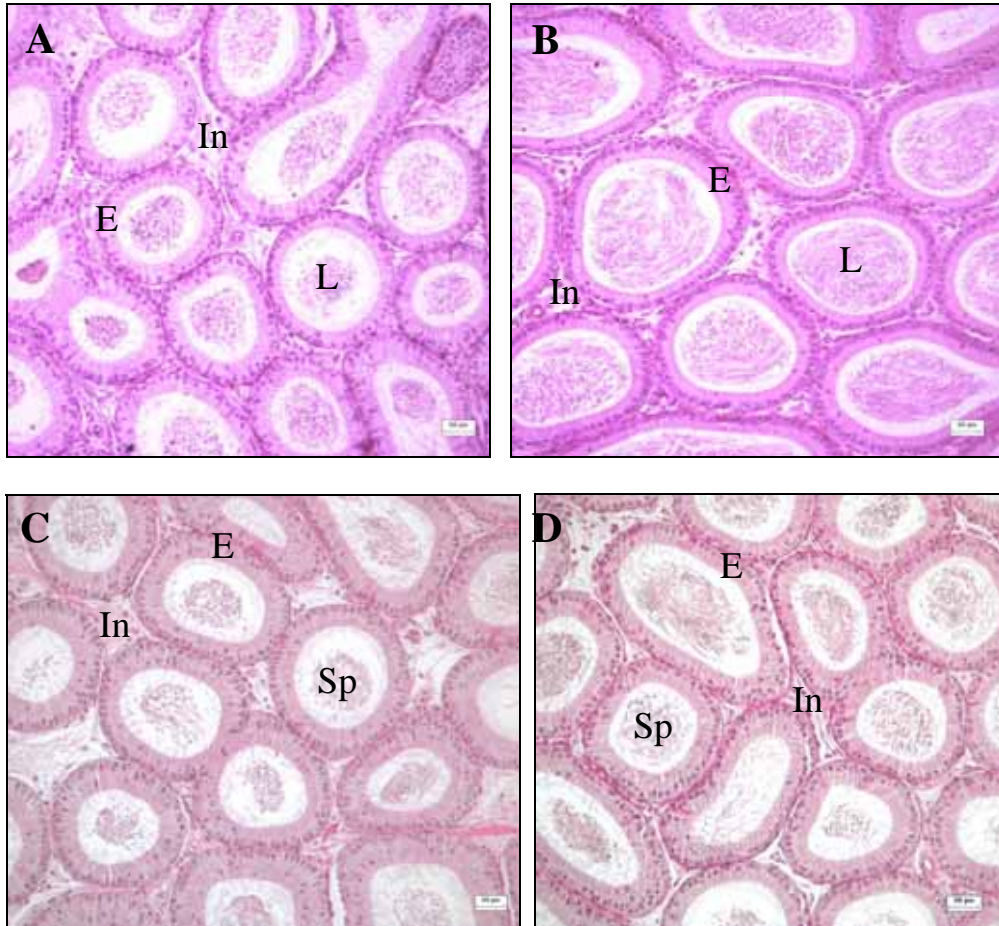


Figura 9. Fotomicrografias de cortes longitudinais de epidídimo da prole masculina adulta da geração F0; Segmento inicial. (A) Grupo Controle, (B) 0,1µg/Kg, (C) 0,5µg/Kg e (D) 1.0µg/Kg. E= Epitélio epididimário; In = Interstício epididimário; L= Luz do ducto. Hematoxilina e Eosina (HE). Escala bar = 60µm (200X).

