CATARINA GOMES CANI

**Estudo histológico e molecular dos efeitos da exposição ao
material particulado inalável fino da cidade de São Paulo nos
testículos de camundongos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutora em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Frade Costa

Versão corrigida

**São Paulo
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cani, Catarina Gomes

Estudo histológico e molecular dos efeitos da
exposição ao material particulado inalável fino da
cidade de São Paulo nos testículos de camundongos /
Catarina Gomes Cani. -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Elaine Maria Frade Costa.

Descritores: 1.Material particulado 2.Poluição do
ar 3.Espermatogênese 4.Crescimento e
desenvolvimento 5.Expressão gênica 6.Histologia
7.Desenvolvimento fetal 8.Estereologia
9.Camundongos

USP/FM/DBD-418/17

Dedicatória

À minha família.

Aos que se interessam pelos impactos dos poluentes na saúde e no meio ambiente.

Agradecimentos

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Dr^a Elaine Costa, pela orientação.

À Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da USP, à colega de pós-graduação Isabela Pacetti pela ajuda com as extrações e, especialmente, à Dr^a Éricka Trarbach por todo apoio nas análises de expressão e revisões de texto.

À Disciplina de Patologia da Faculdade de Medicina da USP. Ao Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental. A todos os pós-graduandos e alunos de iniciação científica que participaram dos cuidados aos animais, das exposições e das coletas. À colega de pós-graduação Marlise Di Domenico pela ajuda com os dados compartilhados, com os blocos, com as lâminas, com as colorações, com as discussões sobre os temas. Especialmente, à Dr^a Mariana Veras por toda ajuda.

Ao Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, onde foram realizados os preparos das lâminas.

Ao Laboratório de Genômica Funcional do Centro de Investigação Translacional em Oncologia do Instituto do Câncer de São Paulo Octavio Frias de Oliveira (ICESP), onde foram realizadas as leituras das análises de expressão gênica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

- ⇒ Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).
- ⇒ Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.
- ⇒ Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	ix
	LISTA DE TABELAS	xii
	LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	xiv
	RESUMO	xx
	ABSTRACT	xxi
1.	INTRODUÇÃO	1
2.	POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA	4
2.1	Histórico	5
2.2	Definição	6
2.3	Poluentes primários e secundários	7
2.4	Padrões de qualidade do ar	8
2.4.1	<i>Ozônio</i>	8
2.4.2	<i>Dióxido de nitrogênio</i>	8
2.4.3	<i>Dióxido de enxofre</i>	9
2.4.4	<i>Monóxido de carbono</i>	9
2.4.5	<i>Compostos orgânicos voláteis</i>	9
2.4.6	<i>Material particulado</i>	9
2.5	Poluição atmosférica no Brasil e no estado de São Paulo	12
3.	SISTEMA REPRODUTOR DE CAMUNDONGOS MACHOS: FUNÇÕES DOS TESTÍCULOS	15
3.1	Desenvolvimento gonadal durante o período pré-natal e após o nascimento	17
3.2	Espermatogênese	20
3.2.1	<i>Fases da espermatogênese</i>	20
3.2.1.1	<i>Mitose</i>	21
3.2.1.2	<i>Meiose</i>	21
3.2.1.3	<i>Espermio gênese</i>	22
3.2.1.4	<i>Espermiação</i>	23

3.2.2	Barreira hemato-testicular	24
3.3	Esteroidogênese	26
3.4	Regulação da espermatogênese e da esteroidogênese	28
4	MATERIAL PARTICULADO INALÁVEL FINO (MP_{2,5}) E IMPLICAÇÕES NA SAÚDE	33
4.1	Prováveis mecanismos envolvidos na toxicidade do MP_{2,5}	36
4.2	Poluição atmosférica e reprodução	39
5.	JUSTIFICATIVA	45
6.	OBJETIVOS	48
6.1	Objetivo geral	49
6.2	Objetivos específicos	49
7.	MÉTODOS	50
7.1	Ética	51
7.2	Animais	51
7.3	Protocolo de exposição ao MP_{2,5}	52
7.4	Exposição ao MP_{2,5}	53
7.5	Caracterização da composição do MP_{2,5}	57
7.6	Parâmetros analisados	57
7.6.1	Peso corporal	57
7.6.2	Peso do testículo	58
7.6.3	Peso do epidídimo	58
7.6.4	Índice gonadossomático	58
7.6.5	Volume do testículo	58
7.6.6	Parâmetros morfométricos	59
7.6.6.1	Volumes das estruturas do testículo	61
7.6.6.2	Área de superfície dos túbulos seminíferos	62
7.6.6.3	Área seccional dos túbulos seminíferos	63
7.6.6.4	Diâmetro dos túbulos seminíferos	63
7.6.7	Análise histológica do testículo	63
7.6.8	Expressão gênica	65

7.6.8.1	<i>Extração do RNA</i>	65
7.6.8.2	<i>Purificação do RNA</i>	66
7.6.8.3	<i>Microarranjos</i>	67
7.6.8.4	<i>Análise dos chips</i>	74
7.7	Estatística	75
8.	RESULTADOS	77
8.1	Composição do MP_{2,5}	78
8.2	Composição dos grupos experimentais	79
8.3	Peso corporal	80
8.4	Peso do testículo	80
8.5	Peso do epidídimo	80
8.6	Índice gonadossomático	81
8.7	Volume do testículo	81
8.8	Parâmetros morfométricos do testículo	81
8.9	Análise histológica do testículo	84
8.10	Expressão gênica	89
9.	DISCUSSÃO	108
10.	CONCLUSÕES	120
	REFERÊNCIAS	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Categorização, pelo tamanho aerodinâmico, das partículas que compõem o material particulado	12
Figura 2 –	Ilustração das estruturas de um testículo de camundongo	16
Figura 3 –	Estruturas do epitélio seminífero	19
Figura 4 –	Estágios do ciclo do epitélio seminífero no camundongo	23
Figura 5 –	Estimativas de deposição de partículas inaladas ao longo do trato respiratório	34
Figura 6 –	Protocolo de exposição dos grupos ao MP_{2,5}	53
Figura 7 –	Vista aérea da localização do CPA	54
Figura 8 –	Unidade móvel que abriga o CPA	54
Figura 9 –	Área interna do CPA mostrando as câmaras de exposição e o sistema de tubulações por onde o ar ambiente entra	55
Figura 10 –	Área interna do CPA mostrando as câmaras de exposição ao ar filtrado e ao ar não filtrado	56
Figura 11 –	Animais sendo expostos ao MP_{2,5}	56
Figura 12 –	Animal após eutanásia, durante procedimentos para coleta dos órgãos	60
Figura 13 –	Tela do programa ImageJ mostrando sistema-teste	61
Figura 14 –	Representação esquemática dos procedimentos realizados no experimento de microarranjo de cDNA utilizando a plataforma da Affymetrix	73

Figura 15 – Distribuição em gráfico BoxPlot das intensidades das sondas em escala logarítmica (eixo Y) por amostra (eixo X)	74
Figura 16 – Testículos de animais do Grupo Controle	85
Figura 17 – Túbulo seminífero de um animal do grupo pré-natal e pós-desmame (GPMPD) mostrando perda de associação de células germinativas	86
Figura 18 – Túbulo seminífero de um testículo do grupo pré-natal (GPN) apresentando exfoliação de células germinativas	86
Figura 19 – Túbulo seminífero de um testículo do grupo pré-natal e pós-desmame (GPMPD) diversas alterações	87
Figura 20 – Túbulos seminíferos de testículos do grupo pré-natal (GPN) mostrando atrofia tubular	87
Figura 21 – Túbulos seminíferos de testículos do grupo pós-desmame (GPD) mostrando diversas alterações	88
Figura 22 – Gráfico vulcano para a comparação entre os grupo controle (GC) e grupo pré-natal e pós-desmame (GPMPD)	90
Figura 23 – Gráfico vulcano para a comparação entre os grupos controle (GC) e grupo pré-natal (GPN)	91
Figura 24 – Gráfico vulcano para a comparação entre os grupo controle (GC) e grupo pós-desmame (GPD)	92
Figura 25 – Gráfico vulcano para a comparação entre os grupos pós-desmame (GPD) e grupo pré-natal (GPN)	94
Figura 26 – Gráfico vulcano para a comparação entre os grupos pré-natal (GPN) e pré-natal e pós-desmame (GPMPD)	96
Figura 27 – Gráfico vulcano para a comparação entre os grupos pós-desmame (GPD) e pré-natal e pós-desmame (GPMPD)	98

Figura 28 – <i>Heat map</i> e clusterização hierárquica dos genes expressos entre os grupos	100
Figura 29 – Gráfico da expressão do gene <i>Spata2l</i> nos grupos	101
Figura 30 – Gráfico da expressão do gene <i>mt-Ty</i> nos grupos	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Padrões de qualidade estabelecidos pela OMS, para o Brasil e para o estado de São Paulo	14
Tabela 2 – Protocolo de coloração das lâminas com hematoxilina e eosina	60
Tabela 3 – Descrição do Escore de Johnsen	64
Tabela 4 – Protocolo de lavagem e marcação de chip da Affymetrix	72
Tabela 5 – Composição elementar do MP_{2,5}	78
Tabela 6 – Quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) no MP_{2,5}	79
Tabela 7 – Composição dos grupos de acordo com o número de animais	79
Tabela 8 – Resultados dos parâmetros analisados referentes aos testículos e epidídimos, por grupo	83
Tabela 9 – Valores dos escores de Johnsen e comparações entre os grupos	84
Tabela 10 – Principais genes hiperexpressos no grupo pós-desmame (GPD) em relação ao grupo controle (GC)	90
Tabela 11 – Principais genes hipoexpressos no grupo pós-desmame (GPD) em relação ao grupo controle (GC)	92
Tabela 12 – Principais genes hiperexpressos no grupo pré-natal (GPN) em relação ao grupo controle (GC)	93
Tabela 13 – Principais genes hipoexpressos no grupo pré-natal (GPN) em relação ao grupo controle (GC)	95
Tabela 14 – Principais genes hiperexpressos no grupo pré-natal e pós-desmame (GPNPD) em relação ao grupo controle (GC)	96

Tabela 15 –	Principais genes hipoexpressos no grupo pré-natal e pós-desmame (GPNPD) em relação ao grupo controle (GC)	97
Tabela 16	Principais genes hiperexpressos no grupo pré-natal (GPN) em relação ao grupo pós-desmame (GPD)	98
Tabela 17	Principais genes hipoexpressos no grupo pré-natal (GPN) em relação ao grupo pós-desmame (GPD)	99
Tabela 18	Principais genes hiperexpressos no grupo pós-desmame (GPD) em relação ao grupo pré-natal e pós-desmame (GPNPD)	100
Tabela 19	Principais genes hipoexpressos no grupo pós-desmame (GPD) em relação ao grupo pré-natal e pós-desmame (GPNPD)	102
Tabela 20	Principais genes hiperexpressos no grupo pré-natal (GPN) em relação ao grupo pré-natal e pós-desmame (GPNPD)	105
Tabela 21	Principais genes hipoexpressos no grupo pré-natal (GPN) em relação ao grupo pré-natal e pós-desmame (GPNPD)	107

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

µg	micrograma(s)
µL	microlitro(s)
µm	micrômetro(s)
17HSD1	17-hidroxiesteroide desidrogenase 1
17HSD3	17-hidroxiesteroide desidrogenase 3
1n	haploide
2n	diploide
3β-HSD	3β-hidroxiesteroide desidrogenase
8-OHdG	<i>8-hydroxy-2'-deoxyguanosine</i>
A₁	espermatozônia(s) tipo A ₁
A₂	espermatozônias(s) tipo A ₂
A₃	espermatozônias(s) tipo A ₃
A₄	espermatozônias(s) tipo A ₄
A_{al}	espermatozônia(s) tipo A alinhada(s)
AcRet	ácido retinoico
AF	ar filtrado
AMPC	adenosina monofosfato cíclico
ANF	ar não filtrado
ANOVA	análise de variância
A_{pr}	espermatozônia(s) tipo A pareada(s)
AR	receptor(es) androgênico(s)
As	espermatozônia(s) tipo A sozinha(s)
ASK1	<i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
ATM	ataxia-telangiectasia mutado
BHT	barreira hemato-testicular
BPN	baixo peso ao nascimento
CAT	catalase

CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CGP	células germinativas primordiais
Chk2	<i>checkpoint kinase 2</i>
cm³	centímetro(s) cúbico(s)
CO	monóxido de carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COV	composto(s) orgânico(s) volátil(eis)
CPA	Concentrador de Partículas Ambientais
c-Src	<i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
CTE	células-tronco espermatogoniais
CYP	citocromo P450
DG	dia gestacional
DISC	complexo induzível de morte
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	desvio padrão
DPN	dia(s) pós-natal
DPOC	doença pulmonar obstrutiva crônica
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
ESR1	receptore(s) estrogênico(s) tipo 1
ESR2	receptore(s) estrogênico(s) tipo 2
ESTR	<i>expanded simple tandem repeat</i>
FADD	proteína de domínio de morte associada a Fas
FasL	ligante Fas
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FSH	hormônio folículo estimulante
g	grama(s)
G6PD	glucose-6-fosfato desidrogenase

GC	grupo controle
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofina
GPD	grupo pós-desmame
GPN	grupo pré-natal
GPMPD	grupo pré-natal e pós-desmame
GR	glutathione redutase
GSH-Px	glutathione peroxidase
H2AX	variante da histona H2A
HE	hematoxilina e eosina
HEPA	<i>high-efficiency particulate-air</i>
HPA	hidrocarboneto(s) policíclico(s) aromático(s)
hs	horas
Hz	Hertz
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICESP	Instituto do Câncer de São Paulo Octavio Frias de Oliveira
IGS	índice gonadossomático
IL-1R	receptor de interleucina 1
IL-6	interleucina 6
IL-6R	receptor de interleucina 6
I_n	espermatozônia(s) intermediária(s)
INSL3	<i>insulin-like 3</i>
IRAK	proteína quinase associada ao receptor de interleucina-1
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
L	litro(s)
LAPAT	Laboratório de Análise dos Processos Atmosféricos do Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da USP
LDL	lipoproteínas de baixa densidade
LH	hormônio luteinizante
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LPAE	Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental

m³	metro(s) cúbico(s)
MAA	média aritmética anual
MANOVA	análise multivariada
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCTI	Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
MGA	média geométrica anual
min	minuto(s)
mL	mililitro(s)
mm	milímetro(s)
mM	milimolar
MMP2	matriz metaloproteinase 2
MP	material particulado
MP_{2,5}	material particulado 2,5 µm
mt-Ty	<i>mitochondrially encoded tRNA tyrosine</i>
NF-κB	<i>nuclear factor-kappaB</i>
ng	nanograma(s)
nm	nanômetro(s)
NO₂	dióxido de nitrogênio
NO_x	óxidos de nitrogênio
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
O₃	ozônio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>odds ratio</i>
P	pontos
P450_{scc}	<i>cholesterol side-chain cleavage enzyme</i>
Pb	chumbo
PCR	proteína C reativa
PKA	proteína quinase dependente de AMPc
ppm	partes por milhão
PTPase	proteína-tirosina fosfatase

PTS	partículas totais em suspensão
PVC	policloreto de vinila
RA	receptora(es) androgênico(s)
RAR	receptor de ácido retinoico
RMSP	região metropolitana de São Paulo
RNA	ácido ribonucleico
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	rotações por minuto
RXR	receptores retinoides X
seg	segundo(s)
<i>Sf1</i>	<i>steroidogenic factor 1</i>
SO₂	dióxido de enxofre
SOD	superóxido desmutase
<i>Spata2l</i>	<i>spermatogenesis associated 2-like</i>
<i>Sry</i>	<i>sex-determining region Y</i>
St	área de superfície absoluta
StAR	<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>
<i>Stra6</i>	<i>stimulated by retinoic acid 6</i>
<i>Stra8</i>	<i>stimulated by retinoic acid 8</i>
Sv	densidade de superfície
test	testículo
TGF-β1	<i>transforming growth factor beta 1</i>
TGF-β2	<i>transforming growth factor beta 2</i>
TGF-β3	<i>transforming growth factor beta 3</i>
TNFR1	<i>tumor necrosis factor receptor 1</i>
TNFR2	<i>tumor necrosis factor receptor 2</i>
TNFα	<i>tumor necrosis factor α</i>
TRADD	proteína de domínio de morte associada ao receptor de TNFα
U	unidade(s)

V	volume
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
V_t	volume total
V_v	fração de volume

RESUMO

Cani CG. *Estudo histológico e molecular dos efeitos da exposição ao material particulado inalável fino da cidade de São Paulo nos testículos de camundongos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A poluição atmosférica de centros urbanizados e industrializados é associada a diversos efeitos nocivos, incluindo alterações na fertilidade masculina. A toxicidade da poluição atmosférica da cidade de São Paulo já foi demonstrada em estudos experimentais e especula-se que seus efeitos sejam mediados por estresse oxidativo, porém, os mecanismos envolvidos ainda não são totalmente conhecidos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição à poluição atmosférica da cidade de São Paulo sobre os testículos de camundongos. Para isso, os animais foram expostos à fração da poluição atmosférica mais implicada em danos à saúde, o material particulado inalável fino, que é uma complexa mistura de substâncias com 2,5 µm ou menos de diâmetro aerodinâmico (MP_{2,5}). Um grupo de camundongos foi exposto ao MP_{2,5} durante o período gestacional e após o nascimento, no período entre o pós-desmame e a idade adulta (grupo pré-natal e pós-desmame – GPNPD); um segundo grupo de camundongos foi exposto ao MP_{2,5} apenas durante o período gestacional (grupo pré-natal – GPN); o terceiro grupo foi exposto ao MP_{2,5} apenas após o nascimento, depois do desmame até a idade adulta (grupo pós-desmame – GPD); e o quarto grupo foi o controle (GC), formado por camundongos que foram expostos ao ar filtrado, tanto durante o período gestacional quanto após o nascimento até a idade adulta. Os efeitos do MP_{2,5} foram avaliados nos testículos de animais adultos, com 90 dias de vida. Técnicas estereológicas foram aplicadas para analisar aspectos estruturais do testículo e o escore de Johnsen foi utilizado para avaliar qualitativamente a espermatogênese. A expressão gênica foi realizada pela técnica de microarranjos de DNA. Na comparação com o GC, os animais do GPNPD apresentaram peso e volume dos testículos, área de superfície dos túbulos seminíferos, volume do epitélio seminífero e peso dos epidídimos maiores, bem como menor qualidade da espermatogênese, com $p < 0,05$ em todos esses parâmetros. O GPD teve comportamento semelhante, porém, apenas o volume do epitélio seminífero e a qualidade da espermatogênese diferiram significativamente do GC. O volume do epitélio seminífero do GPN foi menor que o do GC e esse foi o único parâmetro com diferença estatística em relação ao GC. A análise de expressão gênica evidenciou alteração de expressão de genes envolvidos na espermatogênese e na esteroidogênese, além de vários outros genes envolvidos nas vias de resposta imune, estresse oxidativo, dano de DNA e apoptose. Os resultados deste estudo mostraram que a exposição ao MP_{2,5} da cidade de São Paulo foi capaz de causar alterações nas funções testiculares de camundongos.

Descritores: material particulado; poluição do ar; espermatogênese; crescimento e desenvolvimento; expressão gênica; histologia; desenvolvimento fetal; estereologia; camundongos

ABSTRACT

Cani CG. *A histological and molecular study of the effects of fine inhalable particulate matter of the city of Sao Paulo on mice testes* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Air pollution in industrial and urban centers is related to negative effects in living organisms, including alterations in male fertility. Experimental studies had already showed toxicity aspects related to the air pollution of the city of Sao Paulo. The hypothesis surrounding its toxicity is based on oxidative stress, but the mechanisms are not yet completed understood. The objective of this study was to evaluate the effects of the exposure to air pollution of the city of Sao Paulo on mice testes. To do so, animals were exposed to the most deleterious fraction of the air pollution, the fine inhalable particulate matter, which consists of a complex mixture of particles sized 2,5 µm or less of aerodynamic diameter (PM_{2,5}). A group of mice was exposed to PM_{2,5} during gestational period and after birth, from the weaning day until adulthood (pré-natal and post-weaning group – PNPWG); another group was exposed to PM_{2,5} during gestational period only (pré-natal group – PNG); a third group was exposed to PM_{2,5} after birth, from the weaning day until adulthood only (post-weaning group - PWG); and finally, a fourth group of mice was exposed to filtered air during gestational period and from post-weaning day until adulthood (control group – CG). The analyses were performed on testes from adult animals. Stereological techniques were used to analyze structures of the testes and Johnsen's score to evaluate spermatogenesis in a qualitative way. DNA microarray were used to evaluate gene expression. Significant differences ($p < 0,05$) between the PNPWG and the CG were found for testis weight and volume, surface area of the seminiferous tubules, volume of the seminiferous epithelium and epididymis weight. For all these parameters the mean values of the PNPWG were higher. The quality of spermatogenesis in the PNPWG was also significant differently from CG, showing a worse quality of spermatogenesis. The PWG had similar results, however the only parameters with significant difference from the CG were the volume of the seminiferous epithelium and the quality of spermatogenesis. The volume of the seminiferous epithelium from the PNG showed significant lower mean compared to the CG. The gene expression analysis showed differential expression of genes related to spermatogenesis and steroidogenesis. Also, altered expression was found for genes related to oxidative stress, immune response, DNA damage and apoptosis ways. The results of the present study showed that the exposition to the PM_{2,5} of the city of Sao Paulo was capable of elicit testes alterations in mice.

Descriptors: air pollution; particulate matter; spermatogenesis; growth and development; gene expression; histology; fetal development; stereology; mice

1.

Introdução

A poluição atmosférica é reconhecida como o contaminante ambiental mais importante devido às suas propriedades tóxicas associadas, consequentemente, a um potencial nocivo. Diversas correlações já foram estabelecidas entre a exposição à poluição atmosférica e a incidência ou agravamento de doenças. Efeitos tóxicos relacionados à reprodução masculina também já foram evidenciados e alterações na qualidade do sêmen podem ser um dos fatores que explicam a redução nas taxas de fertilidade relatadas nas últimas décadas.

Nesse contexto, este estudo avaliou os efeitos da poluição da cidade de São Paulo sobre os testículos de camundongos, com os objetivos de identificar alterações histológicas e moleculares como forma de buscar elucidar os mecanismos envolvidos na toxicidade mediada pela poluição.

Devido à complexidade *per se* dos assuntos envolvidos no estudo, a revisão bibliográfica foi dividida em três capítulos: o primeiro deles, intitulado **Poluição Atmosférica**, aborda o contexto das alterações na composição do ar sendo entendido como um problema de saúde. São apresentados os poluentes atmosféricos, o conceito de padrão de qualidade do ar e as legislações relacionadas ao assunto. Mais detalhadamente, discorre sobre a complexidade na composição do material particulado, o poluente utilizado neste estudo.

O segundo capítulo, **Sistema Reprodutor Masculino de Camundongos: funções dos testículos**, descreve a fisiologia dos testículos, partindo de um panorama geral sobre o sistema reprodutor. Vale ressaltar que houve a preocupação de, sempre que possível, descrever características do sistema reprodutor dos camundongos. Uma visão mais aprofundada é apresentada sobre a espermatogênese, não apenas por sua importância fisiológica, mas especialmente, devido à complexidade dos eventos que envolvem a produção dos espermatozoides em um ambiente caracteristicamente distinto do ponto de vista imunológico.

O terceiro capítulo, **Material Particulado Inalável Fino (MP_{2,5}) e Implicações na Saúde**, apresenta evidências dos efeitos da poluição atmosférica relacionadas à saúde. Partindo das mais sólidas, as do aparelho respiratório e as do sistema cardiovascular, a

revisão da literatura finaliza explorando o que há em relação a aspectos reprodutivos, incluindo as descritas na cidade de São Paulo.

A **Justificativa** do estudo, finalmente, alinha as ideias apresentadas na revisão bibliográfica, dando suporte à apresentação dos **Objetivos**.

Em seguida são apresentados os **Métodos** utilizados para a realização do estudo, os **Resultados**, a **Discussão** e as **Conclusões**.

Ao final dos elementos textuais estão as **Referências**, que seguindo o modelo autor – data das citações ao longo do texto, estão listadas em ordem alfabética.

2.

Poluição Atmosférica

2.1 Histórico

Durante a Revolução Industrial, nos séculos XVIII e XIX, houve aumento do uso e, conseqüentemente, da demanda por combustíveis, eletricidade e atividades de mineração. A escassez de madeira, levou à intensificação do uso do carvão mineral. A queima do carvão, até então restrita ao ambiente doméstico para aquecimento das casas e cozimento de alimentos, passou a ser realizada também pelas indústrias de manufatura de ferro e aço. Esse cenário fez com que a qualidade do ar piorasse consideravelmente (Danni-Oliveira 2008, Falcon-Rodriguez, Osornio-Vargas et al. 2016).

Há registros de que em algumas cidades inglesas havia constantemente nuvens de fumaça pairando sobre o ar. Nessa época, o ar era composto principalmente por fuligem e dióxido de enxofre, provenientes da queima do carvão; cloreto de hidrogênio, vapores de amônia e de mercúrio, produzidos por indústrias de sabão, de vidro, têxteis, de cimento e de metais (Danni-Oliveira 2008, Stanek, Brown et al. 2011).

As populações mais afetadas foram as de algumas cidades inglesas – precursoras do processo de industrialização – e, devido a isso, o primeiro manual sobre climatologia urbana surgiu em Londres, em 1818. Dois anos depois, na sua segunda edição, o termo neblina da cidade (*city fog*) passou a ser utilizado para determinar a qualidade do ar urbano. No século XIX, as cidades mais afetadas pela poluição do ar passaram a registrar quantidades crescentes de óbitos causados por episódios de poluição: em Londres, ocorreram 500 mortes em dezembro de 1873 e em 1880 foram mais 2 mil, todas ocasionadas por episódios de *fog* intensos (Danni-Oliveira 2008, Stanek, Brown et al. 2011).