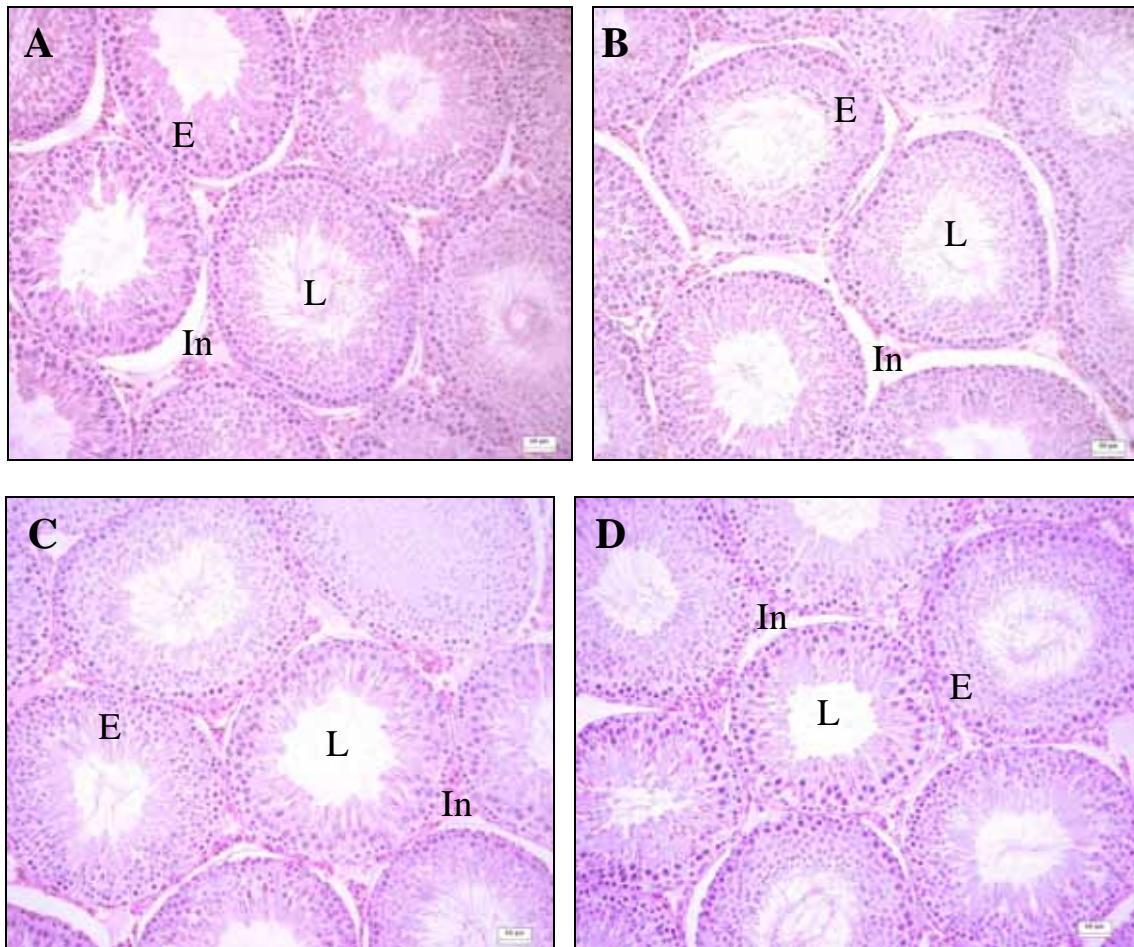


Figura 7. Fotomicrografias de cortes transversais de testículos da prole masculina adulta da geração F1; (A) Grupo Controle, (B) 0,1µg/Kg, (C) 0,5µg/Kg e (D) 1.0µg/Kg. E= Epitélio; In = Interstício; L= Lúmen. Hematoxilina e Eosina (HE). Escala bar = 60µm (200X).

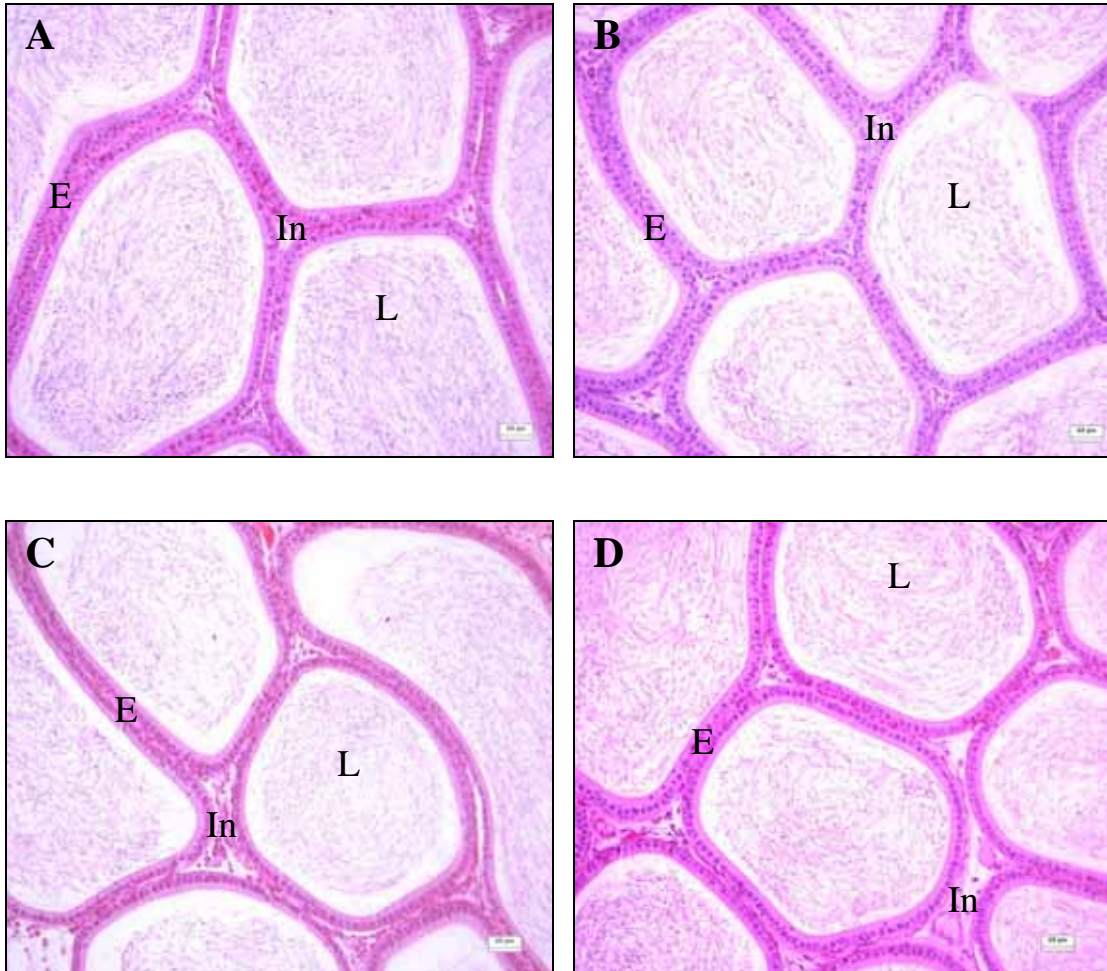


Figura 13. Fotomicrografias de cortes longitudinais de epidídimo da prole masculina adulta da geração F1; Cabeça. (A) Grupo Controle, (B) 0,1µg/Kg, (C) 0,5µg/Kg e (D) 1.0µg/Kg. E= Epitélio epididimário; In = Interstício epididimário; L= Luz do ducto. Hematoxilina e Eosina (HE). Escala bar = 60µm (200X).