No século XX, três episódios de poluição atmosférica bem documentados, ficaram conhecidos como 'Os maiores desastres da poluição atmosférica'. O primeiro deles ocorreu na Bélgica, em 1930, no vale do rio Meuse. Uma mistura de baixa temperatura, pouca dispersão dos vento e nevoeiro, juntamente com as emissões das

diversas indústrias instaladas na região, provocou grande acúmulo de poluentes atmosféricos, acarretando em 6 mil óbitos em apenas 2 dias. Em 1948, nos Estados Unidos, no episódio que ficou conhecido como *Donora Death Fog*, na cidade de Donora - localizada no vale do rio Monongahela, ocorreram 20 mortes e a hospitalização de cerca de metade da população da cidade, devido à inversão térmica, decorrente da combinação das emissões das indústrias locais e baixas temperaturas. O mais conhecido dentre os grandes desastres da poluição, foi o ocorrido em Londres, em 1952. Em dezembro daquele ano, quatro dias foram marcados por uma intensa inversão térmica, ocasionada por baixas temperaturas, ar estagnado e intensa neblina, saturando o ar com fuligem e ocasionando a morte de 4 mil pessoas, por pneumonia, bronquite e doenças cardíacas (Stanek, Brown et al. 2011, Falcon-Rodriguez, Osornio-Vargas et al. 2016).

Até o início do século XX, praticamente nenhuma providência foi tomada para controlar a emissão de poluentes. Porém, diante do aumento da industrialização e do crescimento da urbanização, levando ao comprometimento da qualidade do ar e da saúde da população, em meados do século XX diversos países começaram a estabelecer critérios e parâmetros de qualidade do ar (Danni-Oliveira 2008) e os cientistas começaram a estudar doenças causadas pela exposição ao ar poluído (Falcon-Rodriguez, Osornio-Vargas et al. 2016).

2.2 Definição

A poluição atmosférica é a alteração das características naturais do ar causada pela contaminação do ambiente interno ou externo por qualquer agente químico, físico ou biológico. Fontes comuns de poluição são os veículos automotores, as emissões industriais, a queima doméstica de combustíveis e os incêndios florestais. O conhecimento de que alguns desses agentes são prejudiciais ao meio ambiente e relacionados à ocorrência de malefícios em animais e humanos, fez com eles se

tornassem questão importante de saúde pública, levando ao desenvolvimento de políticas para redução de emissão e monitoramento de seus níveis na atmosfera (WHO 2017).

Conhecidos como poluentes atmosféricos, esses agentes são, de acordo com a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 03, (1990, p. 01)

qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos, e que tornem ou possam tornar o ar impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde; inconveniente ao bem estar público; danoso aos materiais, à fauna e flora; prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade.

2.3 Poluentes primários e secundários

Os poluentes atmosféricos podem ser classificados em primários e secundários de acordo com sua formação (WHO 2006).

Poluentes primários são aqueles emitidos por uma fonte (indústrias, escapamentos, suspensão pelo vento de poeira contaminada) diretamente na atmosfera. Importante ressaltar que , para as fontes fixas, considera-se a possibilidade de medir a emissão dos poluentes diretamente no momento da emissão (WHO 2006).

Poluentes secundários são formados na atmosfera. Geralmente constituem produtos de reações entre poluentes primários com elementos naturalmente presentes no ar, como água e oxigênio. A quantificação desses poluentes é realizada de maneira indireta, por estimativa dos constituintes da atmosfera (WHO 2006).

2.4 Padrões de qualidade do ar

A avaliação da qualidade do ar é feita a partir da quantificação constante (monitoramento) dos padrões de qualidade do ar, que são poluentes cujos limites, quando ultrapassados, poderão afetar a saúde, a segurança e o bem-estar da população, bem como ocasionar danos à flora e à fauna, aos materiais e ao meio ambiente em geral (Brasil 1990).

2.4.1 Ozônio

O ozônio (O_3) é um gás incolor, inodoro e o principal componente da névoa fotoquímica. É um poluente secundário e compõe, juntamente com outros oxidantes fotoquímicos, um conjunto de compostos que são formados por uma série de complexas reações envolvendo radiação solar, moléculas de óxidos de nitrogênio (NO_x) e compostos orgânicos voláteis (COV) (WHO 2006, Cetesb 2013, Rengaraj, Kwon et al. 2015).

2.4.2 Dióxido de nitrogênio

O dióxido de nitrogênio (NO_2) é um gás marrom avermelhado, com odor forte e muito irritante. É um forte oxidante e reage com a água formando ácido nítrico. Quando ativado pela radiação solar, são desencadeadas reações que geram como produtos orgânicos, nitratos e sulfatos, que contribuem para o aumento da poluição do ar (WHO 2006).

As principais fontes antropogênicas provêm de processos de combustão em fontes fixas – como aquecimento e geração de eletricidade –, e em fontes móveis, como nos motores de veículos e de navios (WHO 2006).

2.4.3 Dióxido de enxofre

O dióxido de enxofre (SO_2) é um dos principais componentes da poluição atmosférica. É um gás incolor, de odor forte, proveniente da combustão de combustíveis fósseis que contêm enxofre (veículos automotores, refinarias de petróleo, produção de papel, fertilizantes). A oxidação do SO_2 catalisada por metais leva a formação dos ácidos sulfuroso e sulfúrico que, ao reagirem com amônia, geram bissulfatos e sulfatos, importantes componentes da poluição (WHO 2006, Cetesb 2013).

2.4.4 Monóxido de carbono

O monóxido de carbono (CO) é um gás inodoro e incolor, emitido dos processos de combustão que ocorrem em condições não ideais, em que não há oxigênio suficiente para realizar a queima completa do combustível. A maior parte das emissões em áreas urbanas são decorrentes dos veículos automotores (Cetesb 2013, MMA 2017).

2.4.5 Compostos Orgânicos Voláteis

Os compostos orgânicos voláteis (COV) são um grupo de substâncias provenientes da queima incompleta de combustíveis e de outros produtos orgânicos. Os mais comuns presentes na atmosfera são benzeno, tolueno, xileno e etilbenzeno e muitos deles estão envolvidos nas reações de formação de ozônio (Rengaraj, Kwon et al. 2015, Zhong, Su et al. 2017).

2.4.6 Material particulado

O material particulado (MP), ou aerossol atmosférico, é uma mistura complexa de substâncias suspensas na atmosfera, que variam em tamanho, composição e

origem. Essas substâncias se encontram em estado sólido e/ou líquido; podem ser orgânicas e inorgânicas, provenientes de fontes naturais (aerossóis provenientes do mar, erosão do solo, queima espontânea de florestas) ou antropogênicas (emissões industriais e de veículos automotores, mineração, construções) (WHO 2000, Fuzzi, Baltensperger et al. 2015, Falcon-Rodriguez, Osornio-Vargas et al. 2016).

São considerados MP primários aqueles que são emitidos diretamente na atmosfera, como pólen, poeira mineral, metais, fuligem. Já o MP secundário é formado na atmosfera por processos de conversão envolvendo as frações gasosas e sólidas. Reações das quais participam sulfatos, nitratos e compostos orgânicos ocorrem em três etapas, modificando o tamanho e a composição do particulado: na nucleação, substâncias são convertidas (por condensação ou reação química) da fase gasosa para líquida ou sólida, formando os primeiros núcleos; na condensação, gases em temperaturas elevadas formam aerossóis primários; e na coagulação, as partículas formadas anteriormente se aglomeram, aumentando em tamanho aerodinâmico (WHO 2000, Fuzzi, Baltensperger et al. 2015, Falcon-Rodriguez, Osornio-Vargas et al. 2016).

O diâmetro aerodinâmico é o tamanho de uma esfera de densidade unitária (1 g/cm^3) que tem a mesma velocidade terminal de queda no ar que a partícula em comparação. De maneira simplificada, o diâmetro aerodinâmico é geralmente referido como o tamanho da partícula, que é bastante variado, podendo ser de poucos nanômetros (nm) a mais de 100 micrômetros (μm). Assim, é conveniente classificar o MP de acordo com o tamanho das partículas que o compõe porque é o tamanho que determina como o particulado é transportado e removido da atmosfera e do trato respiratório, além de estar associado à composição química e às fontes das partículas. A **Figura 1** apresenta uma ilustração comparando alguns componentes da poluição por tamanho (WHO 2000, Falcon-Rodriguez, Osornio-Vargas et al. 2016).

As partículas totais em suspensão (PTS) possuem até $50 \mu\text{m}$ de tamanho e são oriundas da quebra mecânica de partículas sólidas maiores e podem ser carreadas pelo vento a partir de processos agrícolas, do solo, de vias não pavimentadas, de atividades de mineração, além de emissões industriais e de veículos automotores. Também fazem

parte das PTS, grãos de pólen, os esporos de fungos, plantas e partes de insetos. Em áreas litorâneas, a evaporação de aerossóis marítimos pode originar partículas grandes (WHO 2000, Cetesb 2013).

A fração do MP cujas partículas possuem entre 2,5 e 10 μm (MP_{10}) de tamanho é também chamada de MP inalável ou partículas inaláveis. É formada a partir de gases presentes na atmosfera, por nucleação, condensação e coagulação e proveniente, principalmente, de processos de combustão industrial e de veículos automotores, da ressuspensão do solo (WHO 2000, Cetesb 2013).

Parte do MP_{10} é composto por partículas com 2,5 μm ou menos de tamanho e essa fração é conhecida como $\text{MP}_{2,5}$ ou, ainda, como partículas inaláveis finas. Da mesma maneira, são formadas por processos de nucleação, condensação e coagulação como fontes secundárias, provenientes de reações de combustão de combustíveis orgânicos (carvão e biomassa) e de veículos automotores (WHO 2000, Cetesb 2013).

O $\text{MP}_{2,5}$ se deposita lentamente e é capaz de permanecer suspenso na atmosfera durante dias e até semanas, podendo ser transportado por quilômetros (Wang, Kobayashi et al. 2016).

As partículas inaláveis ultrafinas ($\text{MP}_{0,1}$) correspondem à fração do MP que contém partículas de tamanho igual ou menor que 0,1 μm e são originadas principalmente a partir de fontes antropogênicas que fazem queima de combustíveis fósseis, como veículos automotores e indústrias (Chen, Hu et al. 2016).

Cerca de 20 a 90% da massa do MP é constituída por compostos orgânicos, sendo a maior parte de alcanos não tóxicos. Os compostos policíclicos aromáticos – incluindo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), representam uma fração pequena dessa massa, porém, tóxica. Os HPA se adsorvem especialmente no $\text{MP}_{2,5}$ e são provenientes de queima de carvão e de emissão de veículos automotores (Wang, Kobayashi et al. 2016). Os HPA são caracterizados pela presença de 2 ou mais anéis aromáticos (benzeno) e apenas carbono e hidrogênio. Na atmosfera, estão presentes tanto na fase gasosa quanto na particulada (Demircioglu, Sofuoglu et al. 2011), o que ocorre em função da volatilidade do composto. Os HPA de peso molecular menor (com

2 ou 3 anéis aromáticos) permanecem na fase gasosa enquanto aqueles com peso molecular maior (com 5 ou mais anéis aromáticos) são emitidos na fase particulada. Os HPA com pesos intermediários (4 anéis aromáticos) são divididos entre as fases gasosa e particulada, dependendo da temperatura da atmosfera (WHO 2010, Morakinyo, Mokgobu et al. 2016).

Fonte: (Cosselman, Navas-Acien et al. 2015)

Figura 1 – Categorização, pelo tamanho aerodinâmico, das partículas que compõem o material particulado

2.5 Poluição atmosférica no Brasil e no estado de São Paulo

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os padrões de qualidade do ar adotados em uma região, dependem de aspectos como abordagem utilizada para balancear os riscos à saúde; viabilidade técnica; condições econômicas, além de fatores políticos e sociais, que dependem do nível de desenvolvimento e da capacidade do país em gerenciar a qualidade do ar (WHO 2016).

No Brasil, o CONAMA, criado em 1981 e vinculado ao Ministério do Meio Ambiente, é o órgão federal responsável por estabelecer normas de controle e monitoramento da qualidade do ar (Brasil 1981).

Em São Paulo, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) é a agência do Governo do Estado responsável pelo controle, fiscalização, monitoramento e licenciamento de atividades geradoras de poluição, com a preocupação fundamental de preservar e recuperar a qualidade das águas, do ar e do solo (Brasil 1981). Desde a década de 70, a CETESB vem monitorando a qualidade do ar no estado, através de redes de monitoramento adequadas às diferentes demandas de controle, uma vez que o estado possui áreas com diferentes características e vocações econômicas (Cetesb 2012).

Para o Brasil, o CONAMA estabeleceu padrões nacionais de qualidade do ar, que são divididos em primários e secundários. Os padrões primários são as concentrações de poluentes que, ultrapassadas, poderão afetar a saúde da população. Podem ser entendidos como níveis máximos toleráveis de concentração de poluentes atmosféricos, constituindo-se em metas de curto e médio prazo. Os padrões secundários são as concentrações de poluentes atmosféricos abaixo das quais se prevê o mínimo efeito adverso sobre o bem-estar da população, assim como o mínimo dano à fauna e à flora, aos materiais e ao meio ambiente em geral. Podem ser entendidos como níveis desejados de concentração de poluentes, constituindo-se em meta de longo prazo (Brasil 1990).

Em 2008, o Estado de São Paulo iniciou um processo de revisão dos padrões de qualidade do ar, baseando-se nas diretrizes estabelecidas pela OMS, com participação de representantes de diversos setores da sociedade. Esse processo culminou na publicação do Decreto Estadual nº 59.113 de 23/04/2013, estabelecendo novos padrões de qualidade do ar por intermédio de um conjunto de metas gradativas e progressivas para que a poluição atmosférica seja reduzida a níveis desejáveis ao longo do tempo (Cetesb 2015).

Esse decreto estabelece que a administração da qualidade do ar no território do Estado de São Paulo será efetuada através de Padrões de Qualidade do Ar, observados os seguintes critérios:

1. Metas Intermediárias – estabelecidas como valores temporários a serem cumpridos em etapas, visando à melhoria gradativa da qualidade do ar no Estado de São Paulo, baseada na busca pela redução das emissões de fontes fixas e móveis, em linha com os princípios do desenvolvimento sustentável;
2. Padrões Finais – Padrões determinados pelo melhor conhecimento científico para que a saúde da população seja preservada ao máximo em relação aos danos causados pela poluição atmosférica (Cetesb 2015).

Os padrões de qualidade do ar estabelecidos pela OMS, pelo CONAMA e pela CETESB estão detalhados na **Tabela 1** (Brasil 1990, São Paulo 2013, WHO 2016).

Tabela 1 - Padrões de qualidade estabelecidos pela OMS, para o Brasil e para o estado de São Paulo

Poluente	Tempo de amostragem	OMS ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Brasil ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	São Paulo ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Partículas totais em suspensão (PTS)	24 horas*		240	240
	MGA		80	80
Partículas inaláveis (MP_{10})	24 horas*	50	150	120
	MAA	20	50	40
Partículas inaláveis finas ($\text{MP}_{2,5}$)	24 horas	25	-	60
	MAA	10	-	20
Fumaça	24 horas*		150	120
	MAA		60	40
Dióxido de enxofre (SO_2)	24 horas*		365	60
	MAA		80	40
Dióxido de nitrogênio (NO_2)	1 hora		320	260
	MAA		100	60
Monóxido de carbono (CO)	1 hora*		35 ppm	-
	8 horas*		9 ppm	9 ppm
Ozônio (O_3)	1 hora*		160	-
	8 horas		-	140
Chumbo (Pb)	MAA		-	0,5

* Não deve ser excedido mais que uma vez ao ano; MGA: Média geométrica anual; MAA: Média aritmética anual; ppm: partes por milhão.

Fontes: <http://www.mma.gov.br/cidades-sustentaveis/qualidade-do-ar/padroes-de-qualidade-do-ar>; Decreto Estadual nº 59.113/2013 <http://ar.cetesb.sp.gov.br/padroes-de-qualidade-do-ar/>; OMS (WHO 2016)

3.

*Sistema Reprodutor de
Camundongos Machos: Funções
dos Testículos*

Os espermatozoides e os hormônios esteroides configuram os principais produtos do sistema reprodutor masculino. O testículo é o órgão que os produz e, juntamente com as demais estruturas do sistema, garantem, em última instância a perpetuação das espécies.

No camundongo, esse sistema é composto por um par de testículos, ductos extratesticulares (que incluem ductos eferentes, epidídimos e vasos *deferens*), glândulas acessórias sexuais (vesículas seminais, próstata, glândulas bulbouretrais, glândulas ampulares e glândulas prepuciais), uretra e pênis. Vale destacar que as glândulas ampulares e as prepuciais não são encontradas no homem (Treuting P M, Dintzis S M et al. 2012).

Os testículos, recobertos pelas túnicas albugínea e *vaginalis*, são localizados na bolsa escrotal e, fora dela, são circundados pelos epidídimos e por tecido adiposo. Histologicamente, os testículos são constituídos por túbulos seminíferos enrolados, cujas extremidades - os *tubuli recti*, se confluem para o *rete testis* e, em seguida, para câmaras coletoras (septos) até os ductos eferentes e a cabeça do epidídimo, como pode-se observar na **Figura 2** (Treuting P M, Dintzis S M et al. 2012, Nakata, Wakayama et al. 2015).

Fonte: (Hogarth and Griswold 2010)

Figura 2 – Ilustração das estruturas de um testículo de camundongo

Os ductos eferentes coletam, armazenam e conduzem os espermatozoides do testículo até a cabeça do epidídimo e os vasos *deferens* conduzem os espermatozoides da cauda do epidídimo até a uretra. Juntamente com os espermatozoides, as secreções das vesículas seminais, da próstata, das glândulas bulbouretrais e ampulares formam o sêmen. As glândulas prepuciais, localizadas próximas à base de pênis, são glândulas sebáceas modificadas que produzem feromônios (Treuting P M, Dintzis S M et al. 2012).

3.1 Desenvolvimento gonadal durante o período pré-natal e após o nascimento

Durante o desenvolvimento embrionário do camundongo, uma gônada bipotencial é vista, no 10º dia embrionário, como uma crista no lado ventral do mesonefro. O processo de formação da gônada envolve a participação de genes como o *Sf1* e o *Wt1*. Nos 2 dias seguintes, as gônadas adquirem especificidade sexual, por mecanismos guiados principalmente pela expressão do *Sry* nas células destinadas a se tornarem células de Sertoli. Essas, secretam o hormônio anti-Mülleriano, que suprime o desenvolvimento dos ductos Müllerianos, e as células de Leydig secretam os hormônios *insulin-like 3* (INSL3) e testosterona. O INSL3 regula a descida dos testículos a partir da cavidade abdominal e a testosterona induz a diferenciação dos ductos de Wolffian e promove o desenvolvimento da genitália externa e da próstata. A ausência de expressão do *Sry* desencadeia uma série de eventos que culminam com a formação das células granulosas do ovário. As células germinativas primordiais (CGP) aparecem no dia embrionário 6 e passam por diversas migrações até chegarem à crista da gônada em desenvolvimento no 11º dia embrionário (McLaren 1998, Tremblay 2015, Griswold 2016, Wen, Cheng et al. 2016).

No dia embrionário 11,5 a gônada em desenvolvimento já se encontra separada do mesonefro e no dia embrionário 12,5, a determinação sexual está completa e o testículo embrionário formado. Nesse momento, as CGP estão associadas às células de

Sertoli, formando os cordões seminíferos, que se tornarão os túbulos seminíferos no futuro. As CGP estão ativas, em proliferação mitótica, e passam a se chamar proespermatogônias ou gonócitos. Por volta do dia embrionário 14,5 elas começam a entrar em quiescência não proliferativa até o nascimento do camundongo, considerando que a gestação dura de 19 a 21 dias. Entre os dias embrionários 11,5 e 12,5 as CGP sofrem desmetilações em *loci* imprintados que apagam as marcas parentais, e por volta dos dias embrionários 15,5 a 16,5 a metilação é restabelecida. O *imprinting* genômico nesse período (11,5 – 16,5 dias embrionários) é fundamental para a determinação da diferenciação das CGP em células-tronco espermatogoniais (CTE) (Vergouwen, Jacobs et al. 1991, Ohta, Wakayama et al. 2004, Jarvis, Elliott et al. 2005, Griswold 2016).

As células de Sertoli se localizam na periferia dos cordões seminíferos entre os dias embrionários 16 e 20. Do 20º dia embrionário até os primeiros dias pós-natal (DPN), os núcleos se movem em direção ao centro dos túbulos e as células adquirem o formato em gota característico. Por volta do 14º DPN a maioria das células apresentam morfologia adulta, com nucléolo típico. A proliferação das células ocorre principalmente durante o período pré-natal e vai caindo após o nascimento e parece cessar por volta do 14º ao 17º DPN (Vergouwen, Jacobs et al. 1991).

A atividade proliferativa das células de Leydig, ao contrário, é pequena durante o período pré-natal e a primeira semana de vida. As primeiras células maduras são identificadas no 10º DPN e entre os DPN 21 e 31 acontece grande proliferação, com pequena queda subsequente. De fato, as células de Leydig fetais sofrem atrofia gradual enquanto que as células de Leydig adultas começam a se proliferar por volta de 2 a 3 semanas após o nascimento. Curiosamente, as células de Leydig fetais permanecem presentes no testículo adulto, constituindo cerca de 20% da população total de células de Leydig. (Vergouwen, Jacobs et al. 1991, Vergouwen, Huiskamp et al. 1993, Shima, Matsuzaki et al. 2015).

Ao nascimento, as proespermatogônias, ainda em quiescência, se encontram no centro dos túbulos seminíferos. Entre os DPN 1,5 e 3, em um movimento contínuo, algumas reiniciam as mitoses, outras se movem para a base da membrana basal.

Algumas proespermátogônias encontram o nicho de células-tronco para funcionar como CTE e, parece que os DPN 2 a 4 são críticos para a formação de CTE capazes de estabelecer esses nichos. De fato, as primeiras espermatogônias são identificadas no 3º DPN. Outras proespermátogônias podem iniciar diretamente a diferenciação de espermatogônias até o espermatozoide, processo chamado de primeira rodada de espermatogênese (Vergouwen, Jacobs et al. 1991, McLean, Friel et al. 2003, Jarvis, Elliott et al. 2005, Smith and Walker 2014, Griswold 2016).

No animal adulto, cerca de 90% da massa do testículo é representada pelos túbulos seminíferos, formados estruturalmente pelo epitélio seminífero e pela luz. A parede externa de cada túbulo é circundada pelas células peritubulares mioides que, ao se contraírem, ajudam no movimento dos espermatozoides em direção à luz dos túbulos. O epitélio seminífero, por sua vez, é composto pelas células germinativas e pelas células de Sertoli, que se localizam adjacentes à túnica própria, em contato físico com a membrana basal. No espaço intersticial, entre os túbulos, representando os 10% restantes da massa testicular, estão células inflamatórias, vasos sanguíneos e linfáticos, macrófagos, linfócitos e as células de Leydig (produtoras de testosterona), que se difundem para os túbulos seminíferos e para os vasos sanguíneos (**Figura 3**) (Cheng, Wong et al. 2010, Mital, Hinton et al. 2011, Treuting P M, Dintzis S M et al. 2012, Schlatt and Ehmcke 2014, Smith and Walker 2014).

Fonte: (Barret, Barman et al. 2010)

Figura 3 – Estruturas do epitélio seminífero

3.2 Espermatogênese

A espermatogênese é o processo biológico de transformação celular que produz células germinativas haploides masculinas a partir de CTE diploides. É um processo dinâmico e contínuo, que garante que não haja interrupção na produção de espermatozoides durante a vida reprodutiva. Para facilitar o entendimento de tão complexo fenômeno, várias abordagens foram propostas sendo, didaticamente, as mais utilizadas aquela que divide a espermatogênese em estágios (relacionados às associações celulares em cortes seccionais de túbulos seminíferos) e aquela que a divide em fases (de acordo com características fisiológicas dos processos) (Hess and de França 2008, Griswold 2016).

As séries de alterações que ocorrem em um ponto do túbulo seminífero entre o aparecimento sucessivo da mesma associação celular é chamado de ciclo do epitélio seminífero, e o conjunto de todas essas associações ao longo do túbulo seminífero é conhecido como onda do epitélio seminífero. No camundongo, o ciclo do epitélio seminífero dura aproximadamente 35 dias e é composto por XII estágios bem definidos, que podem ser agrupados em 3 categorias: estágios I – V (inicial); estágios VI – VIII (intermediário) e estágios IX – XII (tardio) (**Figura 4**). (Hess and de França 2008, Griswold 2016).

3.2.1 Fases da espermatogênese

Fisiologicamente, a espermatogênese se inicia com as divisões das CTE (mitose), localizadas na membrana basal dos túbulos seminíferos e os clones resultantes passam por processos para redução do material genético (meiose). Em seguida, sucessivas transformações originam o espermatozoide (espermiogênese) que finalmente é liberado na luz dos túbulos seminíferos (espermição) (Cheng and Mruk 2010, Cheng, Wong et al. 2010, Schlatt and Ehmcke 2014, Smith and Walker 2014).

3.2.1.1 Mitose

As CTE, diploides ($2n$), são espermatogônias indiferenciadas. Nos roedores, quatro tipos de espermatogônias estão presentes: espermatogônias indiferenciadas (tipo A sozinha (A_s), tipo A pareadas (A_{pr}) e tipo A alinhadas (A_{al})); espermatogônias diferenciadas (tipo A_1 , tipo A_2 , tipo A_3 e tipo A_4); espermatogônia intermediária (I_n) e espermatogônia tipo B (Hess and de França 2008).

O conjunto de espermatogônias indiferenciadas consiste em células isoladas (A_s) ou cadeias de células conectadas que são formadas por citocineses incompletas (A_{pr} e A_{al}). Essas cadeias podem ser compostas por até 32 células e como estão no caminho para a diferenciação, são consideradas células progenitoras amplificadoras transitórias. Vale ressaltar que para manutenção do conjunto de CTE, parte das espermatogônias indiferenciadas permanecem em constante mitose e parte iniciam o processo de diferenciação. (Hess and de França 2008, Schlatt and Ehmcke 2014, Smith and Walker 2014, Griswold 2016).

As cadeias de espermatogônias, uma vez formadas, iniciam a diferenciação em massa. Primeiro se transformam em espermatogônia A_1 e, depois, por 5 divisões celulares consecutivas formam as espermatogônias A_2 , A_3 , A_4 , I_n e B. Uma mitose final forma 2 espermatócitos pré-leptótenos a partir da espermatogônia tipo B (Smith and Walker 2014, Griswold 2016).

3.2.1.2 Meiose

A presença dos espermatócitos pré-leptótenos na base do compartimento basal representa o início da prófase meiótica, quando o DNA é replicado. Eles se movem pela barreira hemato-testicular (BHT), enquanto se diferenciam em espermatócitos leptótenos e zigótenos, quando há o início do pareamento dos cromossomos homólogos. O pareamento completo se dá nos espermatócitos pacítenos. Quando adentram o compartimento adluminal, eles se diferenciam em espermatócitos diplótenos e entram em diacinese. Em seguida entram,

sequencialmente, em metáfase I, meiose I e meiose II para originar a espermatíde redonda haploide ($1n$) (Hess and de França 2008, Cheng, Wong et al. 2010, Schlatt and Ehmcke 2014, Smith and Walker 2014).