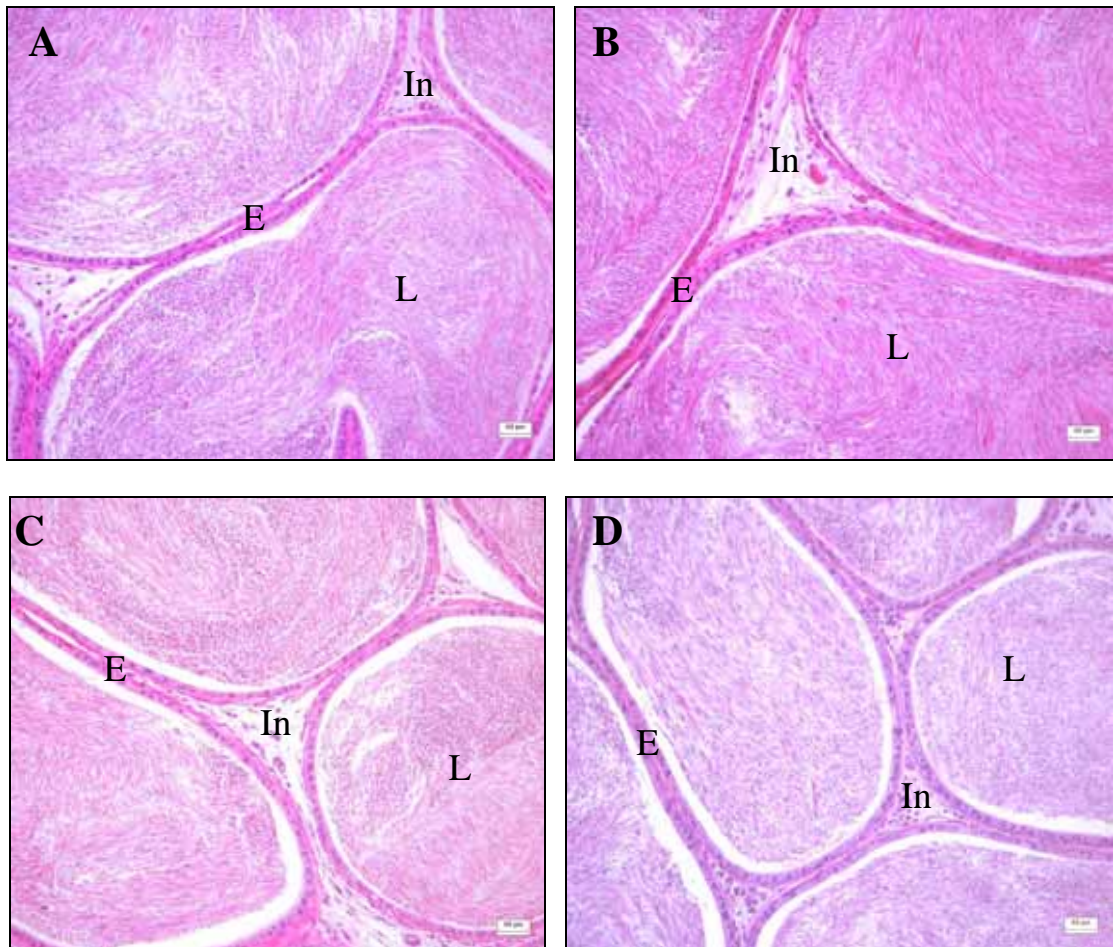


Figura 14. Fotomicrografias de cortes longitudinais de epidídimo da prole masculina adulta da geração F1; Cauda. (A) Grupo Controle, (B) 0,1µg/Kg, (C) 0,5µg/Kg e (D) 1.0µg/Kg. E= Epitélio epididimário; In = Interstício epididimário; L= Luz do ducto. Hematoxilina e Eosina (HE). Escala bar = 60µm (200X).