A meiose é um período prolongado da espermatogênese. No camundongo, dura cerca de 14 dias, o que justifica o fato de os espermatócitos estarem presentes em todos os estágios do ciclo do epitélio seminífero. A divisão meiótica em si dura 1 dia e caracteriza o estágio XII, que é encontrado em aproximadamente 10% das secções transversais de túbulos seminíferos (Hess and de França 2008, Cheng, Wong et al. 2010, Smith and Walker 2014).

3.2.1.3 Espermioqênese

A espermioqênese é caracterizada por extensivas alterações, levando a transformação da espermatíde redonda em espermatíde alongada. Essa diferenciação acontece em 4 etapas: Golgi (passos 1 – 3), *capping* (passos 4 – 8), acrossômica (passos 9 – 14) e maturação (passos 15 e 16, **Figura 4**). O complexo de Golgi produz vesículas e grânulos que contêm componentes enzimáticos do sistema acrossômico que irão proteger o núcleo do espermatozoide em formação. A etapa de *capping* ocorre quando o grânulo acrossômico toca o envelope nuclear e a vesícula começa a se achatar como uma pequena capa sobre a superfície nuclear. No final do processo, o acrossomo recobre cerca de 1/3 da superfície nuclear da espermatíde redonda e o núcleo começa a mudar de forma. Na etapa acrossomal ocorre a migração do sistema acrossômico para a superfície ventral do núcleo da espermatíde em alongamento. Finalmente, a etapa de maturação aparece nos estágios III – VIII e apresenta poucas mudanças no formato nuclear e na migração acrossomal. O excesso de citoplasma é removido nos estágios VII – VIII, resultando na formação de lobos citoplasmáticos proeminentes e em corpos residuais que contêm mitocôndrias, ribossomos, lipídios, vesículas e outros componentes citoplasmáticos (Hess and de França 2008, Cheng, Wong et al. 2010, Schlatt and Ehmcke 2014).

3.2.1.4 Espermição

A espermição é um determinante crucial do número de espermatozoides que adentrarão o epidídimo e que, posteriormente, irão compor o ejaculado. É um processo complexo que se inicia no estágio VII, com o alinhamento das espermatídes alongadas no topo do epitélio seminífero, próximo à luz, e se completa no final do estágio VIII quando as espermatídes são liberadas na luz e o citoplasma residual (chamado de corpo residual) é fagocitado pela célula de Sertoli. A partir do momento em que a espermatíde perde contato com a célula de Sertoli, em direção à luz, ela passa a ser denominada de espermatozoide (Cheng, Wong et al. 2010).

Os eventos-chave para esse processo incluem o remodelamento do núcleo e do citoplasma das espermatídes, para originar uma célula mais reduzida; a remoção da especialização ectoplasmática apical e a retração do citoplasma da célula de Sertoli; e a extensão da espermatíde até a luz do túbulo seminífero (O'Donnell, Nicholls et al. 2011).

A ilustração mostra os estágios do ciclo do epitélio seminífero (representados por algarismos romanos). As associações de células germinativas de cada estágio estão separadas por células de Sertoli. As fotos dos núcleos de espermatídes iniciais, intermediárias e tardias estão distribuídas na base da figura. Espermatogônias (A, In, B); espermatócitos (PI: pré-leptóteno; L: leptóteno; Z: zigóteno; P: pacíteno; D: diacinese, Mi: divisão meiótica); espermatídes redondas (1 – 8); espermatídes alongadas (9 – 16)

Fonte: (Hess and de França 2008)

Figura 4 – Estágios do ciclo do epitélio seminífero no camundongo

3.2.2 Barreira hemato-testicular

As células de Sertoli, em resposta à fatores externos, proporcionam um ambiente favorável para a proliferação e diferenciação das células germinativas e, com ajuda das células peritubulares mioides, criam o nicho para as CTE. O citoplasma das células de Sertoli se expande desde a membrana basal até a luz dos túbulos, circundando as células germinativas para fornecer fatores de crescimento e nutrientes durante o curso da espermatogênese. Cada célula tem capacidade para nutrir entre 30 e 50 células germinativas (Cheng and Mruk 2010, Murphy and Richburg 2014, Ramaswamy and Weinbauer 2014, Smith and Walker 2014).

As células de Sertoli adjacentes formam a BHT que marca a divisão do epitélio seminífero em compartimento basal e compartimento adluminal (também chamado apical). Na BHT, as células de Sertoli são unidas por diferentes junções celulares, que formam uma das barreiras hemato-teciduals mais impermeáveis dos mamíferos: as junções oclusivas (*tight junctions*) de actina; a especialização ectoplásmica basal, um tipo de junção aderente atípica, exclusiva dos testículos; as junções comunicantes (*gap junctions*); e os filamentos intermediários de desmossomos. A conformação da BHT garante a restrição no fluxo de íons, proteínas, eletrólitos, açúcares, bem como de outras moléculas através dela. De fato, a função da BHT é segregar os eventos de desenvolvimento das células germinativas da circulação sistêmica para evitar a formação de anticorpos antiesperma sendo, portanto, crucial para conferir privilégio imunológico ao testículo. (Siu and Cheng 2004, Cheng and Mruk 2010, Cheng, Wong et al. 2010, Mital, Hinton et al. 2011, Schlatt and Ehmcke 2014, Smith and Walker 2014, Li, Tang et al. 2016).

A ideia de que a BHT atua como barreira imunológica vem dos fatos de que as células de Sertoli sequestram antígenos das células germinativas e previnem a entrada de leucócitos e anticorpos nos compartimentos basal e adluminal. Entretanto, as espermatogônias e os espermátócitos pré-leptótenos estão localizados fora da BHT e expressam antígenos capazes de estimular resposta imunológica. Ainda, antígenos específicos, expressos apenas pelas células somáticas já foram identificados em

complexos imunológicos no interstício dos túbulos seminíferos, evidenciando a passagem daqueles através da BHT (Mital, Hinton et al. 2011, Li, Tang et al. 2016).

No compartimento basal estão localizadas as CTE e as espermatogônias indiferenciadas. Dessa maneira, as mitoses para manutenção do conjunto de células-tronco e aquelas que diferenciam as espermatogônias até os espermátócitos pré-leptótenos acontecem ali. As meioses I e II, a espermiogênese e a espermição acontecem no compartimento adluminal. Por isso, a BHT está em constante remodelamento, para permitir a travessia dos espermátócitos pré-leptótenos através dela e, também, a entrada de moléculas específicas necessárias ao suporte da meiose e da espermiogênese (Li, Tang et al. 2016).

Diferentemente de todas as outras barreiras hemato-teciduals, as junções oclusivas da BHT, localizadas entre as células de Sertoli adjacentes, são circundadas por filamentos de actina agrupados e microtúbulos, localizados em ambos os lados das células de Sertoli, perpendicularmente à membrana plasmática, e entre as cisternas dos retículos endoplasmáticos e a membrana plasmática. Esses dois grupamentos de filamentos de actina que reforçam e dão suporte às junções oclusivas entre as células de Sertoli, criam uma ultraestrutura única conhecida como especialização ectoplásmica. Pela localização, é chamada de especialização ectoplásmica basal, pois há uma com estrutura semelhante entre as células de Sertoli e as espermátides que é chamada, então, de especialização ectoplásmica apical (Cheng and Mruk 2010, Li, Tang et al. 2016).

Os filamentos de actina presentes nas junções oclusivas também dão suporte às junções comunicantes. Assim, a BHT é composta por junções oclusivas e comunicantes que são amparadas pelos filamentos de actina da especialização ectoplásmica basal (Li, Tang et al. 2016).

Os microfilamentos de actina da especialização ectoplásmica basal conferem força adesiva nas junções entre as células de Sertoli, que também servem como locais de ancoragem para complexos proteicos das junções oclusivas (como ocludina ZO-1), das comunicantes (por exemplo, conexina) e da própria especialização ectoplásmica

basal (como N-caderina- β -catenina). Os microtúbulos, por sua vez, servem de trilhos nas células de Sertoli para o transporte de células germinativas, transporte de fagossomos e transportes intracelulares, como posicionamento de organelas, formato celular, polaridade, divisão celular (Li, Tang et al. 2016).

Tanto os filamentos de actina quanto os microfilamentos passam por extensiva reorganização, que envolve polimerização, despolimerização, estabilização, agrupamento, ramificação, separação para que possam se alterar rapidamente nas células de Sertoli em resposta às alterações do ciclo do epitélio seminífero (Li, Tang et al. 2016).

As alterações que ocorrem nas junções celulares para viabilizar a espermição são coordenadas por um eixo funcional local conhecido como eixo especialização ectoplásmica-BHT-membrana-basal-apical. A laminina da especialização ectoplásmica apical é rompida, possivelmente mediada pela clivagem de MMP2 (matriz metaloproteinase 2), gerando fragmentos de cadeias de laminina que facilitam a espermição (Siu and Cheng 2004, Cheng and Mruk 2010).

A testosterona é fundamental para a integridade da BHT, pois participa da reestruturação da barreira após ruptura das junções celulares. Alguns complexos proteicos presentes na BHT são ocludina-ZO-1, claudina-ZO-1, JAM-A-ZO-1, N-caderina- β -catenina e nectina-afadina (Cheng and Mruk 2010, Cheng, Wong et al. 2010, Lie, Cheng et al. 2013).

3.3. Esteroidogênese

A esteroidogênese, processo de produção de hormônios esteroides ativos, ocorre no córtex adrenal, nos testículos e nos ovários. Nos testículos, é controlada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal – portanto, pelo hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), produzido pelo hipotálamo, e pelo hormônio luteinizante (LH),

produzido pela hipófise. O eixo, por sua vez, é responsivo a *feedback* negativo quando a testosterona atinge concentração suficiente no plasma. (Tremblay 2015, Park, Kumar et al. 2017).

No testículo, a ligação do LH em seus receptores nas células de Leydig aumenta o AMPc intracelular, ativando a via de sinalização da proteína quinase dependente de AMPc (PKA). Como consequência, ocorre a fosforilação de diversas proteínas, como as lipases hormônio-sensíveis que catalisam a hidrólise dos ésteres de colesterol em ácidos graxos e colesterol livre, viabilizando o transporte do colesterol até a mitocôndria (Svechnikov, Izzo et al. 2010, Shimizu-Albergine, Tsai et al. 2012).

Uma vez na mitocôndria, a proteína *steroidogenic acute regulatory* (StAR) facilita a travessia do colesterol da membrana externa para a membrana interna da organela. Ali, ocorre a primeira etapa, limitante, da esteroidogênese, que é a conversão do colesterol à pregnenolona pela enzima *cholesterol side-chain cleavage* do citocromo (P450_{scc}, também chamada de CYP11A). Esse processo envolve 3 reações e tem como produto final a pregnenolona e o isocaproaldeído (Payne and Hales 2004, Svechnikov, Izzo et al. 2010, Miller and Auchus 2011, Manna, Cohen-Tannoudji et al. 2013).

Em seguida, a pregnenolona é transportada até o retículo endoplasmático e sofre uma 17 α -hidroxilação pelo CYP17A1 para originar a 17 α -hidroxipregnenolona ou a progesterona quando pela ação da 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β -HSD). Na sequência, o CYP17A1 ativa a conversão da progesterona em 17 α -hidroxiprogesterona, e esta, em androstenediona (Payne and Hales 2004, Svechnikov, Izzo et al. 2010, Miller and Auchus 2011).

Finalmente, a androstenediona é convertida em testosterona pela ação das 17-hidroxiesteroide desidrogenase 1 e 3 (17HSD1 e 17HSD3) (Payne and Hales 2004, Miller and Auchus 2011, Park, Kumar et al. 2017).

A enzima citocromo P450_{arom} (CYP19A1) atua na aromatização do androgênio em estrógeno. Os estrógenos produzidos pelas células germinativas podem atuar como fatores autócrinos e parácrinos, uma vez que os receptores estrogênicos (ESR1 e

ESR2) são expressos em diferentes tipos de células germinativas e nas células de Sertoli durante a espermatogênese (Culty, Liu et al. 2015).

Uma vez produzida, a testosterona atua como fator parácrino que se difunde entre os túbulos seminíferos. Seus efeitos são mediados via receptor androgênico (AR), localizado no núcleo e no citoplasma das células. As células germinativas não expressam RA. Porém, eles são encontrados nas células de Sertoli, de Leydig e nas peritubulares mioides, no músculo liso das arteríolas e nas células vasculares endoteliais (Cheng and Mruk 2010, Cheng, Wong et al. 2010, Ramaswamy and Weinbauer 2014, Smith and Walker 2014).

No adulto, a quantidade de testosterona no testículo permanece constantemente elevada, assim como a de RA, nas células de Leydig e nas peritubulares mioides, sugerindo que a sinalização do hormônio é constitutivamente ativada nessas células. Porém, a expressão dos RA nas células de Sertoli muda drasticamente, de maneira cíclica, relacionada aos estágios do ciclo do epitélio seminífero (Smith and Walker 2014). A testosterona também exerce efeitos pela via não genômica, sem envolver o RA, ativando a via de sinalização c-Src/ERK1/2 no receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Walker 2009).

3.4. Regulação da espermatogênese e da esteroidogênese

A espermatogênese é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada. O LH juntamente com o hormônio folículo estimulante (FSH) exercem efeitos sobre as células de Sertoli que são cruciais para a progressão da espermatogênese (Cheng and Mruk 2010, Cheng, Wong et al. 2010, Hogarth and Griswold 2010, Schlatt and Ehmcke 2014).

A inibina produzida pelas células de Sertoli, juntamente com a testosterona e o 17- β estradiol, reduzem a secreção de FSH e LH por *feedback* negativo, mantendo

assim, um controle rigoroso da homeostase do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular (Cheng and Mruk 2010, Ramaswamy and Weinbauer 2014, Schlatt and Ehmcke 2014).

O FSH age primariamente na otimização da espermatogênese e no suporte às células germinativas, uma vez que exerce efeitos sobre as células de Sertoli. A testosterona é crucial para a meiose e o desenvolvimento das espermátides. Ambos são importantes para a fertilidade, porém, a falta de FSH ou de seu receptor não são indispensáveis para ela. Na ausência do hormônio ou de seu receptor ocorre uma redução no número de células germinativas, possivelmente como resultado da redução das funções das células de Sertoli. Modelos de camundongo *knockout* para o gene de receptor androgênico (RA) específico para as células de Sertoli (camundongos SCARKO) apresentam alterações na transição da espermátide redonda para espermátide em alongamento. Porém, o desenvolvimento dos espermatócitos e a progressão da meiose não são afetados. Em um estudo, a análise da espermatogênese de camundongos que não expressavam o receptor de FSH mostrou redução de 20 % no número de células germinativas, possivelmente como resultado da incapacidade de progredir durante a meiose I. Assim, parece que o FSH e a testosterona são importantes para a espermatogênese, porém, o início da meiose parece ocorrer de maneira independente deles, evidenciando que a função do androgênio é regular a diferenciação pós-meiótica (De Gendt, Swinnen et al. 2004, Abel, Baker et al. 2008, Cheng and Mruk 2010, Hogarth and Griswold 2010, O'Donnell, Nicholls et al. 2011, Ramaswamy and Weinbauer 2014).

De fato, a ausência de FSH ou de testosterona causa falha na espermição e, na ausência de ambos, o efeito é sinérgico. Um estudo realizado em ratos mostrou que aproximadamente 50 % das espermátides não conseguiram chegar à luz dos túbulos seminíferos, após uma semana de supressão de FSH e androgênio. Há evidências, portanto, de que a supressão hormonal tem efeito nos últimos estágios da espermição, uma vez que os estágios iniciais (ruptura da especialização ectoplásmica apical, remoção do citoplasma da espermátide) não são afetados, sugerindo que a liberação da espermátide possa estar comprometida devido a alterações nos conjuntos

de fibrinas das junções celulares (Saito, O'Donnell et al. 2000, Beardsley and O'Donnell 2003).

O 17- β estradiol, produzido pelas células de Sertoli, de Leydig e germinativas, também é crucial para a espermatogênese, principalmente no tocante à apoptose, inibindo-a. O mecanismo provável seria via receptor acoplado a proteína G 30 e a via de sinalização envolvendo o receptor do EGFR (Sirianni, Chimento et al. 2008). A testosterona participa de maneira fundamental de, pelo menos, 4 processos da espermatogênese: manutenção da BHT, meiose, adesão entre célula de Sertoli e espermátide e espermição (Cheng, Wong et al. 2010, Smith and Walker 2014).

O principal fator extrínseco que faz parte da regulação da espermatogênese é o ácido retinoico (AcRet), fato conhecido desde 1925. O AcRet induz a transição das espermatogônias A em A₁, além de induzir a iniciação da meiose e regular o remodelamento da BHT e a espermição (Lin, Gill et al. 2008, Hogarth and Griswold 2010, O'Donnell, Nicholls et al. 2011, Rossi and Dolci 2013).

A sua ação ocorre via interação com receptores de AcRet (RAR) e com os receptores retinoides X (RXR) nas células-alvo. Ao testículo, chega ligado à proteína ligante de retinol 4 e ao complexo transtirretina, cujo único receptor é o *stimulated by retinoic acid 6 (Stra6)*, expresso nas células de Sertoli. As células germinativas e outras células somáticas do testículo expressam tanto RAR quanto RXR (Griswold 2016).

O AcRet atua na espermatogênese de modo pulsátil, em associação com o *stimulated by retinoic acid 8 (Stra8)*, um transcrito específico das células germinativas, cuja expressão pode ser induzida por ele. Quando isso ocorre, as proteínas STRA8 se acumulam tanto nas espermatogônias quanto nos espermátócitos pré-leptótenos, especialmente nos estágios VIII-XIX do ciclo do epitélio seminífero. Quando da deleção do gene *Stra8*, a meiose é bloqueada no estágio de leptótenos e a transição das espermatogônias A para A₁ é alterada (Anderson, Baltus et al. 2008, Hogarth and Griswold 2010, Hogarth and Griswold 2013).

As citocinas, como *tumor necrosis factor α* (TNF α), *transforming growth factor beta 1, 2 e 3* (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3), juntamente com a testosterona, são

importantes reguladores da função testicular, incluindo a dinâmica das junções celulares. No testículo, o TNF α é produzido por macrófagos intersticiais, espermatídes redonda e alongadas, espermatócitos pacítenos e células de Sertoli e se liga em dois receptores, o TNFR1 e o TNFR2, restritos principalmente às células de Leydig e de Sertoli (a expressão do receptor nas células de Sertoli é induzida pelo FSH). O TNF α regula respostas inflamatórias ao estimular a produção de IL-1 e IL-6, além de induzir a morte celular. Uma vez ligada ao TNFR1, ocorre interação subsequente com a proteína de domínio de morte associada a receptor de TNF α (TRADD) ou com a proteína de domínio de morte associada a Fas (FADD), que leva à ativação de apoptose. Células germinativas que expressam TNFR1 são apoptóticas e o TNF α pode desencadear essa apoptose com sistemas de morte celular locais, como o sistema Fas-Fas ligante. Uma resposta pró-inflamatória, por exemplo proliferação celular, pode ser induzida quando o TNF α se liga ao TNFR1 pela ativação do *nuclear factor-kappaB* (NF- κ B) e possivelmente de p38 MAPK. Além disso, o TNF α é inibidor da esteroidogênese nas células de Leydig através da sinalização de NF- κ B bloqueando a produção proteica ou a expressão de enzimas/proteínas esteroidogênicas, como P450scc, P450c17, 3 β -HSD e StAR (Mauduit, Gasnier et al. 1998, Riccioli, Starace et al. 2000, Pei, Xing et al. 2007, Cheng and Mruk 2010, Lie, Cheng et al. 2013).

No testículo adulto, as TGF β são expressas nas espermatídes redondas, nos espermatócitos pacítenos, nas células de Sertoli, nas células peritubulares mioídes e nas células de Leydig. As TGF- β 2 e - β 3 têm efeito lesivo, porém reversivo, na BHT, especificamente nas junções oclusivas, mediado pela via p38 MAPK (Guazzone, Jacobo et al. 2009).

A apoptose é um processo ativo de morte celular caracterizado por etapas sequenciais de condensação de cromatina, fragmentação e desintegração celular que leva a uma ordenada destruição e eliminação da célula, sem o desencadeamento de resposta inflamatória (Murphy and Richburg 2014).

Histologicamente, ocorre retração do volume celular, alterações na membrana plasmática, condensação de cromatina, vacuolização citoplasmática e lise da célula em fragmentos de membrana, os corpos apoptóticos. Bioquimicamente, a apoptose é

caracterizada por translocação do fosfatidilserina para a parte externa da membrana plasmática, a ativação das vias das caspases e clivagem do DNA em fragmentos de 180-200 pares de bases (Murphy and Richburg 2014).

As células de Sertoli representam apenas cerca de 3% da população de células do testículo adulto e, como sua capacidade de nutrir as células germinativas é limitada, a manutenção do número adequado e constante dessas células é controlada por apoptose. Porém, é válido destacar que sob condições fisiológicas, as taxas de apoptose de células germinativas são baixas (Hai, Hou et al. 2014, Murphy and Richburg 2014).

A morte por apoptose pode ocorrer por 2 vias: a extrínseca, pela ação da superfamília TNF ligando em seus receptores; e a intrínseca, por eventos que resultam na liberação de citocromo c a partir da mitocôndria. Ambas as vias resultam na subsequente ativação das vias das caspases, levando às alterações características do processo apoptótico (Murphy and Richburg 2014).

As células de Sertoli podem ativar a apoptose das células germinativas pela via extrínseca, o que envolve o ligante Fas (FasL). Ao ligar em seu receptor, ocorre a formação do complexo induzível de morte (DISC) e ativação da caspase-8. Em consequência há vacuolização e rompimento da célula de Sertoli juntamente com a apoptose de espermatócitos (Murphy and Richburg 2014).

Apesar de classicamente a apoptose não induzir resposta inflamatória, há evidências de que a lesão direta na célula de Sertoli pode alterar o privilégio imunológico do testículo, pela ruptura da BHT e infiltração de macrófagos (Murphy, Stermer et al. 2014). A apoptose pela via intrínseca é atribuída à indução de Bax/Bcl2, citocromo c e ativação da caspase-9. A indução de agentes pró-apoptóticos dessas vias induz a apoptose de espermatogônias (Murphy and Richburg 2014). O envolvimento da via intrínseca na apoptose de células germinativas induzida pela célula de Sertoli é mínimo, o que reforça a teoria de que essa via é ativada em resposta à lesão direta de um toxicante nas células germinativas (Murphy and Richburg 2014).

4.

*Material Particulado Inalável
Fino ($MP_{2,5}$) e
Implicações na Saúde*

Segundo a OMS, 92% da população em todo o mundo vive em locais em que a qualidade do ar excede os limites estabelecidos pela Organização. Estima-se que cerca de 3 milhões de mortes ao ano são decorrentes da exposição à poluição ao ar ambiente, sendo que 90% dessas mortes ocorrem em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento e 94% são decorrentes, principalmente, de doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, doença pulmonar obstrutiva crônica e câncer de pulmão. As crianças, as mulheres e os idosos são os grupos populacionais mais vulneráveis. Diante disso, a poluição atmosférica já considerada, sozinha, o maior fator de risco ambiental à saúde da população (WHO 2016).

Dentre os constituintes da poluição atmosférica, o $MP_{2,5}$ tem sido considerado o mais nocivo à saúde humana e de outros animais devido à sua capacidade de penetrar no sistema respiratório até os alvéolos pulmonares e alcançar a corrente sanguínea (**Figura 5**) (Schell, Burnitz et al. 2010, Feng, Gao et al. 2016, Kastury, Smith et al. 2017). A via inalatória representa a maior porta de entrada dos poluentes atmosféricos no organismo. Entretanto, é necessário considerar que a ingestão e a absorção dérmica também são vias de exposição (Cosselman, Navas-Acien et al. 2015).

Fonte: (Oberdörster, Oberdörster et al. 2005)

Figura 5 – Estimativas de deposição de partículas inaladas ao longo do trato respiratório

A constituição do MP é variável pois depende de fatores como local de formação (área urbana ou rural) e características climáticas (temperatura, humidade, sazonalidade) entre outros. O potencial toxicológico do MP e, consequentemente, os efeitos deletérios, são determinados pela natureza e concentração, pelas características de solubilidade (hidrofilicidade e hidrofobicidade) e, principalmente, pela capacidade oxidativa de seus constituintes (de Kok, Hogervorst et al. 2005, Feng, Gao et al. 2016, Gautam, Yadav et al. 2016).

Os bioaerossóis (fração biológica do MP_{2,5}) englobando fungos, bactérias, vírus, endotoxinas, fragmentos de pólen, são relacionados ao desencadeamento e agravamento de alergias respiratórias, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e outras doenças do trato respiratório, bem como de lesões agudas pulmonares (Solomon 2002, Adhikari, Reponen et al. 2006, Bowers, Sullivan et al. 2011, Abbing-Karahagopian, van der Gugten et al. 2012).

Compostos orgânicos e metais presentes no MP_{2,5}, são descritos como possíveis causadores de doenças respiratórias e cardiovasculares (Graff, Cascio et al. 2004, Li, Carter et al. 2005, Schlesinger, Kunzli et al. 2006). O cobre e o vanádio foram associados à vasoconstrição da artéria pulmonar em ratos expostos ao MP da cidade de St. Louis, Estados Unidos (Li, Carter et al. 2005). Estudos epidemiológicos mostraram relação entre carbono elementar, carbono orgânico, nitratos, sulfato, níquel, zinco, silício, alumínio, vanádio, cromo, arsênio, cobre e bromo com aumento de admissões hospitalares e mortalidade por doenças respiratórias e cardiovasculares e, também, com baixo peso ao nascimento (Franklin, Koutrakis et al. 2008, Bell, Ebisu et al. 2009, Peng, Bell et al. 2009, Bell, Belanger et al. 2010).

As preocupações relacionadas à exposição aos HPA vêm ganhando importância, pois são compostos persistentes, com potencial de bioacumulação no meio ambiente e já caracterizados como carcinogênicos e mutagênicos. Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), o benzo(a)antraceno, o benzo(a)pireno e o di-benzo(a,h)antraceno são classificados como prováveis carcinógenos para o homem e o naftaleno, o benzo(b)fluoranteno e o benzo(k)fluoranteno são possíveis carcinógenos. A exposição aos HPA é relacionada a cânceres de pele, pulmão e bexiga (Morakinyo,

Mokgobu et al. 2016). Além dos efeitos cancerígenos, há relatos na literatura de piora da asma, eventos trombóticos em pessoas com doenças cardiovasculares, desenvolvimento de diabetes melito, irritação de pele e inflamações, desenvolvimento de catarata, lesão renal e lesão hepática com icterícia associados à exposição aos HPA (Chen, Burnett et al. 2013, Morakinyo, Mokgobu et al. 2016).