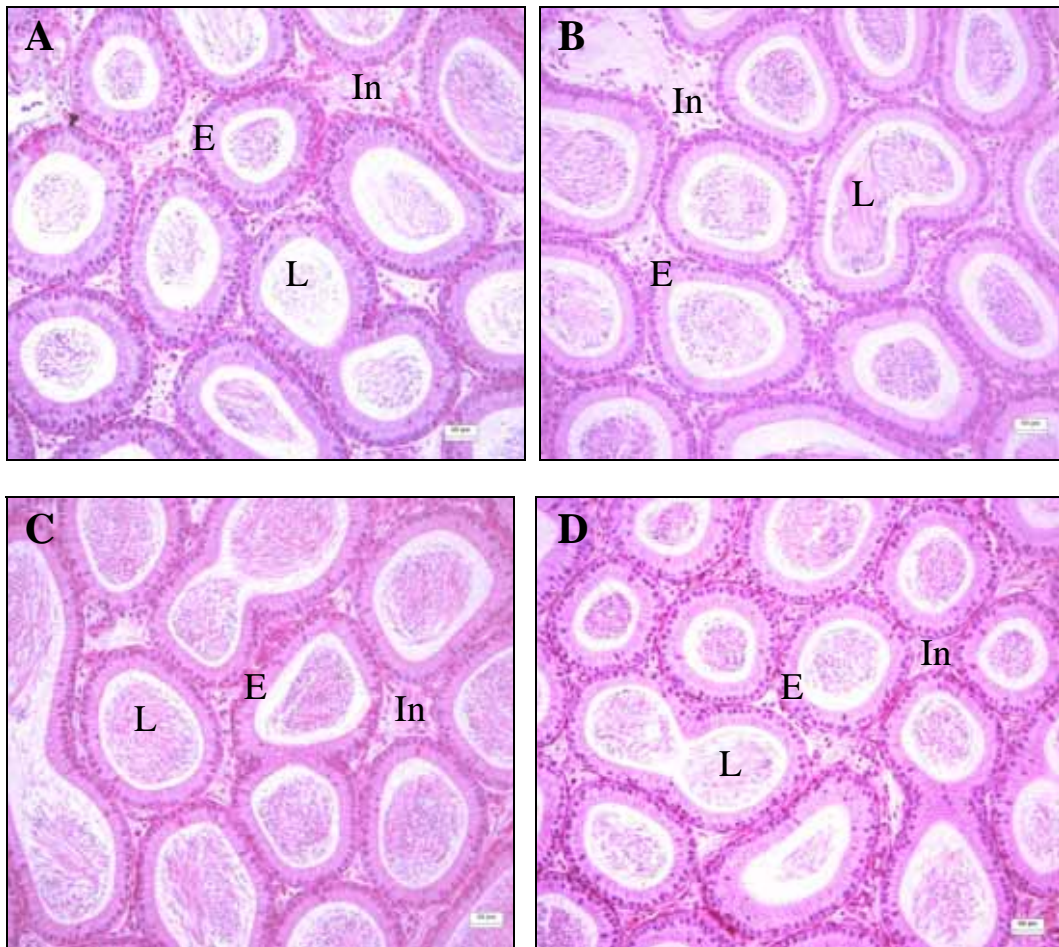


Figura 12. Fotomicrografias de cortes longitudinais de epidídimo da prole masculina adulta da geração F1; Segmento inicial. (A) Grupo Controle, (B) 0,1µg/Kg, (C) 0,5µg/Kg e (D) 1.0µg/Kg. E= Epitélio epididimário; In = Interstício epididimário; L= Luz do ducto. Hematoxilina e Eosina (HE). Escala bar = 60µm (200X).

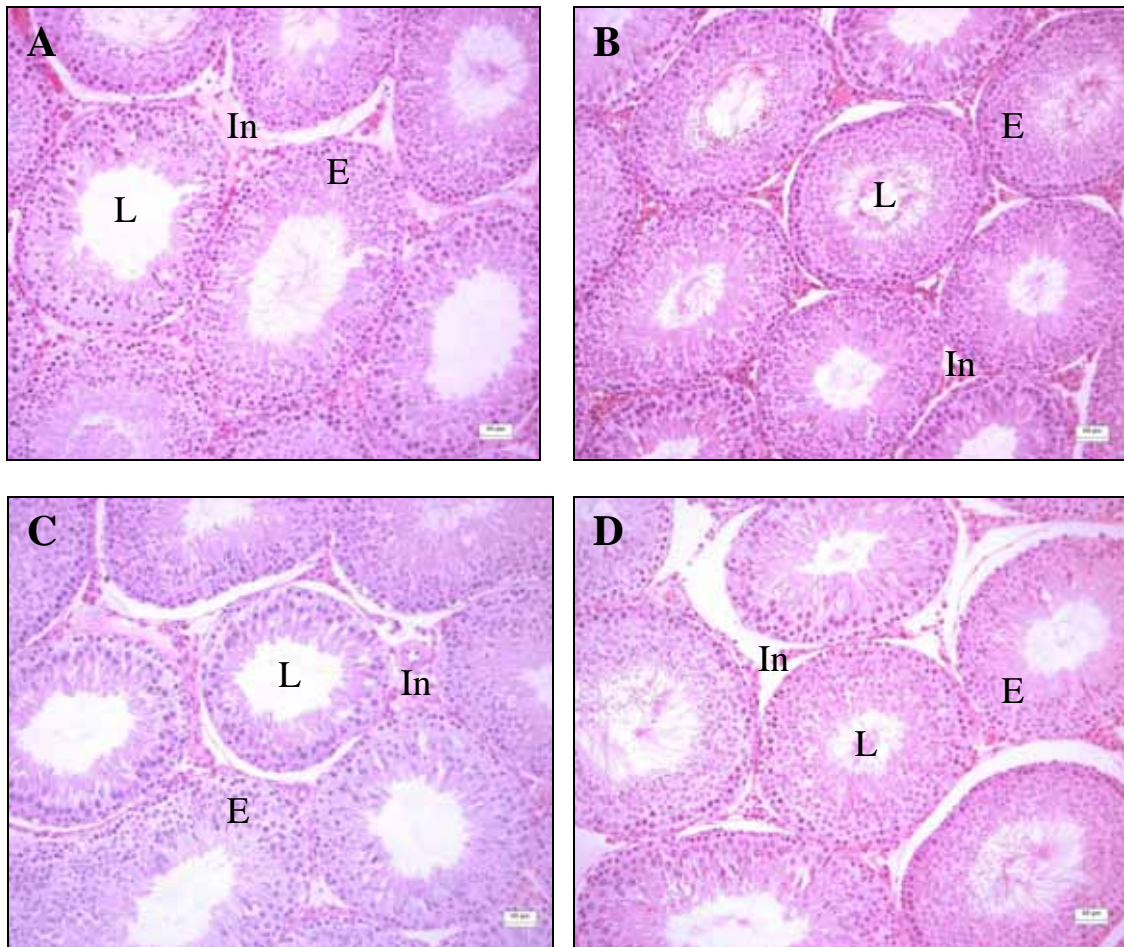


Figura 8. Fotomicrografias de cortes transversais de testículos da prole masculina adulta da geração F2; (A) Grupo Controle, (B) 0,1µg/Kg, (C) 0,5µg/Kg e (D) 1.0µg/Kg. E= Epitélio; In = Interstício; L= Lúmen. Hematoxilina e Eosina (HE). Escala bar = 60µm (200X).

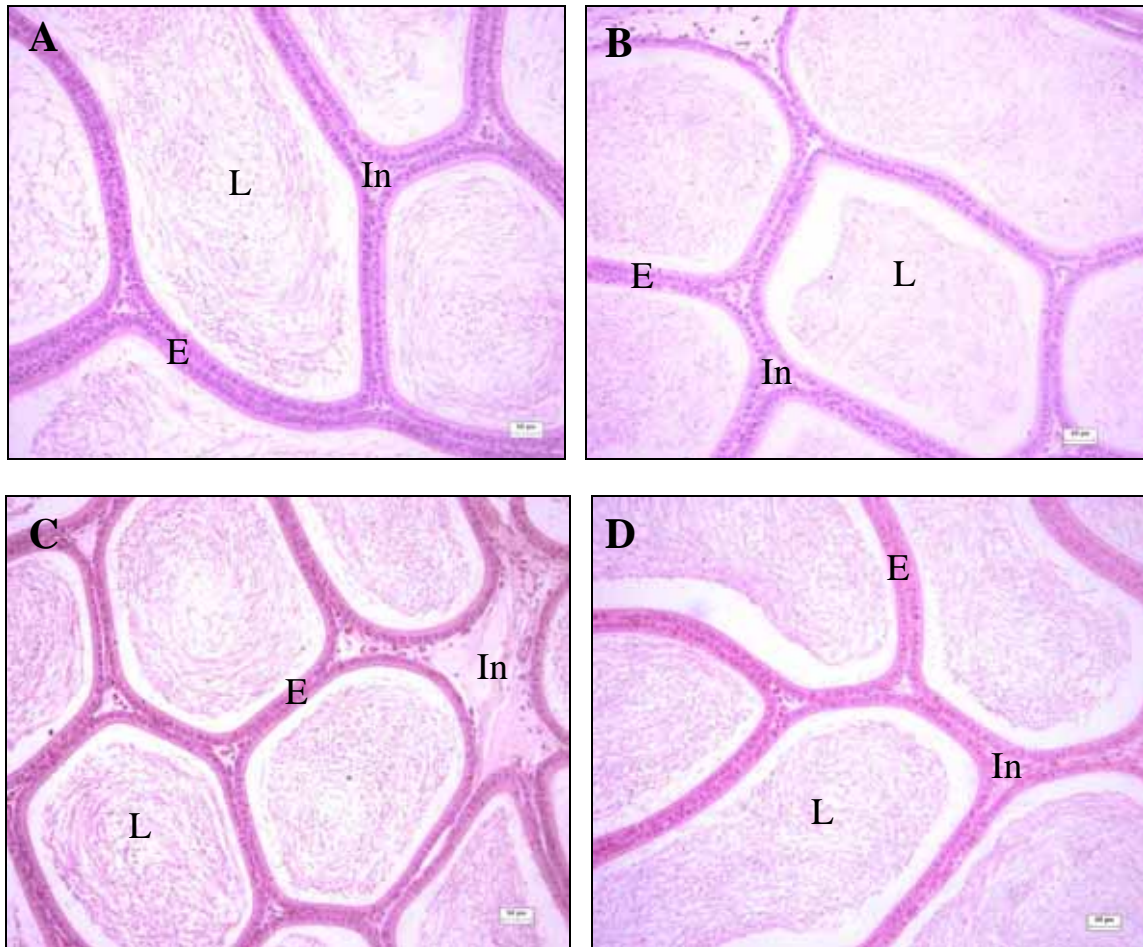


Figura 16. Fotomicrografias de cortes longitudinais de epidídimo da prole masculina adulta da geração F2; Cabeça. (A) Grupo Controle, (B) 0,1µg/Kg, (C) 0,5µg/Kg e (D) 1.0µg/Kg. E= Epitélio epididimário; In = Interstício epididimário; L= Luz do ducto. Hematoxilina e Eosina (HE). Escala bar = 60µm (200X).