4.1 Prováveis mecanismos envolvidos na toxicidade do MP_{2,5}

Na busca pelo entendimento dos mecanismos envolvidos nas ações nocivas do MP_{2,5} algumas propostas constam na literatura e, de maneira geral, apresentam a ativação metabólica, a inflamação e a imunidade, o estresse oxidativo e a toxicidade sobre o material genético como denominadores em comum. Vale ressaltar, porém, que apesar dos avanços, os mecanismos, sobretudo os moleculares, ainda não foram completamente elucidados (Gangamma 2012, Feng, Gao et al. 2016).

O estresse oxidativo é um dos principais mecanismos que parecem estar envolvidos na toxicidade mediada pelo MP, pois vários estudos demonstraram a contribuição do MP_{2,5} para o estresse oxidativo sistêmico, tanto em animais quanto em humanos. A presença de radicais livres, de compostos orgânicos (que podem ser ativados em metabólitos eletrofílicos reagentes, produzindo ou aumentando espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS) intracelular e de metais de transição (ferro, cobre, vanádio, manganês, que podem induzir a formação de ROS) no MP_{2,5}, juntamente com sua capacidade de induzir a geração de mediadores inflamatórios, que também geram ROS e espécies reativas de nitrogênio (*reactive nitrogen species* – RNS), demonstram a suposta relação do particulado em causar estresse oxidativo (Kouassi, Billet et al. 2010, Torres-Ramos, Montoya-Estrada et al. 2011, Gualtieri, Longhin et al. 2012, Longhin, Holme et al. 2013).

Paralelamente, o MP_{2,5} pode reduzir a capacidade antioxidante de células expostas. O fator de transcrição nuclear *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

(Nrf2) é a defesa intracelular primária contra o estresse oxidativo. As ROS geradas pelo MP_{2,5} podem funcionar como sinalizadores moleculares para desencadear a translocação do Nrf2 para o núcleo, resultando em alteração da transcrição de enzimas do sistema antioxidante. De fato, a exposição ao MP_{2,5} já foi associada a alteração de expressão e redução de atividades dessas enzimas, incluindo superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e algumas relacionadas ao sistema glutatona, como glutatona peroxidase (GSH-Px), glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), glutatona redutase (GR), proteína-tirosina fosfatase (PTPase) (Kouassi, Billet et al. 2010, Torres-Ramos, Montoya-Estrada et al. 2011, Deng, Rui et al. 2013, Wang, Zhao et al. 2015).

Em última instância, as ROS causarão danos a células e tecidos ao reagirem com macromoléculas, como lípides, proteínas e DNA, conforme demonstrado em estudos que identificaram marcadores de oxidação proteica (gama-glutamil semialdeído e 2-aminoadípico semialdeído em hemoglobina), de oxidação lipídica (malondialdeído no plasma) (Dergham, Lepers et al. 2012, Wang, Jiang et al. 2013) e de dano oxidativo de DNA (7-hidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina) (Dergham, Lepers et al. 2012, Longhin, Holme et al. 2013). Importante também considerar como contribuintes para os efeitos das ROS, a ativação de diferentes vias de sinalização, como a NF-κB, a ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), a JNK (c-Jun N-terminal kinases) e a p53 (Nam, Choi et al. 2004, Soberanes, Urich et al. 2009).

A ativação de processos inflamatórios parece estar presente em praticamente todos os efeitos nocivos do MP_{2,5}, tendo sido demonstrada tanto em culturas celulares quanto local e sistemicamente em animais e em humanos (Nikasinovic, Just et al. 2006, Dergham, Lepers et al. 2012, Zhao, Gao et al. 2013, Ying, Xu et al. 2014).

Em culturas de células pulmonares humanas, a exposição ao MP_{2,5} ativou vias de sinalização pela superexpressão de genes de receptores de interleucinas 1 e 6 (IL-1R e IL-6R), bem como aumento da proteína quinase associada ao receptor de interleucina-1 (IRAK) (Watterson, Sorensen et al. 2007). Resultados semelhantes foram encontrados em lavados broncoalveolares e em tecidos pulmonares, quando houve aumento de mediadores pró-inflamatórios como IL-6, TNFα, NF-κB em decorrência da exposição ao MP_{2,5} (Davel, Lemos et al. 2012, Xu, Jiang et al. 2013).

Processos inflamatórios sistêmicos desencadeados pelo MP foram confirmados em achados, no sangue, de níveis elevados de proteína C reativa (PCR), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidadas, IL-6, TNF α e *vascular endothelial growth factor* (VEGF), além da ativação da via NF- κ B e aumento da expressão de genes pró-inflamatórios em órgãos como hipotálamo, fígado, coração, rins e baço (Xu, Huang et al. 2008, Xie, Zhang et al. 2013, Xu, Jiang et al. 2013, Ying, Xu et al. 2014).

Além de mutagenicidade, há associação de genotoxicidade relacionada à exposição ao MP_{2,5}. Estudos já demonstraram atividade clastogênica do MP, formação de adutos e dano oxidativo de DNA (de Kok, Hogervorst et al. 2005, Gualtieri, Ovrevik et al. 2011, Longhin, Holme et al. 2013, Lemos, Lemos et al. 2016). Culturas de células alveolares e macrófagos humanos expostos ao MP_{2,5} apresentaram aumento na formação de *8-hydroxy-2'-deoxyguanosine* (8-OHdG) - um marcador de estresse oxidativo do DNA, e de aductos no DNA (Andre, Billet et al. 2011).

Aumentos na fosforilação das proteínas ataxia-telangiectasia mutado (ATM), checkpoint kinase 2 (Chk2) e de variante da histona H2A (H2AX), envolvidos no reparo de dano do DNA, podem desencadear uma série de alterações celulares, especialmente no perfil de expressão de genes, alterando suas funções e destinos (Gualtieri, Ovrevik et al. 2011, Gualtieri, Longhin et al. 2012, Longhin, Holme et al. 2013).

Além de alterações na expressão gênica, as alterações no DNA também podem induzir mecanismos epigenéticos, como alteração na metilação do DNA (Yauk, Polyzos et al. 2008).

A ativação de vias de estresse oxidativo e inflamatórias, bem como o dano ao DNA relacionado ao MP_{2,5} podem acarretar em um resultado final comum: a apoptose. A indução da apoptose pode ocorrer tanto pela via extrínseca (secreção de TNF α e ativação das caspases 8 e 3) quanto pela via intrínseca (liberação de citocromo c e ativação das caspases 9 e 3) (Risom, Moller et al. 2005, Dagher, Garcon et al. 2006, Martin, Fernandez-Alanis et al. 2010).

4.2. Poluição atmosférica e reprodução

Nos últimos anos, vem crescendo o nível de evidência relacionando a poluição atmosférica a desfechos reprodutivos (Sram, Binkova et al. 2005, Slama, Darrow et al. 2008, Veras, Damaceno-Rodrigues et al. 2009, Schell, Burnitz et al. 2010).

Uma coorte realizada na cidade de Teplice (República Tcheca), entre 1994 e 1999, avaliou a fertilidade de casais com relação à exposição ao ar poluído local. Usando modelos de regressão e de ajustes de variáveis, o estudo analisou a probabilidade de ocorrência de gestação em um período de 30 dias após relação sexual sem métodos contraceptivos e encontrou que a cada aumento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ na concentração de $\text{MP}_{2,5}$, havia uma redução na fertilidade de 22% (IC 95% = 6% - 35%) (Slama, Bottagisi et al. 2013).

Outra coorte, realizada com dados de pouco mais de 36.000 enfermeiras de várias cidades dos Estados Unidos, avaliou a relação entre a exposição ao MP e infertilidade. A análise multivariada mostrou que a infertilidade foi associada a morar próximo a uma via com tráfego intenso e aos níveis de $\text{MP}_{2,5-10}$ (Mahalingaiah, Hart et al. 2016).

Em São Paulo, Mohallem et al. (2005) dividiram camundongos com 10 dias de vida em grupos, que foram expostos ou não à poluição atmosférica ambiente por 4 meses. Quando atingiram idade reprodutiva, os camundongos acasalaram e aspectos relacionados à reprodução foram avaliados. Houve um número significativamente menor de filhotes nascidos e maior de falhas na implantação no grupo exposto em comparação com o grupo controle. Porém, não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao número de gestações, de reabsorções, de mortes fetais, de peso do feto e da placenta (Mohallem, de Araujo Lobo et al. 2005).

Estudos epidemiológicos também demonstraram associação entre a exposição materna ao $\text{MP}_{2,5}$ durante a gestação e baixo peso ao nascimento (BPN),

prematuridade e nascimento de bebês pequenos para a idade gestacional (Sun, Luo et al. 2016, Li, Huang et al. 2017).

Um estudo realizado em Los Angeles, Estados Unidos, avaliou a relação entre BPN e a exposição das mães ao $MP_{2,5}$ durante a gestação, por 8 anos. Os 960.945 recém-nascidos avaliados, apresentaram média de peso ao nascimento de $3.390,1 \pm 459,8$ g e 2,33% tinham BPN. As análises de associação com componentes do MP apontaram um aumento de 2,5% no risco de BPN a cada aumento interquartil de $MP_{2,5}$, sendo a gasolina a fonte que apresentou a correlação mais forte, seguido por queima de madeira e cozimento de carne. Dentre os constituintes, o BPN foi associado ao carbono elementar e ao orgânico, potássio, ferro, manganês, níquel, titânio e cobre (Laurent, Hu et al. 2014).

Uma coorte realizada na cidade de Allegheny, nos Estados Unidos, avaliou entre 1997 e 2002 as relações entre a exposição ao MP_{10} , ao $MP_{2,5}$ e ao O_3 e diferentes desfechos no primeiro trimestre gestacional. Com base nos registros de um hospital obstétrico, 34.705 nascimentos foram avaliados e as análises de regressão logística revelaram associação do $MP_{2,5}$ com pré-eclâmpsia, com um OR ajustado de 1,15 (IC 95% = 0,96 – 1,39) para cada aumento de $4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $MP_{2,5}$; com hipertensão gestacional (OR = 1,1, IC 95% = 1,00 – 1,23) e com prematuridade (OR = 1,10, IC 95% = 1,01 – 1,20) (Lee, Roberts et al. 2013).

A prematuridade e o BPN podem ocorrer como consequência do estresse oxidativo e da inflamação causada pelo MP, mediados por alterações de coagulação, de função endotelial e de processos hemodinâmicos. De fato, a avaliação de biomarcadores em gestantes expostas à poluição atmosférica mostrou que esses processos podem resultar em desregulação endócrina, aumento de susceptibilidade materna à infecções e inflamação e alterações placentárias, incluindo disfunções mitocondriais (Kannan, Misra et al. 2006, Shah, Balkhair et al. 2011, van den Hooven, Pierik et al. 2012, Janssen, Byun et al. 2015, Zhu, Liu et al. 2015).

No estudo realizado por Veras et al. (2009) foram avaliados e comparados parâmetros relacionados à reprodução na geração 2 de fêmeas de camundongos

expostos à poluição atmosférica de São Paulo sob influência da exposição pré-natal (grupo exposto) ou não (grupo controle). Foi observado um aumento significativo no ciclo estral das fêmeas expostas, devido ao prolongamento na duração do estro, com consequente redução do número de ciclos nas fêmeas expostas, em comparação com as fêmeas do grupo controle, bem como uma diminuição significativa no número de folículos antrais nos animais expostos. Os folículos antrais representam o último estágio do desenvolvimento folicular antes da ovulação e são o único tipo de folículo capaz de liberar um oócito para fertilização e de produzir estrógeno. Além disso, o tempo para acasalamento entre os casais do grupo exposto foi significativamente maior ($10,65 \pm 5,77$ dias) que o tempo do grupo não exposto ($3,5 \pm 1,54$ dias) ($p=0,0001$), e os índices de fertilidade e de gravidez foram significativamente menores nas fêmeas expostas do que nas não expostas (95% vs 55%; $p=0,003$ para ambos os desfechos). Os autores relataram ainda um aumento significativo na média de perdas pós-implantação para o grupo das fêmeas expostas nos períodos pré- e pós-natal quando comparado às não expostas em momento algum ($12,1 \pm 5,8$ vs $41,7 \pm 5,8$). Porém, não houve diferenças significativas entre os grupos em relação ao nº de fetos vivos por ninhada, nº de fetos mortos por ninhada, taxa de implantação e perda pré-implantação (Veras, Damaceno-Rodrigues et al. 2009).

Carlsen et al. (1992) publicaram uma metanálise que analisou resultados relacionados ao sêmen de humanos de artigos publicados entre 1938 e 1991. Dados de quase 15.000 indivíduos foram analisados. A análise de regressão linear evidenciou redução significativa na contagem de esperma, de 113×10^6 mL em 1940 para 66×10^6 em 1990 e, também, redução significativa no volume seminal, de 3,40 mL para 2,75 mL (Carlsen, Giwercman et al. 1992). Paralelamente, o aumento na incidência de câncer testicular e anomalias congênitas em genitais masculinos, associado ao fato de que todas essas alterações ocorreram em um curto espaço de tempo, sugeriam que fatores ambientais podiam estar envolvidos na gênese desses problemas (al-Sudairy and Howard 1992, Sharpe and Skakkebaek 1993, Fisch, Ikeguchi et al. 1996).

Um estudo realizado na Polônia com 327 homens, com média de idade de $32,3 \pm 4,4$ anos e concentrações normais de sêmen avaliou os efeitos da exposição a

componentes da poluição atmosférica ($MP_{2,5}$, MP_{10} , CO, SO_2 , NO_x). A análise multivariada ajustada para fatores como idade, tabagismo, doenças prévias, tempo de abstinência sexual, revelou que a exposição a todos os poluentes atmosféricos avaliados aumentou as anormalidades na morfologia do espermatozoide. Além disso, concentrações de $MP_{2,5}$, MP_{10} , CO e NO_x foram negativamente associadas aos valores de testosterona. As frações de MP consideradas foram positivamente associadas à presença de espermatozoide imaturo com condensação incompleta de cromatina. Especificamente o $MP_{2,5}$ apresentou associação positiva com anomalias morfológicas no espermatozoide e condensação incompleta de cromatina (Radwan, Jurewicz et al. 2016).

Estudos experimentais demonstraram alterações na qualidade do espermatozoide relacionadas à poluição atmosférica, que vão desde redução na produção total diária de sêmen a alterações nas características do sêmen (concentração, motilidade e morfologia) (Yoshida, Sagai et al. 1999, Watanabe 2005, Jeng and Yu 2008, Hammoud, Carrell et al. 2010).

A análise do sêmen de camundongos expostos à poluição atmosférica de uma cidade do Canadá mostrou aumento significativo de quebras de DNA dos camundongos que haviam sido expostos ao ar ambiente em comparação com o grupo controle, possivelmente causado pelo estresse oxidativo relacionado aos constituintes da poluição. A hipermetilação do DNA no sêmen dos animais expostos também foi observada e, vale destacar, que essa situação permaneceu quando da análise após cessação da exposição ao poluente, 6 semanas depois. Ainda, a frequência de mutações encontradas no sêmen dos animais expostos foi 1,6 vezes maior que a observada no sêmen dos animais não expostos, sugestivo de que as mutações teriam origem na linhagem das células germinativas (Yauk, Polyzos et al. 2008).

Somers et al. (2002) mantiveram camundongos (machos e fêmeas) por 10 semanas em ar ambiente perto (1 quilômetro) de siderúrgicas e avaliaram alterações no DNA das proles em amostras de tecidos coletados da cauda dos animais quando eles tinham 5 dias de vida. Esses filhotes apresentaram uma frequência 1,5 a 2 vezes maior de mutações hereditárias nos *loci* de DNA com repetições em tandem do que os filhotes dos animais mantidos em ambiente rural (a 30 quilômetros das siderúrgicas).

Esse aumento significativo foi devido, especialmente, a mutações herdadas da linhagem germinativa paterna. Vale ressaltar que as maiores taxas de mutação foram observadas nos machos das proles e aquelas das fêmeas não foram estatisticamente significativas. (Somers, Yauk et al. 2002). Com o intuito de identificar os agentes causadores e potenciais abordagens para redução do risco de mutações, esse mesmo grupo de pesquisadores expôs um novo grupo de camundongos por 10 semanas no mesmo local perto das siderúrgicas, porém, o grupo controle, desta vez, foi mantido em câmaras com sistema de filtragem do ar com filtros *high-efficiency particulate-air* (HEPA), capazes de remover até 99,99% de partículas com menos de 0,1 µm de diâmetro. A prole dos animais expostos ao ambiente industrial apresentou mutações de origem paterna nos *loci* de DNA com repetições simples expandidas em tandem (*expanded simple tandem repeat* – *ESTR*) em uma frequência 1,9 a 2,1 maior do que as proles do grupo controle. De fato, as proles dos animais mantidos em sistema com filtragem HEPA apresentaram taxas de mutações paternas 52% menores que as proles dos animais expostos ao ambiente industrial. Corroborando os achados do estudo de 2002, as taxas de mutações de origem materna não diferiram significativamente entre os grupos. Considerando que os filtros HEPA não afetam substâncias em estado gasoso, os autores do estudo sugeriram a possibilidade de que substâncias presentes no material particulado (por exemplo HPA e metais) do ar ambiente, tenham sido os responsáveis pelas alterações encontradas (Somers, McCarry et al. 2004).

Especificamente em São Paulo, estudos experimentais também demonstraram efeitos nocivos da poluição do ar da cidade em desfechos reprodutivos de animais machos (Lichtenfels, Gomes et al. 2007, Pires, de Melo et al. 2011).

Lichtenfels et al. (2007) expuseram camundongos machos à poluição atmosférica por 4 meses, desde os 10 dias de vida e, ao atingirem idade reprodutiva, acasalaram com fêmeas não expostas à poluição. Após acasalarem, os machos foram eutanasiados para avaliação de desfechos relacionados ao sistema reprodutivo e à prole. Houve diferença significativa entre a proporção de macho:fêmea nascidos na prole do grupo exposto em comparação com a do grupo controle ($p=0,041$), pela redução do número de machos nascidos no grupo exposto à poluição. Ainda, análises

histológicas dos testículos mostraram reduções significativas no número de células germinativas e de espermatídes alongadas, e também, uma redução na concentração de esperma na porção caudal do epidídimo nos animais expostos em comparação aos não expostos (Lichtenfels, Gomes et al. 2007).

5.

Justificativa

A poluição atmosférica é importante problema de saúde pública em todo o mundo. Nos últimos anos, cientistas e agências governamentais vêm, cada vez mais, unindo esforços para conhecer os impactos nocivos da poluição atmosférica na vida de animais e de seres humanos, do meio ambiente como um todo.

Do que se conhecia há décadas como constituintes da poluição atmosférica, ao ozônio, ao monóxido de carbono, ao dióxido de enxofre e aos óxidos de nitrogênio, foram adicionados os metais, os compostos orgânicos voláteis, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Depois, o modo como esses elementos interagem entre si, suas características físico-químicas e seu potencial reativo começaram a ser caracterizados. O material particulado, então, é uma mistura complexa de diversos elementos em estados gasoso e sólido, de massas moleculares e tamanhos variáveis. Atualmente, sabe-se que as menores partículas, aquelas com diâmetro aerodinâmico menor que 2,5 micrômetros são as mais implicadas em efeitos deletérios aos seres vivos e que esses efeitos diferem de acordo com a composição da poluição.

Pois, considerando ser a via inalatória a principal porta de entrada do material particulado no organismo, nada mais óbvio que buscar a elucidação de como ocorre a interação deste com aquele tenha se tornado objeto de interesse inicial da comunidade científica na caminhada pela descoberta dos impactos da poluição do ar na saúde de animais e humanos.

Pela estreita relação fisiológica que guarda com o sistema respiratório, logo os estudos alcançaram o sistema cardiovascular. As relações de causa e efeito entre a exposição à poluição atmosférica e o desencadeamento de asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, câncer de pulmão, hipertensão arterial, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, entre outras, estão bem documentados na literatura (Kelly and Fussell 2015, Peixoto, de Oliveira Galvao et al. 2017).

Há de se considerar, neste momento, o dinamismo das investigações científicas em um mundo globalizado. Nas duas últimas décadas o número de publicações relacionadas à poluição atmosférica aumentou consideravelmente. Em 1996, foram indexados, no Pubmed, 942 artigos com o termo '*air pollution*'. Em 2016, eles

totalizaram 3.360, cerca de 3,5 vezes mais. Associações entre poluição e obesidade, diabetes melito, disfunções tireoidianas, autismo, alterações cognitivas, cânceres, prematuridade, baixo peso ao nascimento, anomalias congênitas e alterações reprodutivas, entre outras, estão descritas na literatura, porém, ainda sem mecanismos totalmente elucidados (Eze, Schaffner et al. 2014, Zhu, Liu et al. 2015, Peixoto, de Oliveira Galvao et al. 2017).

Considerando as evidências relacionadas às alterações na capacidade reprodutiva masculina relacionadas à exposição ao material particulado e, ainda, que o perfil de toxicidade desse poluente é variável, este estudo se justifica ao contribuir para o preenchimento de uma lacuna existente entre a causa e os efeitos já observados, especificamente na cidade de São Paulo: os mecanismos moleculares envolvidos nesses processos.

Diante do exposto, os mecanismos esperados para os possíveis efeitos nocivos da exposição ao material particulado envolvem ativação de vias inflamatórias e de estresse oxidativo, o que acarretaria em alteração da expressão de genes relacionados à espermatogênese e à esteroidogênese, com possível aumento de apoptose de células testiculares.

6.

Objetivos

Uma vez que a exposição aos poluentes da atmosfera se inicia no período intrauterino, com a exposição materna ao ar poluído, torna-se importante conhecer se há diferenças nos efeitos causados pela exposição ao material particulado desde a gestação ou apenas após o nascimento.

6.1 Objetivo geral

Avaliar, em diferentes cenários, os efeitos da exposição ao $MP_{2,5}$ na função testicular de camundongos.

6.2 Objetivos específicos

Analisar nos testículos dos camundongos:

- ⇒ parâmetros relacionados à morfometria dos componentes estruturais e à espermatogênese;
- ⇒ perfil de expressão gênica;

7. *Métodos*

Este estudo foi realizado em parceria com o Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE - LIM 05) e com o Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM 25), ambos da FMUSP.

Foi realizado um estudo experimental, prospectivo e não randomizado, no período compreendido entre maio de 2014 e outubro de 2015.

7.1 Ética

O Protocolo de Pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMUSP em 08/04/2015, sob o número 026/15.

O estudo utilizou material coletado do projeto “Efeitos da exposição ao material particulado concentrado: estudo dos mecanismos placentários envolvidos no comprometimento do ganho de peso fetal e suas implicações sobre a saúde na vida adulta”, aprovado pela CEUA em 11/04/2012, sob o número 023/12.

7.2 Animais

Os animais utilizados no estudo – camundongos BALB/c isogênicos – eram provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da FMUSP, que segue as normas do *Guide for the care and use of laboratory animals* (Garber 2011) e os princípios éticos da legislação brasileira, segundo a Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (MCTI 2013, MCTI 2015).

Durante o estudo, os animais foram mantidos nesse mesmo biotério, onde há circulação de ar filtrado. Os camundongos permaneceram em gaiolas dispostas em

estantes que permitiam a passagem de ar, com ração e água disponíveis *ad libitum* e sob ciclo luz/escuro de 12hs/12 hs.

Quando atingiram os 90 dias de idade, os camundongos machos foram sacrificados, seguindo recomendações do painel de eutanásia da *American Veterinary Medical Association* (AVMA 2013). Para tal, os animais foram submetidos (individualmente, em caixa hermeticamente fechada) à exposição a solução de isoflurano 100 % (Cristália® Produtos Farmacêuticos Ltda) embebida em algodão, ocasionando inalação de superdosagem da substância e consequente óbito, após sedação.

7.3 Protocolo de exposição ao MP_{2,5}

Os camundongos machos e fêmeas, após atingirem maturidade sexual (por volta de 60 dias de vida), foram colocados para acasalar, com cerca de 5-6 fêmeas por macho. Após confirmação da gestação iniciou-se o protocolo de exposição.

A exposição aconteceu em diferentes cenários, caracterizados pelo período em que houve a exposição ao ar filtrado (AF) e/ou ao ar não filtrado (ANF), ou seja, ao MP_{2,5}. Dessa maneira, 4 grupos foram formados:

- ⇒ o **Grupo Controle (GC)**, dos animais que não foram expostos ao MP_{2,5}, ou seja, receberam AF durante o período pré-natal e do período pós-desmame até a idade adulta;
- ⇒ o **Grupo Pós-Desmame (GPD)**, dos animais que receberam AF durante o período pré-natal e receberam ANF durante o período pós-desmame até a idade adulta;
- ⇒ o **Grupo Pré-Natal (GPN)**, dos animais que receberam ANF durante o período pré-natal e receberam AF durante o período pós-desmame até a idade adulta; e

⇒ o **Grupo Pré-Natal e Pós-Desmame (GPNDP)**, dos animais que receberam ANF tanto no período pré-natal quanto no período pós-desmame até a idade adulta (**Figura 6**).

	Fecundação	Nascimento	Desmame	Eutanásia
Grupo	Exposição materna	Amamentação	Exposição prole	
Controle (GC)				
Pós-desmame (GPD)				
Pré-natal (GPN)				
Pré-natal e Pós-desmame (GPNDP)				
	DG 1,5	DG 18,5	DPN 21	DPN 90

DG = dia gestacional; DPN = dia pós-natal; área branca = ar filtrado; área hachurada = ar não filtrado

Figura 6 – Protocolo de exposição dos grupos ao MP_{2,5}

A opção pela não exposição dos animais durante o período pós-natal, compreendido entre o dia do nascimento e o dia do desmame (cerca de 21 dias) foi pautada em princípios de bioética. Esse é um período em que as mães, estão atentas e em total estado de atenção para minimizar e evitar a ocorrência de contratempos em um período crítico para a sobrevivência da prole. Os filhotes ficam juntos às mães todo o tempo e ao primeiro sinal de ameaça, a mãe reage, podendo atacá-los e até matá-los.