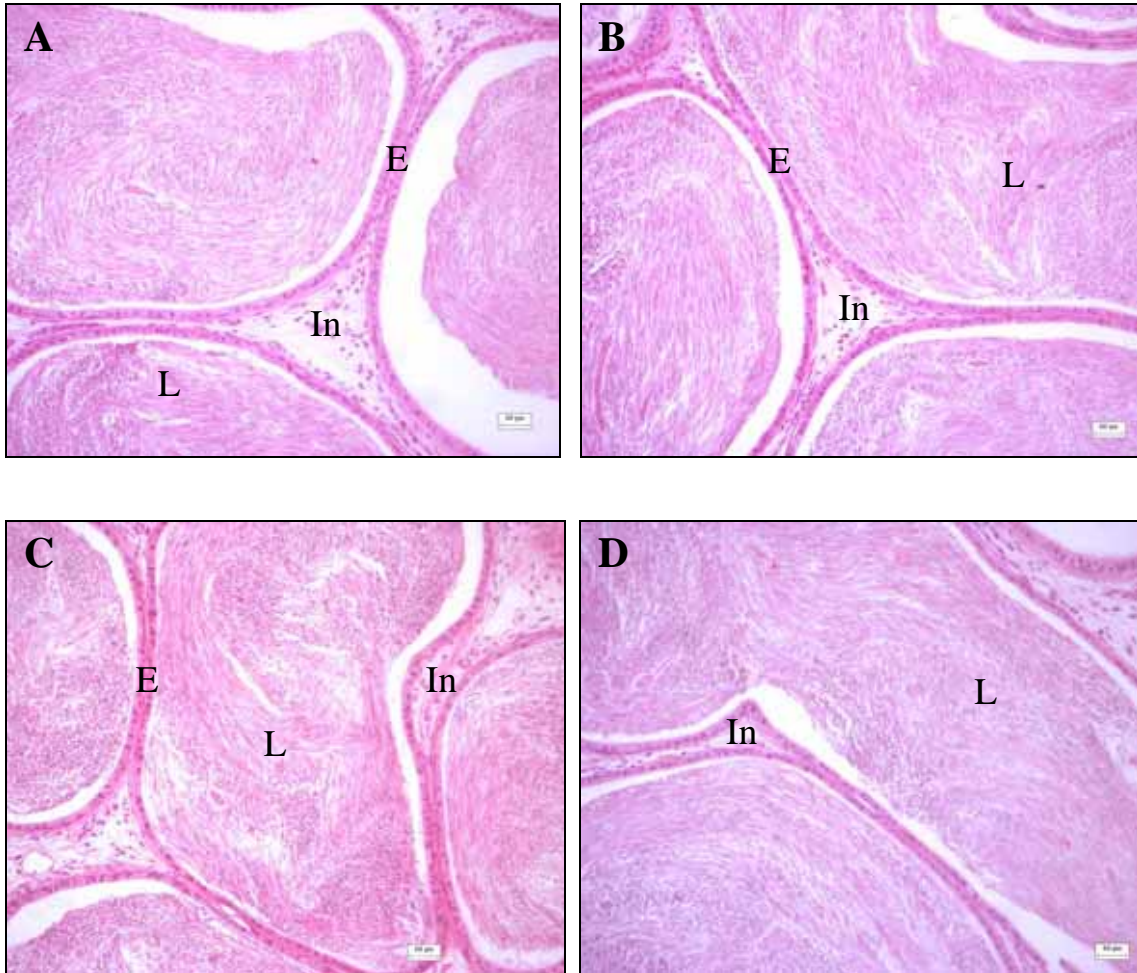


Figura 17. Fotomicrografias de cortes longitudinais de epidídimo da prole masculina adulta da geração F2; Cauda. (A) Grupo Controle, (B) 0,1µg/Kg, (C) 0,5µg/Kg e (D) 1.0µg/Kg. E= Epitélio epididimário; In = Interstício epididimário; L= Luz do ducto. Hematoxilina e Eosina (HE). Escala bar = 60µm (200X).

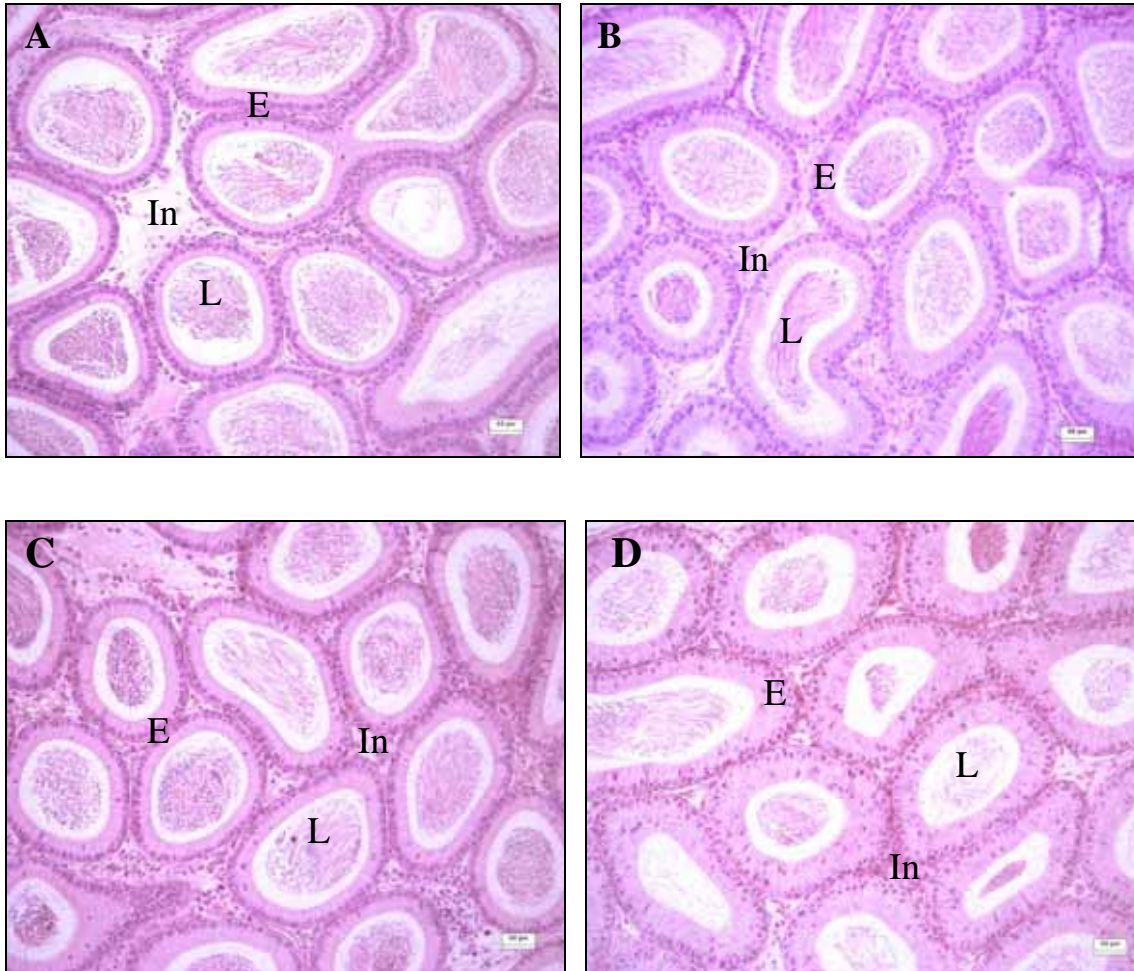


Figura 15. Fotomicrografias de cortes longitudinais de epidídimo da prole masculina adulta da geração F2; Segmento inicial. (A) Grupo Controle, (B) 0,1µg/Kg, (C) 0,5µg/Kg e (D) 1.0µg/Kg. E= Epitélio epididimário; In = Interstício epididimário; L= Luz do ducto. Hematoxilina e Eosina (HE). Escala bar = 60µm (200X).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Certificado

Certificamos que o Protocolo nº **381-CEUA**, sobre "Toxicologia reprodutiva de ratos adultos expostos ao 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) in utero e durante a lactação", sob a responsabilidade de **Wilma De Grava Kempinas**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado "Ad referendum" da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Botucatu, 26 de março de 2012.


Profª Drª Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro
Presidente da CEUA

Instituto de Ciências - Diretoria Técnico Acadêmica
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 13618-970 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3811 6013/6014 Fax 14 3815 3744 e-mail: dte@ibunesp.br