7.4 Exposição ao MP_{2,5}

Os animais foram expostos ao MP_{2,5} na concentração de 600 µg/m³, equivalente à média que um indivíduo respira em 24 hs na cidade de São Paulo. Para exposição à dose precisa de MP_{2,5} foi utilizado um Concentrador de Partículas Ambientais (CPA) que encontra-se montado em uma unidade móvel próximo ao Instituto Oscar Freire, a poucos metros das avenidas Teodoro Sampaio e Dr. Arnaldo,

vias de tráfego intenso da cidade de São Paulo (**Figuras 7 e 8**) (Lemos and Silveira , LPAE 2009).

Fonte: <https://www.google.com.br/maps/place/Instituto+Oscar+Freire>

Figura 7 – Vista aérea da localização do CPA

Na parte superior observa-se a Cabeça Anderson, equipamento através do qual o ar entra no CPA selecionando o diâmetro aerodinâmico das partículas em $2,5\mu\text{m}$

Fonte: <http://www.inaira.org/br/intoxicacao/concentrador.shtml>

Figura 8 – Unidade móvel que abriga o CPA

O CPA foi desenvolvido pela Escola de Saúde Pública da Universidade de Harvard em 1995. Utilizando a tecnologia de impactadores virtuais, o propósito do equipamento é aumentar a concentração das partículas de diâmetro aerodinâmico $\leq 2,5 \mu\text{m}$ presentes na atmosfera (Lawrence, Wolfson et al. 2004, INAIRA 2009).

Cada impactador virtual consiste em um acelerador de vazão que dirige o fluxo de ar na direção de uma passagem estreita e previamente calibrada, enquanto um vácuo de alta intensidade é aplicado perpendicularmente ao fluxo. Dessa maneira, grande parte da porção gasosa do fluxo é removido, enquanto o material particulado fino inalável passa pelo equipamento e é coletado. O equipamento é composto por três conjuntos de impactadores virtuais instalados em série, possibilitando que a vazão de ar captada de 5000 L/min seja reduzida a cerca de 40 L/min. Como esse processo ocorre sem contato do ar com peças móveis e em frações de segundos, não há tempo suficiente para que as características físico-químicas do MP sejam alteradas (Lawrence, Wolfson et al. 2004, INAIRA 2009) (**Figura 9**).

Fonte: <http://www.inaira.org/br/intoxicacao/concentrador.shtml>

Figura 9 - Área interna do CPA mostrando as câmaras de exposição e o sistema de tubulações por onde o ar ambiente entra

O MP coletado pelos impactadores chega a uma câmara onde os animais são expostos e, ao mesmo tempo, e sob as mesmas condições de pressão, fluxo temperatura e umidade relativa, outra câmara disposta paralelamente é alimentada com ar filtrado para a exposição dos animais do grupo controle (**Figura 10**).

Fonte: <http://www.inaira.org/br/intoxicacao/concentrador.shtml>

Figura 10 - Área interna do CPA mostrando as câmaras de exposição ao ar filtrado e ao ar não filtrado

Durante o período de exposição, os animais foram levados diariamente em suas gaiolas de moradia até o CPA e permaneceram nas câmaras o tempo necessário para que fossem expostos à dose de $600 \mu\text{g}/\text{m}^3$, considerando variações de concentração do material particulado na atmosfera devido a condições climáticas (**Figura 11**).

Fonte: arquivo próprio

Figura 11 – Animais sendo expostos ao MP 2,5

7.5 Caracterização da composição do MP_{2,5}

Para caracterização dos componentes do MP foram expostos, semanalmente, 2 filtros de polycarbonato para amostragem e posteriores quantificações. As análises foram realizadas no Laboratório de Análise dos Processos Atmosféricos (LAPAT) do Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da USP, sob coordenação da Profa. Maria de Fátima de Andrade.

Ainda, amostras de filtros de quartzo, de 47 mm de diâmetro, foram utilizadas para a dosagem de HPA após exposição ao MP_{2,5} por 2 hs. Os HPA dosados foram o pireno, o benzo(a)acefenantrileno, o benzo(k)fluoranteno e o benzo(a)pireno.

7.6 Parâmetros analisados

Momentos após a eutanásia, as gônadas foram extraídas e os testículos direitos foram conservados em solução de formaldeído a 4% por 24 hs e depois, transferidos para fixação em solução de álcool etílico a 70%. Após a fixação, os testículos foram desidratadas em passagens por soluções de concentrações crescentes de álcool etílico (80%, 90%, 95% e 100%), diafanizados em xilol e incluídos em parafina para posterior análise dos parâmetros morfométricos e histológicos.

Os testículos esquerdos foram armazenados em nitrogênio líquido até o momento da realização dos procedimentos de análise de expressão gênica.

7.6.1 *Peso corporal*

Os camundongos foram pesados aos 90 dias de vida, em balança analítica. Com os pesos individuais, a média dos grupos foi calculada.

7.6.2 Peso do testículo

Os testículos foram pesados individualmente, após a fixação em solução de álcool etílico a 70%. Com os pesos de cada órgão, calculou-se as médias para cada grupo.

7.6.3 Peso do epidídimo

Os epidídimos foram coletados juntamente com os testículos, momentos após a eutanásia. Foram conservados em solução de formaldeído a 4% por 24 hs e depois transferidos para fixação em solução de álcool etílico a 70%. Após a fixação, os epidídimos direitos foram pesados individualmente e os valores agrupados para posterior análise estatística de comparação entre os grupos.

7.6.4 Índice gonadossomático

O índice gonadossomático (IGS) é a relação de peso entre a gônada e o corpo do animal, ou seja, indica a representatividade do testículo no corpo do animal. É calculado pela relação entre o peso do testículo (g) e o peso do animal (g), expresso em porcentagem, conforme a Fórmula (1).

$$\text{IGS} = \frac{\text{peso}_{\text{testículo}}}{\text{peso}_{\text{corporal}}} \times 100 \quad (1)$$

7.6.5 Volume do testículo

O volume dos testículos (V_{test} , cm^3) foi calculado usando o valor do peso do órgão (g) e considerando uma densidade do tecido de $1,04 \text{ g/cm}^3$, conforme a Fórmula (2) (Noorafshan 2014).

$$V_{\text{test}} = \frac{\text{peso}_{\text{testículo}}}{\text{densidade}_{\text{testículo}}} \quad (2)$$

7.6.6 Parâmetros morfométricos

A estereologia é uma ciência matemática baseada em estatística e geometria que permite a obtenção de informações quantitativas de estruturas microscópicas tridimensionais a partir de observações em imagens de cortes histológicos bidimensionais. Assim, medidas de volume, superfície, área, comprimento e número de objetos podem ser estimadas com a aplicação de métodos estereológicos (Gundersen HJG, Bendtsen TF et al. 1988, Boyce RW, Dorph-Petersen KA et al. 2010, West MJ 2012).

As análises em estereologia envolvem duas etapas. Primeiro, são aplicados princípios estatísticos para calcular a quantidade de amostras histológicas que são representativas do órgão a ser analisado, com o intuito de reduzir a quantidade de tecido utilizado na análise, sem que haja perda de precisão das estimativas que serão feitas. Em seguida, a partir da sobreposição de um sistema - teste em imagens do órgão em análise, estima-se a medida desejada, com cálculos que utilizam o número de interações do sistema - teste com a estrutura em análise (Boyce RW, Dorph-Petersen KA et al. 2010).

Para análise dos testículos, os blocos de parafina foram cortados em fatias de 5 µm de espessura. Foi adotado como referência, o eixo vertical do órgão (sentido longitudinal), para guardar relação com a posição anatômica das gônadas no eixo crânio - caudal do animal (**Figura 12**). Em lâminas de vidro, foram coletadas 3 fatias de cortes transversais (perpendiculares ao eixo vertical) seriados, em intervalos de 135 µm de distância, a partir de um ponto inicial aleatório. Em seguida, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) conforme o protocolo descrito na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Protocolo de coloração das lâminas com hematoxilina e eosina

Solução	Duração
xilol I	1,5 min
xilol II	1,5 min
álcool 100%	3 min
álcool 100%	3 min
álcool 95%	3 min
álcool 70%	3 min
água corrente	10 min
hematoxilina	2 min
água corrente	10 min
eosina	15 seg
álcool 95%	uma imersão, 2 vezes
álcool 100%	uma imersão, 2 vezes
álcool 100%	uma imersão, 2 vezes
xilol álcool	1 min
xilol I	2 min
xilol II	2 min

a. A seta indica a localização anatômica do testículo direito. Observa-se ausência do testículo esquerdo, já coletado e armazenado em nitrogênio líquido; **b.** Detalhe em aumento do testículo mostrando o eixo vertical

Figura 12 – Animal após eutanásia, durante procedimentos para coleta dos órgãos

Após secagem da coloração e da colagem das lamínulas, as lâminas foram escaneadas. Utilizando o programa Panoramic Viewer (3DHISTECH 2005), foram fotografados 10 campos aleatórios de cada lâmina, em aumento de 20 x. Com essas imagens, utilizando o programa ImageJ (ImageJ 1997), foi aplicado o sistema-teste Grid Cycloid Arc e realizada a contagem dos pontos (P) incidentes sobre as estruturas ($P_{\text{estruturas}}$) epitélio seminífero ($P_{\text{epitélio}}$); luz do túbulo seminífero ($P_{\text{lúmen}}$) e espaço intersticial ($P_{\text{interstício}}$), além da contagem das intersecções das superfícies dos túbulos seminíferos com os arcos cicloides do sistema-teste ($I_{\text{túbulos}}$) (**Figura 13**). Para garantir a confiabilidade dos resultados, todas as contagens foram realizadas de maneira cega, sem que se conhecesse qual amostra estava sendo analisada.

Figura 13 – Tela do programa ImageJ mostrando sistema-teste

7.6.6.1 Volumes das estruturas do testículo

A partir da contagem dos pontos, a fração de volume (V_v) de cada estrutura (epitélio seminífero, luz do túbulo seminífero e interstício) foi calculada, conforme a Fórmula **(3)** (Veras 2008).

$$Vv_{\text{estrutura}} = \frac{\Sigma P_{\text{estrutura}}}{\Sigma P_{\text{órgão}}} \quad (3)$$

onde $\Sigma P_{\text{estrutura}}$ é a soma dos pontos incidentes sobre a estrutura em análise e $\Sigma P_{\text{testículo}}$ é a soma dos pontos incidentes sobre o órgão em análise, neste caso, o testículo

O volume total (V_t) de cada estrutura do testículo foi calculado multiplicando-se a fração de volume pelo volume do testículo correspondente (**Fórmula (4)**) (Veras 2008).

$$V_{\text{testículo}} = Vv_{\text{estrutura}} \times V_{\text{test}} \quad (4)$$

onde $Vv_{\text{estrutura}}$ é a fração de volume da estrutura e V_{test} é o volume do testículo

7.6.6.2 Área de superfície dos túbulos seminíferos

As intersecções dos arcos cicloides do sistema-teste com a superfície dos túbulos seminíferos ($I_{\text{túbulos}}$) foram usadas para calcular a densidade de superfície (S_v) dos túbulos seminíferos usando a Fórmula (**5**) (Veras 2008).

$$Sv_{\text{túbulo}} = \frac{2 \times \Sigma I_{\text{túbulos}}}{(l/p) \times \Sigma P_{\text{órgão}}} \quad (5)$$

onde $\Sigma I_{\text{túbulos}}$ é a soma das intersecções dos arcos cicloides com a superfície dos túbulos seminíferos; l/p é o comprimento da linha-teste ($34,72 \mu\text{m}$); $\Sigma P_{\text{órgão}}$ é a soma dos pontos incidentes sobre o órgão em análise, neste caso, o testículo

A partir da densidade de superfície dos túbulos seminíferos, a área de superfície absoluta (S_t) dos túbulos seminíferos foi calculada, em função do volume dos testículos correspondentes (**Fórmula (6)**) (Veras 2008).

$$St_{\text{túbulo}} = Sv_{\text{túbulo}} \times V_{\text{test}}$$

(6)

onde $Sv_{\text{túbulo}}$ é a densidade de superfície dos túbulos seminíferos e V_{test} é o volume do testículo

7.6.6.3 Área seccional dos túbulos seminíferos

A área seccional dos túbulos seminíferos foi calculada a partir da Fórmula (7) (Veras, Guimaraes-Silva et al. 2012).

$$\text{Área seccional}_{\text{túbulo}} = (a/p) \times (\Sigma P_{\text{epitélio}} + \Sigma P_{\text{luz}})$$

(7)

onde a/p corresponde à área associada a cada ponto do sistema-teste ($4725 \mu m^2$); $\Sigma P_{\text{epitélio}}$ e ΣP_{luz} é a soma dos pontos incidentes sobre o epitélio seminífero e sobre a luz do túbulo seminífero, respectivamente

7.6.6.4 Diâmetro dos túbulos seminíferos

O diâmetro dos túbulos seminíferos foi calculado pela Fórmula (8), considerando sua relação com os volumes do epitélio seminífero e da luz dos túbulos seminíferos (Veras 2008).

$$\text{Diâmetro}_{\text{túbulo}} = \frac{4 \times (V_{\text{epitélio}} + V_{\text{luz}})}{St_{\text{túbulo}}}$$

(8)

onde $V_{\text{epitélio}}$ é o volume do epitélio seminífero, V_{luz} é o volume do luzdo túbulo seminífero e $St_{\text{túbulo}}$ é a superfície absoluta dos túbulos seminíferos

7.6.7 Análise histológica do testículo

A avaliação histológica foi realizada pelo método de contagem de pontuação em biópsia testicular, o Escore de Johnsen. No trabalho publicado em 1970, Svend

Johnsen descreve como realizou biópsias utilizando o seu método de avaliação da espermatogênese, que se baseia em atribuir uma pontuação, de 10 a 1, para cada corte de túbulo seminífero analisado, de acordo com a presença ou ausência de células e o modo como estão organizadas em relação ao processo de espermatogênese (detalhes na **Tabela 3**). Após análise de 352 biópsias (de 17 homens normais e de 335 pacientes com todas as formas de hipogonadismo), os resultados mostraram forte associação entre o método de contagem proposto e a contagem de esperma, além de apontar, que pela primeira vez, havia a possibilidade de se correlacionar condições endócrinas com o estado funcional do tecido testicular (Johnsen 1970).

Tabela 3 – Descrição do Escore de Johnsen

Pontuação	Descrição
10	Espermatogênese completa com muitos espermatozoides. Epitélio germinativo organizado, com espessura regular e luz aberta.
9	Muitos espermatozoides. Epitélio germinativo desorganizado com evidente descolamento ou obliteração do lúmen.
8	Apenas alguns espermatozoides (< 5-10)
7	Ausência de espermatozoides. Presença de muitas espermátides.
6	Ausência de espermatozoides. Presença de algumas espermátides (< 5-10).
5	Ausência de espermatozoides e de espermátides. Presença de muitos espermatócitos.
4	Ausência de espermatozoides e de espermátides. Presença de alguns espermatócitos (< 5).
3	Presença apenas de espermatogônias.
2	Ausência de células germinativas. Presença de células de Sertoli
1	Ausência de células

Fonte: (Johnsen 1970)

As mesmas imagens utilizadas para avaliação dos parâmetros morfométricos foram usadas para aplicação do Escore de Johnsen. Para tal, usando o programa Panoramic Viewer (3DHISTECH 2005), 100 túbulos seminíferos foram analisados em

cortes transversais e aumento de 20 x alternado com aumentos maiores (até 40 x) quando necessário. Para cada amostra analisada, foi registrada a frequência de pontuação para cada escore (de 10 a 1). Em seguida, a média da pontuação de cada amostra foi calculada com base no número total de túbulos analisados (Fórmula (9)). A partir das médias de pontuação individuais, calculou-se a média por grupo.

Johnsen's	$(10 \times f_{10}) + (9 \times f_9) + (8 \times f_8) + (7 \times f_7) + (6 \times f_6) + (5 \times f_5) + (4 \times f_4) + (3 \times f_3) + (2 \times f_2) + (1 \times f_1)$	
score =	$\frac{\text{total}}{n^\circ \text{ total}}$	(9)

Onde os números de 10 a 1 correspondem à pontuação; f_{10} a f_1 correspondem à frequência da pontuação 10 à 1, respectivamente e $n^\circ \text{ total}$ é o número total de túbulos seminíferos analisados, neste caso, 100

7.6.8 Expressão gênica

A análise da expressão dos genes das amostras foi realizada pela técnica de microarranjo de RNA, que permite a investigação de milhares de transcritos de maneira simultânea. Para tal, foi utilizado o GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Array, Affymetrix®, com cobertura de mais de 28.000 transcritos codificantes e 7000 não codificantes.

As análises foram executadas em 18 amostras, selecionadas aleatoriamente, sendo 5 do GC, 5 do GPNPD, 4 do GPD e 4 do GPN.

7.6.8.1 Extração do RNA

A extração do RNA foi realizada usando o *kit* QIAzol® Lysis Reagent (Quiagen). O processo foi realizado seguindo o protocolo do fabricante descrito a seguir:

1. Em um tubo (adequado para ruptura e homogeneização e subsequente centrifugação) foi adicionado 1 mL de solução do reagente QIAzol Lysis em 100 mg de tecido;

2. Os tubos foram levados a agitação de alta velocidade com esferas de aço inoxidável (50 Hz/2 min) no Tissue lyser LT (Qiagen) para ruptura do tecido e incubados por 5 min à temperatura ambiente ;
3. Em seguida, foram adicionados 0,2 mL de solução de clorofórmio agitando-se vigorosamente por 15 seg;
4. As amostras foram incubadas por 2-3 min à temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000 x g por 15 min a 4°C;
5. A fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo, onde foi acrescentado 0,5 mL de solução de isopropanol e misturado vigorosamente utilizando vortex, incubando-se por 10 minutos à temperatura ambiente;
6. As amostras foram então centrifugadas a 12.000 x g por 10 min a 4°C;
7. O sobrenadante foi aspirado cuidadosamente e descartado;
8. O *pellet* foi lavado com 1 mL de solução de etanol 75% e centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C;
9. O sobrenadante foi totalmente removido e o *pellet* de RNA foi deixado secando por 5-10 min à temperatura ambiente e ressuspendido em 30 µL de água livre de RNase.

7.6.8.2 Purificação do RNA

Após a extração, as amostras de RNA foram purificadas utilizando o Rneasy Mini Kit (Qiagen), seguindo as etapas:

1. Foram adicionados 70 µL de solução de tampão RLT em cada amostra e, em seguida, 80 µL de solução de álcool a 70%;
2. As amostras foram homogeneizadas e colocadas na coluna RNeasy MinElute e centrifugadas por 15 seg a 10.000 rpm;

3. O líquido recolhido foi descartado e as colunas foram lavadas com 150 µL da solução RW1, centrifugando-se por 15 seg a 10.000 rpm;
4. O líquido recolhido foi descartado e as colunas foram lavadas com 100 µL de solução RPE, centrifugando-se por 15 seg a 10.000 rpm;
5. O líquido recolhido foi descartado e as colunas foram novamente lavadas com 100 µL de solução RPE , dessa vez, centrifugando-se por 2 min a 10.000 rpm;
6. As colunas contendo o RNA adsorvido foram transferidas para novos tubos de 2 mL e processadas em máxima velocidade por 1 min;
7. As colunas foram então colocadas em um tubo de 1,5 mL, adicionando-se 20 µL de água livre de RNAase para eluição do RNA. Após uma incubação de 2 min à temperatura ambiente, as colunas foram centrifugadas por 1 min a 10.000 rpm;
8. O RNA obtido foi quantificado em NanoDrop ND-100 UV/Vis (NanoDrop Technologies, USA) e submetido a eletroforese convencional em gel de agarose 1% para checagem da qualidade, pureza e integridade das amostras. As amostras apresentando razão 260/280 entre 1,8 - 2,0 e integridade nas bandas ribossomais 28S e 18S foram consideradas satisfatórias.

7.6.8.3 Microarranjos

O RNA obtido foi fragmentado e marcado utilizando o *kit* WT Plus Reagent Kit® (Affymetrix, Santa Clara, USA), seguindo o protocolo do fabricante descrito a seguir. A **Figura 14** mostra uma ilustração do processo de avaliação da expressão gênica utilizando a plataforma de microarranjo da Affymetrix.

a. Preparo da amostra

- RNA input: foram utilizados 100 ng do RNA diluído em 3 µL de água;

- Diluição seriada do RNA controle poli-A (GeneChip poly-A RNA Control Kit, Affymetrix): o *pool* de RNA controle poli A foi diluído quatro vezes de forma seriada, 1:20, 1:50, 1:50 e 1:10 em tampão de diluição próprio.

b. Síntese da primeira fita de cDNA

Para tal, foram misturados 2 μL da quarta diluição do RNA controle poli A e 3 μL de RNA *input*, aos quais foram adicionados 4 μL de First-Strand Master Mix® (Affymetrix) e 1 μL de First-Strand Enzyme® (Affymetrix). Essa mistura foi incubada por 1 h a 25° C e por 1 h a 42° C, em termociclador, com *hold* a 4° C por pelo menos 2 min.

c. Síntese da segunda fita de cDNA

Para cada tubo, foram preparados o master mix segunda-fita, contendo 18 μL da Second-Strand Master Mix® (Affymetrix) e 2 μL da Second-Strand Enzyme® (Affymetrix).

Em seguida, 20 μL dessa solução foram adicionados aos 10 μL obtidos na reação anterior e incubados em termociclador a 16° C por 1 h e a 65° C por 10 min, com *hold* a 4° C por pelo menos 2 min.

d. Síntese do cRNA anti-sense (transcrição in vitro)

No preparo do master mix IVT, foram misturados 24 μL de IVT-Buffer® (Affymetrix) e 6 μL de IVT-Enzyme® (Affymetrix) que, posteriormente, foram transferido para o tubo contendo o cDNA dupla fita. Essa mistura foi mantida a 40° C por 16 h em termociclador, com *hold* de 4° C.

e. Purificação do cRNA

Para a purificação, o cRNA foi transferido para um tubo de 1,5 mL aos quais foram adicionados 100 µL de Purification Beads (Affymetrix). Os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 10 min e transferidos para uma estante magnética por 5 min. Após as *beads* serem completamente capturadas, o sobrenadante foi cuidadosamente removido.

Os tubos foram mantidos na estante magnética, aos quais foram adicionados 200 µL de solução de etanol 80 % preparados no momento do uso, incubando-se por 30 seg. O etanol foi removido e essa etapa foi repetida por mais duas vezes, totalizando 3 lavagens com solução de etanol 80 %. Os tubos foram abertos e as *beads* foram deixadas para secar por 5 min.

Os tubos foram então removidos da estante magnética e 27 µL de água pré-aquecida a 65° C foram adicionados às *beads*. Depois de um período de incubação de 1 min, os tubos foram novamente colocados na estante magnética e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo.

O cRNA purificado foi então quantificado utilizando espectrofotômetro NanoDrop.

f. Síntese do cDNA de fita simples do segundo ciclo

Foram preparados 15 µg de cRNA purificado em um volume de 24 µL, aos quais foram combinados 4 µL de 2nd-Cycle Primers® (Affymetrix) e, após incubação a 70° C por 5 min e a 25° C por 5 min, 8 µL de 2nd-Cycle ss-cDNA Buffer® (Affymetrix) e 4 µL de 2nd-Cycle ss-cDNA Enzyme® (Affymetrix).

A mistura final de 40 µL foi levada a um termociclador a 25° C por 10 min, a 42° C por 90 min e a 70° C por 10 min, com *hold* de 4° C por pelo menos 2 min.

g. Hidrólise com RNaseH

Ao cDNA fita simples do segundo ciclo, foram adicionados 4 µL de RNaseH seguindo-se um período de incubação de 45 min a 37° C e de 5 min a 95° C, com *hold* de 4° C por pelo menos 2 min. Ao final, foram adicionados 11 µL de água livre de nucleases ao cDNA hidrolizado.

h. Purificação do cDNA fita simples do segundo ciclo

O cDNA fita simples do segundo ciclo foi transferido para um tubo de 1,5 mL aos quais foram adicionados 100 µL de Purification Beads (Affymetrix) e 150 µL de solução de etanol 100 %. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 20 min e transferidos para uma estante magnética por 5 min.

Após as beads serem completamente capturadas, o sobrenadante foi cuidadosamente removido. Os tubos foram mantidos na estante magnética, aos quais foram adicionados 200 µL de solução de etanol 80 % preparados no momento do uso, incubando-se por 30 seg. O etanol foi removido e essa etapa foi repetida por mais duas vezes, totalizando 3 lavagens com o etanol 80 %. Os tubos foram abertos e as *beads* foram deixadas secando por 5 min.

Os tubos foram então removidos da estante magnética e 30 µL de água pré-aquecida a 65° C foram adicionadas às *beads*. Depois de um período de incubação de 1 min, os tubos foram novamente colocados na estante magnética e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo.

O cDNA fita simples do segundo ciclo purificado foi então quantificado utilizando espectrofotômetro NanoDrop.

i. Fragmentação e marcação do cDNA fita simples do segundo ciclo purificado

Foram preparados 5,5 µg de cDNA purificado em um volume final de 31,2 µL. A esse cDNA foram adicionados 16,8 µL do master mix de fragmentação contendo 10,0 µL de água livre de nucleases, 4,8 µL de tampão de fragmentação 10 x, 1,0 µL de

enzima UDG (10 U/ μ L) e 1,0 μ L de enzima APE (1.000 U/ μ L). A mistura obtida foi incubada a 37° C por 60 min e a 93° C por 2 min em termociclador, com *hold* a 4°C por pelo menos 2 min.

j. Marcação do cDNA fita-simples fragmentado

Um master mix contendo 12 μ L de tampão TdT 5x, 2 μ L de enzima TdT (30 U/ μ L) e 1 μ L de reagente de marcação de DNA (5 mM) foi adicionado a 45 μ L do cDNA fita simples fragmentado. A mistura foi incubada a 37° C por 60 min e a 70° C por 10 min em termociclador, com *hold* a 4° C por pelo menos 2 min.

k. Hibridação do cDNA marcado, lavagem, marcação e processamento inicial do Chip

Nesta etapa foi utilizado o GeneChip Hybridization, Wash and Stain kit (Affymetrix). O coquetel de hibridação foi preparado misturando-se 2,5 μ L de oligo controle B2, 7,5 μ L de controles de hibridação 20 x (pré-aquecidos a 65° C por 10 min), 75 μ L de mix de hibridação 2x, 10,5 μ L de DMSO, 41 μ L de cDNA marcado (3,5 μ g) e água livre de nuclease, para um volume final de 150 μ L. Esse coquetel foi denaturado a 99° C por 5 min, refrigerado a 45° C por 5 min e centrifugado por 1 min em velocidade máxima. Um volume de 130 μ L do coquetel foi injetado no MouseGeneChip 2.0 ST.

Os chips foram levados até a plataforma específica da Affymetrix no Laboratório de Genômica Funcional do Centro de Investigação Translacional em Oncologia, localizado no Instituto do Câncer de São Paulo Octavio Frias de Oliveira (ICESP), onde foram deixados no forno de hibridação por 16 h a 45° C a 60 rpm.

Após esse período, o coquetel de hibridação foi retirado dos chips e aos mesmos foram adicionados 250 mL de solução de lavagem de baixa adstringência (solução A) do *kit* Gene Chip hybridization, wash and stain da Affymetrix.

O chips foram então transferidos para uma estação fluídica, GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix), para lavagem e marcação dos mesmos, seguindo o protocolo

padrão sugerido pela Affymetrix. Toda essa etapa é controlada de forma automatizada pelo GeneChip Operation Software (GCOS) da Affymetrix, conforme a **Tabela 4**:

Tabela 4 - Protocolo de lavagem e marcação de *chip* da Affymetrix

Procedimentos	Condições
1ª lavagem pós-hibridação	10 ciclos de 2 mixes ciclo com <i>wash buffer A</i> (baixa adstringência) a 30° C
2ª lavagem pós-hibridação	6 ciclos de 15 mixes ciclo com <i>wash buffer B</i> (alta adstringência) a 50° C
1ª marcação	marcação das sondas por 10 minutos a 35° C com coquetel de marcação 1
1ª lavagem pós-marcação	10 ciclos de 4 mixes ciclo com <i>wash buffer A</i> a 30° C
2ª marcação	marcação das sondas por 5 minutos a 35° C com coquetel de marcação 2
3ª marcação	marcação das sondas por 5 minutos a 35° C com coquetel de marcação 1
Lavagem final	10 ciclos de 2 mixes/ciclo com <i>wash buffer A</i> a 35° C

A estação fluídica comporta 4 *chips* e o procedimento de lavagem completo dura em torno de 90 minutos.

Após os procedimentos automatizados, a solução de lavagem foi manualmente substituída pela solução de *holding* e os *chips* foram individualmente digitalizados. O arquivo DAT file, que contém a imagem óptica do *chip* hibridado foi, então, gerado sendo também realizado o gradeamento para identificação do *square* (ou *cell* ou *spots*) que marca a localização das sondas. Este gradeamento é feito pelo próprio algoritmo de digitalização do sistema GCSO, que utiliza como base um arquivo contendo as coordenadas da sonda, de acordo com uma determinada sequência genômica. Estes arquivos são específicos para cada tipo de *chip* e estão disponíveis para *download* no *site* da Affymetrix. No caso, foi utilizado o MoGene-2_0-st-v1.na36.mm10.transcript.csv *library file* que contém coordenadas cromossômicas de acordo com a versão mm10 do genoma do camundongo (*Mus musculus*).

Após a identificação dos *spots* o *software* GCSO realiza o cálculo da intensidade de cada sonda, em valores de *pixels*, do DAT file. Esses dados, incluindo o desvio padrão e o número de *pixels* usados para este cálculo são estocados no formato CEL files (*raw data*).

Informações sobre essas etapas podem ser encontradas no Affymetrix® GeneChip® Fluidics Station 450 User's Guide AGCC (P/N 08-0295), no GeneChip® Expression Wash, Stain, and Scan User Manual for Cartridge Arrays (PN 702731), e no Affymetrix® GeneChip® Command Console® User Manual (P/N 702569).

Fonte: (Staal, van der Burg et al. 2003)

Figura 14 – Representação esquemática dos procedimentos realizados no experimento de microarranjo de cDNA utilizando a plataforma da Affymetrix

7.6.8.4 Análise dos chips

a) Qualidade dos sinais gerados

Os dados brutos gerados foram avaliados de acordo com a métrica de análise de qualidade (QC) da Affymetrix que consiste em: 1 - inspeção visual da imagem produzida (.DAT) para verificar a presença de artefatos; 2 - verificação do alinhamento do *grid* (posicionamento correto das sondas controle B2 que marcam os limites externos dos *spots*), realizado no próprio *software* GCOS; 3 - verificação da intensidade dos sinais (*boxplot* das intensidades). Os sinais de intensidade foram transformados em dados numéricos e normalizados, reduzidos a uma distribuição comum, que permitiu uma comparação mais correta e não tendenciosa. Na apresentação gráfica em forma de BoxPlot (**Figura 15**) é possível observar que não houve amostras com distribuição discrepante em relação às outras, ou *outliers*; 4- controles *exogenous* poli-A e de hibridação: esses controles foram avaliados pelo próprio programa Expression Console®. Ao identificar perda ou degradação de material, a partir da concentração destes controles, em cada *chip*, o programa gera uma notificação (Flag), que impossibilita análises posteriores.

Em azul, log da expressão relativa de sinal antes da normalização e, em vermelho, log da expressão de sinal após a normalização

Figura 15 – Distribuição em gráfico BoxPlot das intensidades das sondas em escala logarítmica (eixo Y) por amostra (eixo X)

b) Análise dos dados

Os dados brutos (.CEL files) gerados foram importados para o *software* proprietário TAC da Affymetrix seguindo o *workflow* de análise. Em resumo, o processo de normalização dos *chips* inclui correção RMA do *background*, normalização *quantile* e transformação logarítmica na base 2. Para análise de variância foi utilizado o teste ANOVA e *single-sided T-test*, sendo considerado significativo o valor de $p < 0,05$. A anotação funcional e a análise pelo Gene Ontology (GO) para determinação do processo biológico e função molecular dos genes com expressão diferencial foi feita no próprio *software* da Affymetrix.

7.7 Estatística

As análises foram realizadas utilizando o programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS®), versão 23, para *Windows* (IBM 2014).

Todos os dados foram testados para a normalidade de distribuição dos valores, com o teste de Shapiro-Wilk, e para a homogeneidade da variância pelo teste de Levene (Field 2009).

Para as variáveis cujos valores se apresentaram normalmente distribuídos e com variâncias homogêneas, foram executadas análises de variâncias para amostras independentes (ANOVAs independentes) para verificação da existência de diferenças entre as médias dos grupos. Em seguida, o procedimento de Gabriel foi usado para se conhecer entre quais grupos havia diferença significativa entre as médias (Field 2009). Esses conjuntos de dados são representados por seus valores de média e de desvio padrão (DP), e estão apresentados no texto como média $\pm$ DP.

Para as variáveis cujas hipóteses de distribuição normal e/ou homogeneidade das variâncias tenha(m) sido violadas, o teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para

verificação da existência de diferenças entre as médias dos grupos. Para análise posterior, o teste de Mann-Whitney foi realizado para se conhecer entre quais grupos as médias diferiam significativamente (Field 2009). Esses conjuntos de dados são representados por seus valores de mediana, acompanhados pelo valor mínimo e pelo valor máximo, sendo apresentados no texto como mediana (valor mínimo - valor máximo).

Foi realizada, também, uma análise multivariada (MANOVA) para se conhecer a influência dos períodos de exposição (pré-natal e pós-desmame) isolados e em conjunto sobre os parâmetros analisados.

O valor de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

8.

Resultados

8.1 Composição do MP_{2,5}

A concentração média de MP_{2,5} encontrada nas amostras foi de 646,37 (DP = 534,06) µg/m³. As concentrações dos elementos dosados estão detalhadas na **Tabela 5**, onde se observa que o enxofre, o silício, o alumínio e o ferro estão presentes em maiores concentrações. Por outro lado, o chumbo, o vanádio, o cromo e o níquel apresentaram concentrações mínimas e o selênio não foi detectado nas amostras.

Tabela 5 – Composição elementar do MP_{2,5}

Componente	Concentração (µg/m ³)
S	9,37 (8,18)
Si	6,49 (14,92)
Al	5,61 (11,74)
Fe	5,30 (11,62)
K	3,46 (6,51)
Ca	3,27 (7,26)
Cl	0,77 (1,05)
Ti	0,64 (1,45)
P	0,58 (1,52)
Na	0,53 (0,71)
Zn	0,50 (0,72)
Mg	0,36 (1,08)
Mn	0,16 (0,26)
Cu	0,10 (0,16)
Rh	0,05 (0,09)
Br	0,04 (0,05)
Pb	0,02 (0,04)
V	0,01 (0,02)
Cr	0,01 (0,04)
Ni	0,01 (0,02)
Se	0,00 (0,00)

Dados: média (DP); n = 32 filtros de polycarbonato

Dos HPA dosados, o benzo(a)acefenantrileno estava presente em maior concentração e o benzo(a)pireno apresentou a menor concentração (**Tabela 6**).

Tabela 6 – Quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) no MP_{2,5}

HPA	Filtros (n)	Concentração (ng/m ³)
Benzo(a)acefenantrileno	6	6,81 (2,44 - 13,97)
Pireno	6	1,65 (3,60 - 9,00)
Benzo(k)fluoranteno	8	1,42 (0,44 - 3,17)
Benzo(a)pireno	7	0,72 (0,27 - 1,08)

Dados: média (variação de concentração)

8.2 Composição dos grupos experimentais

Ao término do protocolo de exposição ao MP_{2,5}, amostras de 52 animais foram coletadas e a distribuição do número de animais em cada grupo está detalhada na **Tabela 7**.

Tabela 7 – Composição dos grupos de acordo com o número de animais

Grupo	n
Controle (GC)	13
Pós-desmame (GPD)	16
Pré-natal (GPN)	09
Pré-natal e pós-desmame (GPNPD)	14
Total	52

8.3 Peso corporal

Os valores de peso dos animais estão apresentados na **Tabela 8**, onde pode-se observar que o GPN apresentou a maior média entre os grupos, porém, sem diferença estatística significativa.

8.4 Peso do testículo

O GPMPD obteve a maior média de peso dos testículos ($95,785 \pm 6,57$), seguido pelo GPD ($87,250 \pm 7,34$), pelo GC ($85,538 \pm 9,86$) e pelo GPN, no qual os testículos apresentaram a menor média ($82,777 \pm 6,13$). Nas comparações entre as médias dos grupos, houve diferença estatística significativa entre o GPMPD e o GC e, dos grupos GPD e GPN quando comparados ao GPMPD (**Tabela 8**).

8.5 Peso do epidídimo

Assim como para o peso dos testículos, o GPMPD apresentou o maior valor de peso dos epidídimos, com uma mediana de 34,000 (22 – 39), o que foi estatisticamente significativo na comparação com o valor do GC, de 30,00 (19 – 34). As demais comparações entre os grupos não mostraram diferenças significativas entre as médias ($32,000 \pm 3,24$ para o GPD e $31,111 \pm 2,66$ para o GPN) (**Tabela 8**).

8.6 Índice gonadossomático

O GPNPD apresentou a maior média de IGS ($0,436 \pm 0,02$), o que diferiu significativamente na comparação com as médias dos grupos GPD ($0,390 \pm 0,04$) e GPN ($0,360 \pm 0,03$), porém, sem diferença em relação ao GC ($0,401 \pm 0,04$) (**Tabela 8**).

8.7 Volume do testículo

Os testículos dos animais do GPNPD apresentaram a maior média de volume ($92,101 \pm 6,32$), o que diferiu significativamente da média do GC ($82,249 \pm 9,48$). O GPN apresentou a menor média ($79,595 \pm 5,90$), com diferença estatística significativa em relação ao GPNPD, o que também ocorreu com o GPD ($83,895 \pm 7,06$) (**Tabela 8**).

8.8 Parâmetros morfométricos do testículo

A área de superfície dos túbulos seminíferos do GPNPD apresentou a maior média ($144,540 \pm 22,79$) entre os grupos, diferindo significativamente do GC ($120,369 \pm 18,96$), o que não aconteceu com os demais grupos (média de $131,070 \pm 13,77$ para o GPD e de $131,060 \pm 26,85$ para o GPN) (**Tabela 8**).

Os grupos apresentaram valores próximos de médias de área seccional dos túbulos seminíferos, o que não representou diferença estatística na comparação entre as médias (GPN = $1,298 \pm 0,02$; GPD = $1,274 \pm 0,54$; GPNPD = $1,244 \pm 0,06$ e GC = $1,208 \pm 0,14$) (**Tabela 8**).

Os valores das médias de diâmetro dos túbulos seminíferos não foram diferentes entre os grupos ($p > 0,05$), com o GC apresentando o maior valor ($26,254 \pm 5,23$), seguido pelo GPNPD ($24,295 \pm 3,66$), pelo GPD ($24,293 \pm 1,87$) e GPN ($23,424 \pm 4,42$) (**Tabela 8**).

O valor de volume do epitélio seminífero do GPNPD, mediana de 75,646 (46,72 - 81,16) foi o maior dentre os grupos, diferindo significativamente em relação a eles (média de $66,657 \pm 4,45$ para o GPD; de $61,385 \pm 7,81$ para o GC e de $60,931 \pm 4,44$ para o GPN). Da mesma maneira, o menor valor apresentado, o do GPN, diferiu significativamente dos outros três grupos. Em relação ao GC, os demais grupos também apresentaram valores com significância estatística (**Tabela 8**).

Em relação aos valores de volumes dos espaços intersticiais, não houve diferença significativa entre os grupos. O maior volume foi o referente ao GPNPD, mediana de 5,497 (3,94 - 9,05), seguido pelo GPN, com uma média de $5,204 \pm 1,38$, pelo GC (média = $4,888 \pm 2,56$ - 11,25) e, finalmente, pelo GPD, com a menor média ($4,698 \pm 1,70$) (**Tabela 8**).

O GC apresentou os maiores valores referentes a luz dos túbulos seminíferos (média de $15,769 \pm 3,62$). Os demais grupos apresentaram médias menores e próximas entre si (GPN = $13,457 \pm 2,55$; GPNPD = $13,451 \pm 4,86$; GPD = $12,537 \pm 2,77$) que não diferiram significativamente em relação ao GC (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Resultados dos parâmetros analisados referentes aos testículos e epidídimos, por grupo

Parâmetro	Grupo Controle (GC)	Grupo Pós-desmame (GPD)	Grupo Pré-natal (GPN)	Grupo Pré-natal e pós-desmame (GPNPD)
Peso corporal (g)	25,067 ± 1,73	25,225 ± 1,31	26,366 ± 1,68	26,121 ± 1,02
Peso do testículo (mg)	85, 538 ± 9,86	87,250 ± 7,34^b	82,777 ± 6,13^b	95,785 ± 6,57^a
IGS (%)	0,401 ± 0,04	0,390 ± 0,04^b	0,360 ± 0,03^b	0,436 ± 0,02
Volume do testículo (mm³)	82,249 ± 9,48	83,895 ± 7,06^b	79,595 ± 5,90^b	92,101 ± 6,32^a
Área de superfície dos túbulos (cm²)	120,369 ± 18,96	131,070 ± 13,77	131,060 ± 26,85	144,540 ± 22,79^a
Área seccional dos túbulos (mm²)	1,208 ± 0,14	1,274 ± 0,54	1,298 ± 0,02	1,244 ± 0,06
Diâmetro dos túbulos (µm)	26,254 ± 5,23	24,293 ± 1,87	23,424 ± 4,42	24,295 ± 3,66
Volume do epitélio (mm³)	61,385 ± 7,81	66,657 ± 4,45^{a,b}	60,931 ± 4,44^{a,b,c}	75,646 (46,72 - 81,16)^a
Volume da luz (mm³)	15,769 ± 3,62	12,537 ± 2,77	13,457 ± 2,55	13,451 ± 4,86
Volume do interstício (mm³)	4,888 ± 2,56 - 11,25	4,698 ± 1,70	5,204 ± 1,38	5,497 (3,94 - 9,05)
Peso do epidídimo (mg)	30,00 (19 – 34)	32,000 ± 3,24	31,111 ± 2,66	34,000 (22 – 39)^a

^a: $p < 0,05$ na comparação com o Grupo Controle

^b: $p < 0,05$ na comparação com o Grupo Pré-natal e Pós-desmame

^c: $p < 0,05$ na comparação com o Grupo Pós-desmame

8.9 Análise histológica do testículo

Na análise de comparação entre as médias de pontuação do escore de Johnsen, o GC obteve o melhor desempenho ($8,926 \pm 0,27$) e o GPNPD o pior ($8,431 \pm 0,31$), com diferença significativa entre os valores. O GPD ($8,455 \pm 0,20$) também apresentou diferença significativa em relação ao GC. Ainda, o GPN ($8,781 \pm 0,21$) diferiu significativamente tanto em relação ao GPNPD quanto em relação ao GPD (**Tabela 9**).

Tabela 9 – Valores dos escores de Johnsen e comparações entre os grupos

Parâmetro	Grupo Controle (GC)	Grupo Pós-desmame (GPD)	Grupo Pré-natal (GPN)	Grupo Pré-natal e pós-desmame (GPNPD)
Pontuação (média)	$8,926 \pm 0,27$	$8,455 \pm 0,20^a$	$8,781 \pm 0,21^{b,c}$	$8,431 \pm 0,31^a$

^a: $p < 0,05$ em comparação com o Grupo Controle

^b: $p < 0,05$ em comparação com o Grupo Pré-natal e Pós-desmame

^c: $p < 0,05$ na comparação com o Grupo Pós-desmame

A análise histológica dos testículos dos animais do GC mostrou espermatogênese normal, com presença de células de Sertoli, células germinativas e células de Leydig com características preservadas (**Figura 16**).

Os testículos dos demais grupos apresentaram características de degeneração/atrofia tubular. Dentre as alterações visualizadas estavam exfoliação de células germinativas para a luz tubular, desorganização das células germinativas, retenção de espermátides, células gigantes, atrofia tubular, vacuolização de citoplasma de células de Sertoli, porém, sem um padrão característico para cada grupo.

Algumas dessas alterações estão mostradas nas **Figuras 17 a 21**.

Em **A** (aumento de 10x) observa-se as estruturas componentes dos testículos: os túbulos seminíferos, onde a seta vermelha indica o epitélio e a seta preta indica a luz; e o interstício indicado pela seta amarela. Em **B** (aumento de 40x) um único túbulo seminífero mostrando a organização das células germinativas e espermátides alongadas (seta preta) prontas para serem espermiadas

Figura 16 – Testículos de animais do Grupo Controle

Figura 17 – Túbulo seminífero de um animal do grupo pré-natal e pós-desmame (GPNPD) mostrando perda de associação de células germinativas

A exfoliação de células germinativas é caracterizada pela presença de células não degeneradas na luz tubular

Figura 18 – Túbulo seminífero de um testículo do grupo pré-natal (GPN) apresentando exfoliação de células germinativas

Nota-se desorganização das células germinativas, com perda de orientação das espermatídes em direção à luz, na parte inferior da imagem; retenção de espermatídes alongadas, indicada pela seta vermelha; célula gigante multinucleada, indicada pelo círculo vermelho; e uma luz reduzida, indicada pelo círculo preto. As células gigantes multinucleadas se apresentam como uma célula grande que contém múltiplos núcleos de células germinativas no mesmo grau de maturidade e geralmente, estão presentes com evidências de degeneração tubular.

A retenção de espermatíde é a persistência da espermatíde madura no epitélio seminífero após o estágio fisiológico de espermiacção. As espermatídes podem permanecer na camada luminal do epitélio ou na camada basal do citoplasma da célula de Sertoli, conforme indicado na seta.

Figura 19 – Túbulo seminífero de um testículo do grupo pré-natal e pós-desmame (GPNPD) diversas alterações

A atrofia tubular é caracterizada por ausência de todas ou quase todas as células germinativas no túbulo, podendo ser focal (como nesse caso) ou difusa

Figura 20 – Túbulos seminíferos de testículos do grupo pré-natal (GPN) mostrando atrofia tubular

Em A observam-se corpos residuais anormais, indicados pelas setas amarelas e retenção de espermatídes, indicadas pela seta vermelha. Em B observa-se uma célula gigante multinucleada, marcada pelo círculo vermelho; e desorganização das células germinativas, na parte superior da imagem. Apesar disso, espermatídes alongadas prontas para serem liberadas para a luz do túbulo estão presentes. Os corpos residuais anormais são geralmente grandes e deformados. Podem se apresentar na face luminal do túbulo ou no citoplasma das células de Sertoli e são compostos pelo abundante citoplasma e pelas organelas que são descartadas durante o processo de maturação da espermatíde em alongamento para espermatíde alongada. Eles são formados logo após a espermição e, em seguida, são fagocitados e transportados até o citoplasma das células de Sertoli, na camada basal, e desaparecem após fagocitose.

Figura 21 – Túbulos seminíferos de testículos do grupo pós-desmame (GPD) mostrando diversas alterações

A análise multivariada foi efetuada com o objetivo de conhecer o efeito das exposições pré-natal e pós-desmame isoladas e da combinação de ambas sobre os parâmetros analisados.

Dos resultados significativos, a exposição pré-natal mostrou ter impacto apenas sobre o peso corporal ($p = 0,01$) e sobre a área de superfície dos túbulos seminíferos ($p = 0,041$).

A exposição que se iniciou após o desmame foi a que mais exerceu influência sobre as variáveis analisadas. O peso dos testículos ($p = 0,001$), o peso dos epidídimos ($p = 0,033$), o volume dos testículos ($p = 0,001$), o IGS ($p = 0,005$), a área de superfície dos túbulos seminíferos ($p = 0,041$), o volume do epitélio seminíferos ($p = 0,000$), e o escore de Johnsen ($p = 0,000$) foram significativamente afetadas por esse período de exposição.

A associação da exposição pré-natal com a exposição pós-desmame teve efeitos significativos sobre o peso e o volume dos testículos (ambos $p = 0,013$), sobre o IGS ($p = 0,000$) e sobre a área seccional dos túbulos ($p = 0,019$).

8.10 Expressão gênica

A comparação do perfil de expressão entre os grupos resultou em 1.250 genes diferencialmente expressos, listados no **Anexo**.

As descrições das funções dos genes foram consultadas nos bancos de dados Ensembl (Consortium 2012) e Mouse Genome Informatics (Blake JA 2017).

Na comparação entre os GC e GPD, 226 genes apresentaram expressão diferencial. Os principais genes com maior expressão em relação ao GC estão listados na **Tabela 10** e os principais genes com menor expressão em relação ao GC estão listados na **Tabela 11**.

Tabela 10 – Principais genes hiperexpressos no grupo pós-desmame (GPD) em relação ao grupo controle (GC)

Média GC (log²)	Média GPD (log²)	Variação na magnitude de expressão	Gene	Descrição
3.57	3.69	1.09	<i>AI504432</i>	<i>expressed sequence AI504432</i>
7.61	7.74	1.09	<i>Rnf220</i>	<i>ring finger protein 220</i>
6.13	6.27	1.10	<i>Gas2</i>	<i>growth arrest specific 2</i>
9.05	9.22	1.13	<i>Ttl9</i>	<i>tubulin tyrosine ligase-like family, member 9</i>
7.57	7.75	1.13	<i>Vegfb</i>	<i>vascular endothelial growth factor B</i>
5.51	5.69	1.14	<i>Mal</i>	<i>myelin and lymphocyte protein</i>
6.76	7	1.18	<i>Sox5</i>	<i>SRY (sex determining region Y)-box 5</i>
4.32	4.57	1.19	<i>Il21r</i>	<i>interleukin 21 receptor a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2</i>
5.83	6.11	1.21	<i>Adamts2</i>	<i>ADAMTS-2</i>
3.01	3.29	1.21	<i>Rps15a-ps8</i>	<i>ribosomal protein S15A, pseudogene 8</i>
7.1	7.38	1.22	<i>Arl2</i>	<i>ADP-ribosylation factor-like 2</i>
5.35	5.64	1.22	<i>E2f1</i>	<i>E2F transcription factor 1</i>
6.08	6.4	1.24	<i>Nme4</i>	<i>NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 4</i>
6.98	7.29	1.24	<i>Suv420h2</i>	<i>suppressor of variegation 4-20 homolog 2 (Drosophila)</i>
5.45	5.76	1.24	<i>Tinagl1</i>	<i>tubulointerstitial nephritis antigen-like 1</i>
4.97	5.3	1.25	<i>Bcl11a</i>	<i>B cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)</i>
3.96	4.32	1.28	<i>Fcrlb</i>	<i>Fc receptor-like B</i>
2.87	3.23	1.29	<i>Tceal7</i>	<i>transcription elongation factor A (SII)-like 7</i>
3.45	3.83	1.30	<i>Lmo3</i>	<i>LIM domain only 3</i>
6.17	6.67	1.41	<i>Snord67; Ckap5</i>	<i>small nucleolar RNA, C/D box 67; cytoskeleton associated protein 5</i>

O gene *Adamts2* está envolvido no processamento proteolítico de pró-colágenos. A proteína precursora codificada é processada proteoliticamente originando um enzima zinco-dependente. Camundongos que não codificam a proteína apresentam alterações pulmonares, pele frágil e esterilidade masculina. O gene *E2f1* está relacionado à hiperplasia de células de Leydig, degeneração de túbulos seminíferos, atrofia testicular, aumento de incidência de tumores de sistema reprodutor. O gene *Sox5* codifica fatores de transcrição que controlam diferenciação e destino em várias linhagens celulares, incluindo proteínas de neurônios, cartilagens e de espermátides via gene *Sry*. O gene *Ttll9* está envolvido na formação dos cílios celulares. O gene *Arl2* regula positivamente a adesão entre células, participa da conformação das junções oclusivas. O gene *Tinagl1* está envolvido em processos catalíticos celulares, na resposta imune, na adesão celular.

Os genes *Snord67*, *Ckap5* e *Rps15a-ps8* estão envolvidos em mecanismos do ciclo celular (organização dos fusos nas divisões mitóticas nucleares), na manutenção da polaridade dos microtúbulos que compõem o citoesqueleto. O gene *Suv420h2* é envolvido na metilação de histonas.

Os genes *Al504432* (regulação positiva da via de sinalização PI3K, na cascata MAPK ativada pelo estresse), *Rnf220* (regula positivamente a via canônica Wnt), *Il21r* (via de sinalização mediada por citocinas), *Bcl11a* (regulação negativa da expressão de genes, diferenciação de células B e T), *Fcrlb* (regulação negativa da resposta imune), *Tceal7* (regulação negativa da transcrição de NF-kappaB), *Lmo3* (regulação negativa da cascata ERK1 e ERK2), *Vegfb* (cascata ERK1 e ERK2, regulação positiva da expressão gênica, da divisão celular, regulação negativa da apoptose) estão envolvidos em processos inflamatórios relacionados à resposta imune. Os genes *Mal* (regula positivamente na via extrínseca de apoptose), *Gas2* e *Nme4* participam de vias de apoptose.

Tabela 11 – Principais genes hipoexpressos no grupo pós-desmame (GPD) em relação ao grupo controle (GC)

Média GC (log ²)	Média GPD (log ²)	Variação na magnitude de expressão	Gene	Descrição
10.53	10.46	1.05	<i>Inpp5k</i>	<i>inositol polyphosphate 5-phosphatase K</i>
10.75	10.63	1.09	<i>Meig1</i>	<i>meiosis expressed gene 1</i>
8.7	8.55	1.11	<i>Cab39</i>	<i>calcium binding protein 39</i>
9.97	9.8	1.13	<i>Senp2</i>	<i>SUMO/sentrin specific peptidase 2</i>
9.08	8.87	1.16	<i>Sbds</i>	<i>Shwachman-Bodian-Diamond syndrome homolog (human)</i>
8.23	7.96	1.20	<i>Cfap46</i>	<i>cilia and flagella associated protein 46</i>
4.94	4.67	1.20	<i>Ulbp1</i>	<i>UL16 binding protein 1</i>
6.96	6.65	1.24	<i>Zfyve26</i>	<i>zinc finger, FYVE domain containing 26</i>
9.84	9.51	1.25	<i>Arl8b</i>	<i>ADP-ribosylation factor-like 8B</i>
6.47	6.15	1.25	<i>Eif4e3</i>	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E member 3</i>
5.35	5.01	1.27	<i>Lace1</i>	<i>lactation elevated 1</i>
6.53	6.16	1.29	<i>Zfp26</i>	<i>zinc finger protein 26</i>
6.99	6.42	1.49	<i>Haus2</i>	<i>HAUS augmin-like complex, subunit 2</i>
6.15	5.55	1.52	<i>Casp8</i>	<i>caspase 8;</i>

O gene *Meig1* está relacionado a alterações na espermatogênese e à esterilidade. O gene *Cfap46* está envolvido no movimento ciliar e, consequentemente, na motilidade celular.

Os genes *Arl8b* e *Sbds* estão envolvidos na mitose. O gene *Eif4e3* participa da mitose e da manutenção da população de células-tronco. O gene *Zfyve26* participa do controle da citocinese durante o ciclo celular e no reparo ao dano de DNA. O gene *Haus2* participa do ciclo celular, na divisão mitótica nuclear, na organização de centríolos e de microtúbulos.

O gene *Inpp5k* está relacionado com a resposta celular ao AMPc, com o desenvolvimento embrionário, com regulação negativa da atividade de MAPK e da sinalização de proteína quinase B, regulação negativa e positiva de transcrição de DNA. O gene *Senp2* é envolvido na modulação da via Wnt, pela desregulação de CTNNB1; na regulação negativa da resposta de dano ao DNA pela via p53, na regulação da mitose. O gene *Ubp1* participa da ativação de células natural killer. O gene *Lace1* participa da translocação de p53 para a mitocôndria, ativando a via de apoptose em resposta à estresse genotóxico. O gene *Casp8* regula positivamente a via extrínica da apoptose.

Na comparação entre os GC e GPN, 187 genes apresentaram expressão diferencial. Os principais genes com maior expressão em relação ao GC estão listados na **Tabela 12** e os principais genes com menor expressão em relação ao GC estão listados na **Tabela 13**.

Tabela 12 – Principais genes hiperexpressos no grupo pré-natal (GPN) em relação ao grupo controle (GC)

Média GC (log ²)	Média GPN (log ²)	Variação na magnitude de expressão	Gene	Descrição
6.83	6.97	1.10	<i>Slc11a2</i>	<i>solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2</i>
6.76	6.9	1.10	<i>Sox5</i>	<i>SRY (sex determining region Y) box 5</i>
5.86	6.06	1.15	<i>Nuak2</i>	<i>NUAK family, SNF1like kinase, 2</i>
6.86	7.1	1.18	<i>Lsr</i>	<i>lipolysis stimulated lipoprotein receptor</i>
6.17	6.41	1.18	<i>Spata2l</i>	<i>spermatogenesis associated 2like</i>
4.2	4.5	1.23	<i>Nron</i>	<i>nonprotein coding RNA, repressor of NFAT</i>
2.95	3.26	1.24	<i>Cysltr1</i>	<i>cysteinyl leukotriene receptor 1</i>
5.14	5.5	1.28	<i>Ctsc</i>	<i>cathepsin C</i>
3.33	3.7	1.29	<i>Clec4d</i>	<i>Ctype lectin domain family 4, member d</i>
4.3	4.68	1.30	<i>Tlr13</i>	<i>tolllike receptor 13</i>
2.51	2.94	1.35	<i>Hist1h3f</i>	<i>histone cluster 1, H3f</i>
2.95	3.41	1.37	<i>Mir205; 4631405K08Rik</i>	<i>microRNA 205; RIKEN cDNA 4631405K08 gene</i>

4	4.48	1.39	<i>Il2rg</i>	<i>interleukin 2 receptor, gamma chain</i>
5.47	5.98	1.42	<i>Clec2d</i>	<i>Ctype lectin domain family 2, member d</i>
5.26	6.03	1.71	<i>Lrg1</i>	<i>leucinerich alpha2glycoprotein 1</i>
5.36	6.25	1.86	<i>Egr1</i>	<i>early growth response 1</i>

O gene *Egr1* é associado a interação sexual anormal, oligozoospermia, hipoplasia de células de Leydig, tamanho reduzido da próstata e vesícula seminal, hipoplasia da adeno-hipófise, túbulos seminíferos pequenos, redução de peso do testículo, redução de testosterona e GH. O gene *Lsr* está relacionado à infertilidade masculina.

O gene *Hist1h3f* está envolvido no silenciamento de genes. O gene *Mir205* está envolvido na regulação do tamanho celular, na regulação negativa da expressão gênica e no silenciamento de gene através de miRNA, e regulação positiva da proliferação de células-tronco.

O gene *Nron* está envolvido na regulação da produção de citocinas. O gene *Cysltr1* está envolvido na resposta inflamatória e via de sinalização de leucotrienos. O gene *Clec4d* participa da resposta imune adaptativa. O gene *Tlr13* participa de resposta inflamatória, da regulação da via MAPK e resposta imune inata. O gene *Il2rg* regula positivamente a expressão gênica, e está envolvido na via de sinalização mediada por citocinas. O gene *Clec2d* participa da defesa celular mediada por células natural killer. O gene *Lrg1* participa da regulação positiva da via de sinalização TGFβ.

O gene *Slc11a2* está envolvido na resposta de estresse oxidativo e apoptose. O gene *Ctsc* regula positivamente a via de apoptose enquanto que o gene *Nuak2* regula negativamente apoptose e regula a via TOR e da organização do citoesqueleto de actina.

Tabela 13 – Principais genes hipoexpressos no grupo pré-natal (GPN) em relação ao grupo controle (GC)

Média GC (log ²)	Média GPN (log ²)	Variação na magnitude de expressão	Gene	Descrição
10.15	10.09	1.05	<i>Ppp2r5c</i>	<i>protein phosphatase 2, regulatory subunit B, gamma</i>
8.51	8.29	1.16	<i>Cfap221</i>	<i>cilia and flagella associated protein 221</i>
4.32	4.09	1.17	<i>Eva1a</i>	<i>eva1 homolog A (C. elegans)</i>
6.89	6.63	1.20	<i>Fanca</i>	<i>Fanconi anemia, complementation group A</i>
7.78	7.5	1.22	<i>Ccndbp1</i>	<i>cyclin Dtype bindingprotein 1</i>
5.68	5.32	1.28	<i>Eln</i>	<i>elastin</i>
5.35	4.97	1.29	<i>Lace1</i>	<i>lactation elevated 1</i>

O gene *Fanca* está envolvido no desenvolvimento da gônada masculina, na resposta celular frente a dano de DNA, na regulação da proliferação celular e na meiose masculina. O gene *Cfap221* está envolvido na organização da projeção celular, na morfogênese e no movimento ciliar. O gene *Eln* participa da regulação da polimerização dos filamentos de actina.

O gene *Ccndbp1* participa da regulação do ciclo celular. O gene *Ppp2r5c* participa da regulação negativa da proliferação celular, da via intrínseca de apoptose em resposta ao dano de DNA causado por mediadores da classe p53. Os genes *Eva1a* e *Lace1* também estão envolvidos na apoptose.

Na comparação entre os GC e GPNPD, 89 genes apresentaram expressão diferencial. Os principais genes com maior expressão em relação ao GC estão listados na **Tabela 14** e os principais genes com menor expressão em relação ao GC estão listados na **Tabela 15**.

Tabela 14 – Principais genes hiperexpressos no grupo pré-natal e pós-desmame (GPNPD) em relação ao grupo controle (GC)

Média GC (log ²)	Média GPN (log ²)	Variação na magnitude de expressão	Gene	Descrição
5.93	6.35	1.34	<i>Dynlt1f</i>	<i>dynein light chain Tctextype 1F</i>
5.58	5.99	1.33	<i>Fam107a</i>	<i>family with sequence similarity 107, member A</i>
2.97	3.33	1.29	<i>Ifi44l</i>	<i>interferoninduced protein 44 like</i>
3.59	3.83	1.19	<i>Nepn</i>	<i>nephrocan</i>
5.76	5.96	1.15	<i>Noct</i>	<i>nocturnin.</i>
10.15	10.21	1.04	<i>Ppp2r5c</i>	<i>protein phosphatase 2, regulatory subunit B, gamma</i>
4.38	4.61	1.17	<i>Rab7b</i>	<i>RAB7B, member RAS oncogene family</i>
5.9	6.03	1.1	<i>Rad51b</i>	<i>RAD51 paralog B</i>
7.61	7.74	1.1	<i>Rnf220</i>	<i>ring finger protein 220</i>
3.01	3.3	1.22	<i>Rps15aps 8</i>	<i>ribosomal protein S15A, pseudogene 8</i>
6.76	6.92	1.12	<i>Sox5</i>	<i>SRY (sex determining region Y)box 5; DNA binding</i>

O gene *Dynlt1f* é envolvido no desenvolvimento e função de células germinativas e parece estar envolvido na esterilidade masculina. O gene *Rad51b* participa do desenvolvimento embrionário, da regulação positiva da proliferação celular e de processos da meiose.

O gene *Fam107a* participa da regulação do crescimento celular. O gene *Rps15a-ps8* participa da regulação positiva da proliferação e do ciclo celular.

O gene *Ifi44l* participa da resposta imune. O gene *Nepn* participa da regulação negativa da via TGFβ. O gene *Rab7b* participa da regulação positiva da atividade dos fatores de transcrição *NF-kappaB* e da produção de *IL-6*. O gene *Rnf220* participa da regulação positiva da via canônica Wnt. O gene *Ppp2r5c* participa da regulação negativa da proliferação celular, da via intrínseca da apoptose em resposta a dano no DNA causado por mediadores p53

Tabela 15 – Principais genes hipoexpressos no grupo pré-natal e pósdesmame (GPNPD) em relação ao grupo controle (GC)

Média GC (log ²)	Média GPNPD (log ²)	Variação na magnitude de expressão	Gene	Descrição
6	5.82	1.13	<i>Agt</i>	<i>angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)</i>
5.12	4.77	1.27	<i>C5ar2</i>	<i>complement component 5a receptor 2</i>
4.07	3.75	1.24	<i>Gpr173</i>	<i>Gprotein coupled receptor 173</i>
5.35	5.02	1.26	<i>Lace1</i>	<i>lactation elevated 1</i>
6.52	6.25	1.21	<i>Nacc2</i>	<i>nucleus accumbens associated 2, BEN and BTB (POZ) domain containing</i>
8.05	7.92	1.1	<i>Setdb1</i>	<i>SET domain, bifurcated 1</i>
6.01	5.68	1.25	<i>Six5</i>	<i>sine oculisrelated homeobox 5</i>

O gene *Six5* participa da sobrevivência de células germinativas, do desenvolvimento de espermátides e da espermiogênese. O gene *Gpr173* participa da resposta celular ao GnRH. O gene *Agt* participa da regulação positiva da organização das junções comunicantes, da via extrínseca da apoptose, regulação negativa do crescimento celular. O gene *Nacc2* participa da regulação negativa de proliferação celular e da transcrição de DNA, regulando a expressão gênica pós-transcricional; regula positivamente a via intrínseca da apoptose. O gene *Setdb1* também participa da regulação da transcrição de DNA, da metilação de histonas. O gene *C5ar2* participa da resposta inflamatória, regulando positivamente ERK1 e ERK2.

Na comparação entre os GPD e GPN, 186 genes apresentaram expressão diferencial. Os principais genes com maior expressão em relação ao GC estão listados na **Tabela 16** e os principais genes com menor expressão em relação ao GC estão listados na **Tabela 17**.

Tabela 16 – Principais genes hiperexpressos no grupo pré-natal (GPN) em relação ao grupo pós-desmame (GPD)

Média GPD (log ²)	Média GPN (log ²)	Variação na magnitude de expressão	Gene	Descrição
6.17	6.33	1.12	<i>Actr5;</i> <i>Mir3474</i>	<i>ARP5 actin-related protein 5; microRNA 3474</i>
10.24	10.4	1.12	<i>Eif4e</i>	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
5.55	5.72	1.13	<i>Inpp5b;</i> <i>Mir698</i>	<i>inositol polyphosphate-5-phosphatase B; microRNA 698</i>
7.47	7.68	1.16	<i>Utp11l</i>	<i>UTP11-like, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, (yeast)</i>
10.91	11.17	1.20	<i>Aldh1a1</i>	<i>aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1</i>
5.21	5.5	1.22	<i>Ctsc</i>	<i>cathepsin C</i>
6.17	6.46	1.23	<i>Pdcl3</i>	<i>phosducin-like 3</i>
2.88	3.18	1.23	<i>Slco4c1</i>	<i>solute carrier organic anion transporter family, member 4C1</i>
7.96	8.27	1.24	<i>Cfap46</i>	<i>cilia and flagella associated protein 46</i>
7.84	8.19	1.28	<i>Rhox8</i>	<i>reproductive homeobox 8</i>
4.31	4.68	1.29	<i>Tlr13</i>	<i>toll-like receptor 13</i>
5.85	6.25	1.32	<i>Wwox</i>	<i>WW domain-containing oxidoreductase</i>
5.99	6.46	1.38	<i>Med27</i>	<i>mediator complex subunit 27</i>
2.86	3.35	1.41	<i>Mirlet7b;</i> <i>Lincppara</i>	<i>microRNA let7b; long intergenic noncoding RNA near Ppara</i>
8.66	9.18	1.44	<i>Txnip</i>	<i>thioredoxin interacting protein</i>
6.98	7.57	1.51	<i>Shbg</i>	<i>sex hormone binding globulin</i>

O gene *Inpp5b* está relacionado ao desenvolvimento embrionário, à espermatogênese e à motilidade do espermatozoide. O gene *Rhox8* está relacionado à espermatogênese, a alterações da motilidade de espermatozoides e ao aumento de apoptose de células germinativas. O gene *Slco4c1* está relacionado à espermatogênese e à diferenciação celular. O gene *Cfap46* está relacionado ao movimento ciliar envolvido na motilidade celular. O gene *Shbg* participa do crescimento de espermátócitos primários.

O gene *Mirlet7b* participa da implantação do embrião e do silenciamento de genes por meio de miRNA. O gene *Eif4e* participa da regulação positiva da mitose e da manutenção da população de células-tronco, assim como o gene *Med27*. O gene *Actr5* está relacionado ao reparo de dano ao DNA.

O gene *Aldh1a1* participa do processo de biossíntese de ácido retinoico, da resposta ao estresse oxidativo, da regulação positiva da apoptose. Também participam da apoptose os genes *Utp11l*, *Ctsc* e *Pdcl3*. O gene *Wwox* participa da apoptose induzida por genotoxicidade e o gene *Txnip* participa do estresse oxidativo e apoptose.

Tabela 17 – Principais genes hipoexpressos no grupo pré-natal (GPN) em relação ao grupo pós-desmame (GPD)

Média GPD (log ²)	Média GPN (log ²)	Variação na magnitude de expressão	Gene	Descrição
10.17	10.09	1.06	<i>Ppp2r5c</i>	<i>protein phosphatase 2, regulatory subunit B, gamma</i>
10.42	10.27	1.11	<i>Coro2a</i>	<i>coronin, actin binding protein 2A</i>
9.1	8.95	1.11	<i>Slc34a2</i>	<i>solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2</i>
7.38	7.12	1.20	<i>Arl2</i>	<i>ADP-ribosylation factor-like 2</i>
7.76	7.5	1.20	<i>Ccndbp1</i>	<i>cyclin D-type binding-protein 1</i>
5.42	5.13	1.22	<i>Adam12; 5830403F22R ik</i>	<i>a disintegrin and metallopeptidase domain 12 (meltrin alpha); RIKEN cDNA 5830403F22 gene</i>
7.29	7.01	1.22	<i>Cdc42ep4</i>	<i>CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 4</i>
5.5	5.18	1.25	<i>Add2</i>	<i>adducin 2 (beta)</i>
6.09	5.66	1.34	<i>Cspg4</i>	<i>chondroitin sulfate proteoglycan 4</i>
4.32	3.84	1.39	<i>Fcrlb</i>	<i>Fc receptor-like B</i>
6.41	5.91	1.41	<i>Shc2</i>	<i>SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 2</i>
6.1	5.59	1.43	<i>Map1a</i>	<i>microtubule-associated protein 1 A</i>

Os genes *Coro2a*, *Cdc42ep4* e *Add2* participam da organização do citoesqueleto de actina. O gene *Map1a* participa da organização dos microtúbulos do citoesqueleto e o gene *Adam12* está envolvido na adesão celular.

O gene *Slc34a2* participa do desenvolvimento embrionário e da resposta ao estrogênio. O gene *Ccndbp1* participa da regulação do ciclo celular. O gene *Cspg4* participa da proliferação celular, da resposta inflamatória pela ativação de MAPK. O gene *Shc2* também participa da ativação de MAPK.

Na comparação entre os GPNPD e GPD, 355 genes apresentaram expressão diferencial. Os principais genes com maior expressão em relação ao GPNPD estão listados na **Tabela 18** e os principais genes com menor expressão em relação ao GPNPD estão listados na **Tabela 19**.

Tabela 18 – Principais genes hiperexpressos no grupo pós-desmame (GPD) em relação ao grupo pré-natal e pós-desmame (GPNPD)

Média GPNPD (log ²)	Média GPD (log ²)	Variação na magnitude de expressão	Gene	Descrição
7.54	7.64	1.07	<i>Gas2l1</i>	<i>growth arrest-specific 2 like 1</i>
6.25	6.4	1.11	<i>Mcam</i>	<i>melanoma cell adhesion molecule</i>
6.49	6.7	1.15	<i>Zfp580</i>	<i>zinc finger protein 580</i>
3.47	3.69	1.16	<i>AI504432</i>	<i>expressed sequence AI504432</i>
5.84	6.05	1.16	<i>Spag6l</i>	<i>sperm associated antigen 6 like</i>
8.91	9.16	1.19	<i>Adrm1</i>	<i>adhesion regulating molecule 1</i>
6.47	6.72	1.19	<i>Aldh3b1</i>	<i>aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1</i>
4.06	4.32	1.19	<i>Fcrlb</i>	<i>Fc receptor-like B</i>
6.87	7.12	1.19	<i>Psmb4</i>	<i>proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 4</i>
4.76	5.02	1.19	<i>Sptbn4</i>	<i>spectrin beta, non-erythrocytic 4</i>
5.15	5.42	1.20	<i>Adam12;</i> <i>5830403F22Rik</i>	<i>a disintegrin and metallopeptidase domain 12 (meltrin alpha); RIKEN cDNA 5830403F22 gene</i>
6.25	6.53	1.21	<i>Nacc2</i>	<i>nucleus accumbens associated 2, BEN and BTB (POZ) domain containing</i>
6.12	6.4	1.21	<i>Nme4</i>	<i>NME/NM23 nucleoside diphosphate</i>

				<i>kinase 4</i>
5.68	5.98	1.23	<i>Six5</i>	<i>sine oculis-related homeobox 5</i>
6.14	6.44	1.24	<i>AI413582</i>	<i>expressed sequence AI413582</i>
7.07	7.38	1.24	<i>Arl2</i>	<i>ADP-ribosylation factor-like 2</i>
6.19	6.5	1.24	<i>Kif19a</i>	<i>kinesin family member 19A</i>
2.89	3.23	1.27	<i>Tceal7</i>	<i>transcription elongation factor A (SII)-like 7</i>
6.02	6.37	1.27	<i>Trim71</i>	<i>tripartite motif-containing 71</i>
6.14	6.49	1.27	<i>Zdhhc16</i>	<i>zinc finger, DHHC domain containing 16</i>
5.98	6.34	1.28	<i>Klhl17</i>	<i>kelch-like 17</i>
5.08	5.43	1.28	<i>Prdm6</i>	<i>actin cytoskeleton organization</i>
5.79	6.14	1.28	<i>Srebf1</i>	<i>PR domain containing 6</i>
7.09	7.48	1.31	<i>Paqr7</i>	<i>sterol regulatory element binding transcription factor 1</i>
6.9	7.29	1.31	<i>Suv420h2</i>	<i>progesterone and adiponectin receptor family member VII</i>
5.84	6.25	1.33	<i>Bach2</i>	<i>suppressor of variegation 4-20 homolog 2 (Drosophila)</i>
5.87	6.33	1.38	<i>Ltc4s</i>	<i>BTB and CNC homology 2</i>
6.18	6.67	1.41	<i>Pdlim2</i>	<i>leukotriene C4 synthase</i>
5.93	6.48	1.47	<i>H2-Q4</i>	<i>PDZ and LIM domain 2</i>
3.95	4.53	1.49	<i>S100a3</i>	<i>histocompatibility 2, Q region locus 4</i>
				<i>S100 calcium binding protein A3</i>

O gene *Spag6l* está relacionado a alterações no flagelo dos espermatozoides e, consequentemente, à infertilidade. O gene *Adrm1* está relacionado ao desenvolvimento de espermatide e de células de Sertoli e de túbulos seminíferos, à via de sinalização de FSH. O gene *Kif19a* participa do movimento celular mediado por microtúbulos e da despolimerização dos microtúbulos dos axonemas. O gene *Pdlim2* participa das junções celulares, necessário para a capacidade migratória das células.

O gene *Srebf1* está envolvido na resposta ao ácido retinoico. O gene *Ltc4s* está envolvido na resposta à substâncias inorgânicas e ao ácido retinoico. O gene *Paqr7* está envolvido na diferenciação celular e na resposta a hormônio esteroide.

O gene *Trim71* está envolvido na proliferação de células-tronco, no silenciamento de genes. O gene *Prdm6* está envolvido em metilação. O gene *Suv420h2* está envolvido na metilação de histonas.

O gene *Sptbn4* está relacionado com processo reprodutivo e com estruturas de actina na formação do citoesqueleto. O gene *Klhl17* está envolvido na organização do citoesqueleto de actina. O gene *Gas2l1* está relacionado à organização dos microtúbulos no citoesqueleto, na regulação do ciclo celular, do crescimento celular e da expressão gênica. O gene *Mcam* está envolvido na adesão celular.

O gene *Zfp580* está envolvido na resposta inflamatória, na regulação positiva de expressão gênica e do movimento de componentes celulares. O gene *Psmb4* está envolvido na regulação negativa da resposta inflamatória. O gene *Aldh3b1* está envolvido na resposta de estresse oxidativo. O gene *Al413582* participa da regulação positiva da conformação das junções comunicantes e da via extrínseca da apoptose, atua na cascata ERK1 e ERK2, regula negativamente o crescimento celular. O gene *Tceal7* participa da regulação negativa de NF-kappaB, e o gene *S100a3* da regulação positiva. O gene *Zdhhc16* está envolvido na apoptose. O gene *Bach2* está envolvido na resposta ao estresse oxidativo. O gene *H2-Q4* está envolvido na resposta imune.

Tabela 19 – Principais genes hipoexpressos no grupo pós-desmame (GPD) em relação ao grupo pré-natal e pós-desmame (GPNPD)

Média GPNPD (log ²)	Média GPD (log ²)	Variação na magnitude de expressão	Gene	Descrição
10.16	10.03	1.09	<i>Cfl1</i>	<i>cofilin 1, non-muscle</i>
9.97	9.85	1.09	<i>Nek2</i>	<i>NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2</i>
5.69	5.55	1.10	<i>Inpp5b; Mir698</i>	<i>inositol polyphosphate-5-phosphatase B; microRNA 698</i>
3.44	3.27	1.12	<i>Tnip3</i>	<i>TNFAIP3 interacting protein 3</i>
10.44	10.24	1.15	<i>Eif4e</i>	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
7.17	6.97	1.15	<i>Tti2</i>	<i>TELO2 interacting protein 2</i>
7.66	7.46	1.15	<i>Zscan2</i>	<i>zinc finger and SCAN domain containing 2</i>

6.95	6.74	1.16	<i>Bco1</i>	<i>beta-carotene oxygenase 1</i>
8.37	8.16	1.16	<i>Rcor1</i>	<i>REST corepressor 1</i>
10.99	10.76	1.17	<i>Pdzd8</i>	<i>PDZ domain containing 8</i>
10.02	9.8	1.17	<i>Senp2</i>	<i>SUMO/sentrin specific peptidase 2</i>
9.09	8.85	1.18	<i>Emsy</i>	<i>EMSY, BRCA2-interacting transcriptional repressor</i>
9.3	9.07	1.18	<i>Ncoa6</i>	<i>nuclear receptor coactivator 6</i>
7.86	7.61	1.18	<i>Nr1d1</i>	<i>nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1</i>
8.43	8.18	1.19	<i>Mre11a</i>	<i>meiotic recombination 11 homolog</i>
7.87	7.6	1.20	<i>Itgb3bp</i>	<i>integrin beta 3 binding protein (beta3-endonexin)</i>
8.8	8.52	1.21	<i>Spef2</i>	<i>sperm flagellar 2</i>
4.16	3.88	1.22	<i>Bmp5</i>	<i>bone morphogenetic protein 5</i>
10.33	10.05	1.22	<i>Ceacam2</i>	<i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 2</i>
5.07	4.79	1.22	<i>Sox1</i>	<i>SRY (sex determining region Y)-box 1</i>
7.64	7.35	1.22	<i>Whsc1l1</i>	<i>Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1 (human)</i>
7.49	7.17	1.25	<i>Arid4b</i>	<i>AT rich interactive domain 4B (RBP1-like)</i>
8.19	7.84	1.27	<i>Rhox8</i>	<i>reproductive homeobox 8</i>
6.64	6.28	1.29	<i>Gm6297; Aptx</i>	<i>predicted gene 6297; aprataxin</i>
5.21	4.85	1.29	<i>Rian</i>	<i>RNA imprinted and accumulated in nucleus</i>
7.14	6.77	1.30	<i>Tiparp</i>	<i>TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase</i>
9.97	9.58	1.31	<i>Ak7</i>	<i>adenylate kinase 7</i>
10.87	10.48	1.31	<i>Cylc2</i>	<i>cylicin, basic protein of sperm head cytoskeleton 2</i>
6.03	5.64	1.31	<i>Tnfaip3</i>	<i>tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3</i>
6.82	6.42	1.32	<i>Haus2</i>	<i>HAUS augmin-like complex, subunit 2</i>
9.83	9.4	1.36	<i>Ttll1</i>	<i>tubulin tyrosine ligase-like 1</i>
6.5	5.99	1.42	<i>Med27</i>	<i>mediator complex subunit 27</i>
7.25	5.97	2.43	<i>Ly96</i>	<i>lymphocyte antigen 96</i>
6.24	5.71	1.45	<i>Hus1b</i>	<i>Hus1 homolog b (S. pombe)</i>
6.3	5.55	1.69	<i>Casp8</i>	<i>caspase 8.</i>
9.85	9.08	1.71	<i>Prss42</i>	<i>protease, serine 42</i>

8.71	7.87	1.79	<i>Ap1ar</i>	<i>adaptor-related protein complex 1 associated regulatory protein</i>
------	------	------	--------------	--

O gene *Inpp5b* está envolvido no desenvolvimento embrionário, na espermatogênese e na motilidade do espermatozoide. O gene *Zscan2* participa da espermatogênese. O gene *Spef2* está envolvido na fertilização, no desenvolvimento do sistema imune, na espermatogênese, na morfogênese ciliar e na conformação do axonema. O gene *Bmp5* está envolvido no desenvolvimento da genitália masculina, na regulação negativa da proliferação celular e de processos de biossíntese de esteroides, na regulação da apoptose. O gene *Arid4b* participa da regulação da expressão gênica por imprinting, de metilação de histonas, na formação da BHT.

O gene *Tiparp* participa do metabolismo de androgênio e de estrógeno, do desenvolvimento pós-embrionário, da regulação negativa da expressão gênica, da resposta celular a compostos orgânicos cíclicos. O gene *Ak7* participa da espermatogênese, da resposta inflamatória a estímulos antigênicos, do movimento ciliar e da conformação do axonema e da organização da projeção celular. O gene *Cylc2* codifica proteínas constituintes do citoesqueleto. O gene *Ttll1* participa da morfogênese, da organização e do movimento dos cílios, e da conformação do axonema. O gene *Prss42* participa do desenvolvimento de células germinativas e da espermatogênese. O gene *Ap1ar* participa da regulação negativa da motilidade celular. O gene *Bco1* participa de processos metabólicos de retinoides.

O gene *Ceacam2* participa de processos de adesão celular, regulação negativa da produção de IL e da cascata JNK e ativação positiva de células T. O gene *Cfl1* participa da regulação negativa do tamanho celular, da organização do citoesqueleto, da despolarização dos filamentos de actina. O gene *Pdzd8* participa da organização do citoesqueleto. O gene *Itgb3bp* está envolvido no ciclo celular, na divisão nuclear durante a mitose, na transcrição de DNA e na via de sinalização mediada por integrinas.

O gene *Nek2* participa de processos de mitose e meiose, participando do controle da separação dos centrôssomos e na condensação de cromatina, respectivamente. O gene *Rian* participa da regulação negativa da proliferação celular.

O gene *Tnfaip3* participa de resposta imune e inflamatória, e da regulação negativa da via extrínseca da apoptose. O gene *Ly96* participa de resposta inflamatória.

Os genes *Tti2*, *Emsy* e *Ncoa6*, *Gm6297* participam da resposta ao dano de DNA. O gene *Rcor1* participa da regulação negativa da transcrição de RNA e da desacetilação de histonas. O gene *Whsc1l1* está envolvido na regulação da transcrição de DNA e na metilação de histonas. O gene *Mre11a* participa do reparo ao dano de DNA, regula negativamente a apoptose. O gene *Hus1b* participa do controle de checagem da integridade de DNA durante a mitose e a meiose, de reparo ao dano de DNA.

Na comparação entre os GPNPD e GPN, 207 genes apresentaram expressão diferencial. Os principais genes com maior expressão em relação ao GPNPD estão listados na **Tabela 20** e os principais genes com menor expressão em relação ao GPNPD estão listados na **Tabela 21**.

Tabela 20 – Principais genes hiperexpressos no grupo pré-natal (GPN) em relação ao grupo pré-natal e pós-desmame (GPNPD)

Média GPNPD (log ²)	Média GPN (log ²)	Variação na magnitude de expressão	Gene	Descrição
5.82	6.05	1.17	<i>Agt</i>	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)
4.1	4.38	1.21	<i>G6pc</i>	glucose-6-phosphatase, catalytic
5.9	6.19	1.22	<i>Il17rc</i>	interleukin 17 receptor C
3.39	3.7	1.24	<i>Clec4d</i>	C-type lectin domain family 4, member d
4.37	4.68	1.24	<i>Tlr13</i>	toll-like receptor 13
6.25	6.57	1.25	<i>Arl6ip5</i>	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 5
4.19	4.51	1.25	<i>Dock10</i>	dedicator of cytokinesis 10
6.3	6.62	1.25	<i>Esr1</i>	estrogen receptor 1 (alpha)
4.74	5.06	1.25	<i>Perp</i>	PERP, TP53 apoptosis effector

4.1	4.45	1.27	<i>H2-M10.2</i>	<i>histocompatibility 2, M region locus 10.2</i>
4.12	4.47	1.28	<i>Capg</i>	<i>capping protein (actin filament), gelsolin-like</i>
2.87	3.22	1.28	<i>Klra10; Klra3</i>	<i>killer cell lectin-like receptor subfamily A, member 10; killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 3</i>
4.49	4.88	1.31	<i>Fos</i>	<i>FBJ osteosarcoma oncogene</i>
5.03	5.5	1.38	<i>Ctsc</i>	<i>cathepsin C</i>
5.5	5.98	1.39	<i>Clec2d</i>	<i>C-type lectin domain family 2, member d</i>
3.92	4.45	1.44	<i>Dsp</i>	<i>desmoplakin</i>
4.42	5.16	1.67	<i>Timp1</i>	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase 1</i>

O gene *Esr1* está relacionado à redução na produção e motilidade de esperma. O gene *Perp* está relacionado à apoptose, adesão celular. O gene *G6pc* está envolvido em processos metabólicos de esteroides e na regulação da expressão gênica. O gene *Fos* participa da gametogênese, está relacionado a alterações nos túbulos seminíferos (luz aumentada) e alterações na espermatogênese, com oligospermia.

O gene *Dock10* participa de processos de migração celular. O gene *Capg* participa da organização da projeção celular e dos filamentos de actina. Os genes *Klra10* e *Klra3* participam de processos de adesão celular. O gene *Dsp* participa da organização dos desmossomos, das junções aderentes, dos filamentos intermediários do citoesqueleto.

O gene *Il17rc* participa de processo inflamatório. Os genes *Clec4d*, *Tlr13* e *H2-M10.2* participam de resposta imune. O gene *Arl6ip5* participa da regulação positiva da via intrínseca da apoptose em resposta ao estresse oxidativo. O gene *Timp1* participa da apoptose.

Tabela 21 – Principais genes hipoexpressos no grupo pré-natal (GPN) em relação ao grupo pré-natal e pós-desmame (GPNPD)

Média GPNPD (log ²)	Média GPN (log ²)	Variação na magnitude de expressão	Gene	Descrição
10.21	10.09	1.09	<i>Ppp2r5c</i>	<i>protein phosphatase 2, regulatory subunit B, gamma</i>
9.76	9.62	1.11	<i>Ttll6</i>	<i>tubulin tyrosine ligase-like family, member 6</i>
5.53	5.35	1.13	<i>Pate2</i>	<i>prostate and testis expressed 2</i>
8.48	8.29	1.14	<i>Cfap221</i>	<i>cilia and flagella associated protein 221</i>
5.96	5.76	1.15	<i>Noct</i>	<i>nocturnin</i>
6.04	5.82	1.16	<i>Bend3</i>	<i>BEN domain containing 3</i>
7.73	7.5	1.17	<i>Ccndbp1</i>	<i>cyclin D-type binding-protein 1</i>
4.35	4.05	1.23	<i>Cerkl</i>	<i>ceramide kinase-like</i>

O gene *Ttll6* está envolvido na regulação positiva do movimento ciliar e na estruturação dos microtúbulos. O gene *Cfap221* também está envolvido no movimento ciliar, na organização de projeção das células.

O gene *Bend3* está envolvido na metilação de DNA, na acetilação e trimetilação de histonas. O gene *Cerkl* participa da regulação negativa da apoptose.

9. *Discussão*

Este estudo foi o primeiro a avaliar experimentalmente os efeitos da exposição a uma concentração controlada de poluentes da atmosfera da cidade de São Paulo sobre os testículos, não apenas do ponto vista histológico, como também, do ponto de vista molecular.

A utilização de um modelo animal sempre vem acompanhada da ideia de extrapolação dos resultados para os humanos, respeitando as diferenças conhecidas (ou nem sempre) entre eles.

Primeiro, há de se verificar como o sistema respiratório de roedores se compara ao dos humanos, considerando ser a via inalatória a principal rota de exposição do modelo toxicológico empregado. Apesar das diferenças estruturais e alométricas entre os sistemas respiratórios de humanos e roedores, a deposição qualitativa de partículas nos pulmões de ambos é similar, uma vez que aquelas com 2,5 μm ou menos de tamanho também são consideradas inaláveis nos roedores (Stanek, Brown et al. 2011). A partir disso, supõe-se a absorção sistêmica do MP e a viabilidade do modelo utilizado.

Segundo, há de se considerar o método utilizado para a exposição ao $\text{MP}_{2,5}$. As principais vantagens do uso do CPA recaem sobre os fatos de se garantir, qualitativamente, que o ar que os animais receberam era composto pela fração inalável fina do MP e, quantitativamente, de ser possível controlar a concentração a que foram expostos.

Apesar disso, também é importante considerar que o ambiente controlado, do ponto de vista de alimentação, ciclo sono/vigília, moradia e bem-estar dos animais diferem, em grande parte, da rotina das pessoas que vivem em uma cidade urbanizada como São Paulo.

Na Região Metropolitana de São Paulo, a CETESB (2015, 2016) monitora a qualidade do ar com um sistema de estações que coletam amostras distribuídas por vários pontos da região. Dentre as estações, 11 amostram $\text{MP}_{2,5}$ e a estação Cerqueira César, instalada na área do jardim da Faculdade de Saúde Pública da USP, se localiza a cerca de 65 m do local onde o CPA está instalado.

A composição do $MP_{2,5}$ a que os camundongos foram expostos no nosso estudo é, sem dúvidas, característica de locais urbanizados que possuem altas emissões provenientes de veículos automotores e de indústrias em geral e que, com pequenas diferenças, se assemelha ao particulado de outros locais do mundo que compartilham das mesmas características.

Com todas as associações já estabelecidas dos efeitos nocivos da poluição atmosférica na saúde, é fato que todas as ações voltadas para a redução das concentrações dos poluentes sejam tomadas. Vale destacar que, de acordo com a OMS, não há evidências de um nível de exposição seguro ou de um limiar abaixo do qual não ocorram efeitos adversos para a saúde (WHO 2013). Por isso, a ideia que deve permanecer no âmbito da saúde pública é a de quanto menos poluentes, menos malefícios, o que justifica valores mais rigorosos de padrões de qualidade do ar.

Além disso, ainda não há uma caracterização suficiente da composição do particulado para relacionar seus efeitos a um ou outro componente específico. O comitê do Departamento de Saúde do Reino Unido, que avalia os efeitos da poluição atmosférica na saúde, afirma que nenhuma substância isolada é suficientemente tóxica para causar a magnitude dos efeitos observados (Morakinyo, Mkgobu et al. 2016, Snider, Weagle et al. 2016, Carre, Gatimel et al. 2017).

É importante registrar que há poucos estudos na literatura com o mesmo desenho experimental que o nosso. As diferenças metodológicas passam pelo modelo animal adotado (camundongo, rato), pelo poluente atmosférico empregado ($MP_{2,5}$, MP_{10} , diesel, poluição atmosférica ambiente, poluentes isolados como ozônio, metais), pelo período (durante a gestação, apenas na idade adulta), duração (aguda ou crônica) e via (inalatória, intraperitoneal) de exposição; e, claro, pelos desfechos avaliados.

Na avaliação do peso corporal dos animais, observamos que não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Mesmo assim, ao analisarmos os valores das médias de cada grupo, verificamos que os animais do GPN foram os mais pesados, seguidos pelos animais do GPNPD. De fato, a análise multivariada mostrou um efeito significativo da exposição pré-natal sobre essa variável, de onde podemos

concluir que a exposição ao MP_{2,5} durante a gestação acarreta em alterações no peso do corpo que perduram até a idade adulta.

O mesmo não aconteceu no peso dos órgãos analisados. Ou seja, nem os testículos, nem os epidídimos tiveram seus pesos aumentados devido à exposição gestacional. Daí, podemos especular que mecanismos sistêmicos fora do sistema reprodutor tenham sido alterados e a investigação aprofundada de quais seriam esses fatores está além do escopo do nosso estudo.

Os epidídimos dos animais do GPNPD foram os mais pesados dentre os grupos, inclusive tendo diferença significativa em relação ao controle. Pela análise multivariada, inferimos que a exposição pós-natal tenha tido mais influência sobre esse resultado. Apesar de o GPD não ter apresentado diferença significativa, os pesos dos epidídimos desses animais também foram maiores em relação ao controle. Talvez esse resultado pudesse adquirir significância estatística se o número de animais amostrados tivesse sido maior.

O peso dos testículos dos animais dos grupos GPNPD e GPD foram os maiores dentre os grupos, confirmando os resultados da análise multivariada, da maior influência da exposição pós-natal sobre essa variável. O mesmo raciocínio pode ser aplicado ao volume dos testículos, uma vez que ele é derivado do peso do órgão. Apesar de os valores do GPN terem sido os menores, e significativamente diferentes do GPNPD, essa diferença não aconteceu em relação ao GC, como no estudo de Pires et al (2011). Na comparação com o GC, o gene *Egr1* estava hiperexpresso no GPN, o que poderia explicar a redução no peso do órgão e no diâmetro dos túbulos seminíferos, uma vez que, segundo o banco de dados, este gene parece estar relacionado com o peso do testículo e com o tamanho dos túbulos seminíferos. Talvez se o número de amostras tivesse sido maior, poderíamos ter encontrado resultados significativos. Semelhantemente, no estudo de Pires et. al (2011) o diâmetro dos túbulos seminíferos foi significativamente menor no grupo pré-natal em relação ao grupo controle.

O aumento do peso do testículo pode ser resultado de dilatação tubular, que geralmente, é acompanhado de espessamento do epitélio seminífero e aumento da luz tubular (Creasy, Bube et al. 2012). Apesar de os animais do GPNPD terem tido os órgãos com o maior peso dentre os grupos, nossos resultados não evidenciaram características de dilatação tubular, uma vez que não houve diferença entre os grupos nem no diâmetro nem no volume da luz dos túbulos.

O IGS também é derivado do peso dos testículos, porém, apesar de a análise multivariada ter identificado influências significativas da exposição pós-desmame e da soma da exposição pré-natal com a pós-desmame, não houve diferença significativa do GPNPD em relação ao GC. Isso se deve à influência do peso corporal dos animais no cálculo do índice. Ou seja, o GPNPD teve o maior IGS dentre os grupos, que não foi significativo pois o peso corporal desses animais não foi o maior. Isso ocorreu com o GPN que, com o maior peso corporal e o menor peso dos testículos, obteve o menor IGS entre os grupos, que diferiu significativamente do GPNPD.

No estudo de Pires, de Melo et al. (2011), realizado no LPAE, os animais foram expostos à poluição atmosférica ambiente em câmaras localizadas na FMUSP, 24 hs por dia, 7 dias na semana. A geração parental foi exposta à poluição por 120 dias. Após o acasalamento, as fêmeas gestantes permaneceram nas câmaras de exposição e logo após o nascimento os 4 grupos foram formados (controle, pré-natal, pós-natal, pré e pós-natal) com as mães e respectivas proles. Ou seja, tanto os pais quanto as mães dos machos avaliados foram expostos à poluição antes de acasalarem, e os animais foram expostos durante o período de amamentação. Os parâmetros foram avaliados aos 90 dias de idade. Com relação ao peso corporal, peso e volume dos testículos, os valores dos grupo pré-natal foram significativamente menores que os do grupo controle para todos os parâmetros ($20,10 \pm 0,76 \times 27,08 \pm 0,55$; $89,91 \pm 3,81 \times 105,40 \pm 3,15$; $0,09 \pm 0,00 \times 0,11 \pm 0,00$, respectivamente). O IGS desse grupo também diferiu significativamente em relação ao grupo controle, apresentando valores maiores ($8,95 \pm 0,33 \times 7,76 \pm 0,16$). Os valores de peso corporal não apresentaram diferença significativa, apesar de o GPN ter apresentado o maior valor. Em relação ao peso e ao volume dos testículos, os resultados são semelhantes aos nossos. Os testículos do GPN

foram menos pesados e os volumes menores, porém, com diferença significativa não em relação ao GC, mas em relação ao GPNPD. Os valores para IGS mantiveram o mesmo padrão, diferindo estatisticamente não do GC, mas do GPNPD, porém, com valores menores.

No trabalho publicado em 1999, Yoshida, Sagai et al. (1999) expuseram camundongos machos, com 6 semanas de vida, a diferentes concentrações de diesel, por via inalatória. O peso dos animais foi significativamente maior nos grupos tratados com as doses de 0,3 e 1,0, mas não com a dose de 3,0 mg/m³. Os pesos dos testículos e dos epidídimos apresentaram o mesmo padrão e, curiosamente, o grupo tratado com a menor dose apresentou valores maiores que o grupo controle e os grupos com maiores doses apresentaram valores menores do que os do grupo controle, mas nenhum desses parâmetros foi significativamente diferente em comparação ao controle. A avaliação histológica do testículo revelou edema intersticial, alterações degenerativas e necróticas nos túbulos seminíferos, descamação do epitélio seminífero e perda de espermatozoides em todos os grupos tratados com diesel. Não foram constatadas alterações ultra estruturais nas células de Sertoli, porém, nas de Leydig foram encontrados mielina e aumento de gotículas lipídicas. Além disso, a expressão de mRNA do receptor de LH foi 20% reduzida nos grupos tratados em comparação com o controle. O mesmo não aconteceu com o mRNA do receptor de FSH, confirmando que as células de Sertoli estavam inalteradas. A produção diária de esperma foi reduzida, de maneira progressiva nos grupos tratados, em relação ao grupo controle.

Quando comparamos os resultados desses estudos com os dados do nosso grupo exposto apenas no período após o nascimento (GPD), há divergências em relação ao peso corporal e semelhanças em relação aos órgãos analisados. O peso corporal dos nossos animais foi praticamente o mesmo do GC e o peso dos órgãos foi ligeiramente maior. As degenerações visualizadas nos testículos foram um pouco diferentes das encontradas no nosso estudo, por exemplo, em relação à necrose. Isso pode ser explicado pela exposição ao diesel, mais tóxico que o MP no estudo de Yoshida, e pela duração do tempo de exposição dos animais, maior em ambos os estudos.

Em um outro estudo, Yoshida, Ono et al. (2006) analisaram os efeitos das mesmas concentrações crescentes de diesel, porém, no período gestacional. O peso dos animais dos grupos expostos às maiores concentrações de diesel (1,0 e 3,0 mg/m³) foram significativamente maiores do que os dos demais grupos (controle e 0,3 mg/m³). O peso dos testículos e dos epidídimos também foram significativamente maiores nos grupos expostos às maiores concentrações de diesel. Concentrações menores de testosterona se correlacionaram com a expressão de enzimas esteroidogênicas nos grupos tratados. Nos nossos resultados, o gene *Cyp2c68*, que participa da hidroxilação de esteroides, estava hiperexpresso no GPN em relação ao GC, porém, não incluímos a dosagem de testosterona em nosso estudo.

Para avaliar os efeitos da exposição ao diesel na função reprodutiva, Watanabe e Oonuki (1999) dividiram ratas prenhas em 3 grupos no 19º dia de gestação (3 dias antes do parto): um grupo que foi exposto ao escape de diesel total (incluindo MP e NO₂), um grupo que recebeu o diesel filtrado (sem MP) e um terceiro grupo exposto ao ar filtrado. Os machos das ninhadas, divididos nos 3 grupos, receberam as exposições do nascimento até 90 dias. Os pesos corporal, dos testículos e dos epidídimos não mostrou diferença significativa entre os grupos, semelhantemente aos nossos resultados do GPD. A análise histológica revelou redução no número de espermatídes e aumento de degeneração de células intermediárias entre espermatócitos e espermatídes nos grupos expostos ao diesel (Watanabe and Oonuki 1999). De maneira geral, os resultados de degeneração descritos são semelhantes aos verificados no grupo do nosso estudo que mais se assemelha ao desenho metodológico do estudo em questão, o GPD, mesmo que a exposição tenha sido ao diesel e que tenha ocorrido durante o período da amamentação.

As consequências do diesel no sistema reprodutivo masculino de camundongos adultos foram avaliadas quanto à exposição durante o período gestacional. Para tal Hemmingsen e cols (2009) expuseram fêmeas prenhas à poluição de diesel. Após o nascimento, os machos eutanasiados com 170 dias de vida. Dos desfechos avaliados, não houve diferença estatística significativa para o peso corporal e do testículo, ao contrário dos nossos resultados. Porém, os animais do grupo exposto durante a

gestação tiveram uma produção diária de espermatozoides significativamente menor que a do grupo dos animais não expostos. O estudo também avaliou a expressão de alguns genes nos testículos, que incluiu receptores de estrógenos, de andrógenos, de FSH e de LH, além de CYP19 e aquaporinas (7, 8 e 9). Não houve diferença significativa na expressão desses genes entre os grupos, o mesmo que ocorreu nos nossos resultados (Hemmingsen, Hougaard et al. 2009).

No estudo de Cao, Shen et al. (2017), ratos com cerca de 50 dias foram divididos em 3 grupos: um grupo que recebeu dose baixa de PM_{2,5} (dose de 10 mg/Kg/peso, via intratecal), outro grupo que recebeu dose alta (20 mg/Kg/peso, via intratecal) e o terceiro grupo, sem administração do particulado, foi o controle. Os resultados mostraram que, em relação a marcadores de espermatogênese, não houve diferença significativa entre o grupo baixa dose e o controle, mas houve entre o grupo alta dose e o controle em relação à expressão de *Plzf*, *Stra8*, *Dmc1* e *Scp3*, que estavam diminuídas. Em ambos os grupos tratados, houve significativamente maior atividade de superóxido dismutase (antioxidante que age no estresse oxidativo) e, também, maiores taxas de apoptose, em relação ao grupo controle. Nossos resultados não mostraram expressão diferenciada desses genes entre os grupos, porém, vários outros genes envolvidos nas vias de espermatogênese, de estresse oxidativo e de apoptose apresentaram expressão diferencial.

Os resultados descritos nesse estudo de Cao, Shen et al. (2017) são consequência de uma dose de MP, ou seja, de exposição aguda, administrada por via intratecal. As alterações apresentadas são decorrentes de uma resposta imediata do organismo frente a agentes tóxicos, contrapondo a nossa ideia de que a exposição crônica possa criar um ambiente adaptado à presença dos toxicantes, alterando o padrão de alterações e de marcadores de lesão. Dependendo da dose, da via de exposição e de outros fatores, incluindo o método de análise, a detecção das alterações pode se tornar mais difícil.

O estudo de Pires et al. (2011) é o que mais se assemelha com o nosso, pois o padrão de exposição dos 4 grupos foi o mesmo, as análises foram realizadas em animais com 90 dias de idade, a exposição à poluição ocorreu praticamente no mesmo

local da cidade. Ele mostrou claramente que a exposição à poluição atmosférica durante o período pré-natal foi a mais implicada nas alterações significativas encontradas entre os grupos. No nosso estudo, a exposição após o nascimento obteve mais destaque nesse sentido. Duas diferenças metodológicas entre os estudos são fundamentais e, talvez possam explicar essas diferenças: no estudo de Pires et al. os animais foram expostos à poluição atmosférica total, 24 hs por dia, todo o período de duração do experimento; e a geração parental foi exposta à poluição. Os camundongos utilizados no nosso estudo são de uma linhagem criada há bastante tempo no biotério do LAPAE, ou seja, são várias gerações de fêmeas e machos que nunca foram expostos à poluição atmosférica e não houve exposição durante o período de amamentação em nosso experimento.

A avaliação qualitativa da espermatogênese pelo escore de Johsen resultou em valores altos para todos os grupos, considerando que a nota máxima é 10 e reflete a espermatogênese ocorrendo perfeitamente. Mais uma vez, a análise multivariada apontou um efeito significativo maior da exposição do período pós-desmame nos resultados. De fato, os grupos GPNPD e GPD apresentaram as menores médias, que diferiram significativamente em relação ao GC.

O fato de os grupos dos animais que foram expostos ao MP_{2,5} terem tido médias altas demonstra que, apesar das alterações encontradas, também haviam secções de túbulos seminíferos com aparente função normal. Isso quer dizer que as alterações não eram generalizadas levando-nos a inferir que esses animais poderiam não ser inférteis, mas talvez, subférteis. Nesse sentido, os achados em relação a alteração da expressão de genes relacionados à gametogênese podem explicar tal fenótipo, reforçado pela hiperexpressão dos genes *Fos* e *Egr1*, por exemplo, que estão relacionados à oligospermia.

As alterações encontradas relacionadas ao escore de Johnsen compõem caracteristicamente a degeneração tubular, que é consequência das alterações das células germinativas, que pode ser mediada por lesão nas células de Sertoli, citotoxicidade direta, hipóxia, inflamação ou outros. Histologicamente, células multinucleadas, retenção de espermátide, degeneração de células germinativas,

vacuolização do citoplasma das células de Sertoli, desorganização das células germinativas, exfoliação de células germinativas para a luz tubular, perda parcial segmentar de células germinativas, geralmente associada com redução do peso do órgão, são alguns achados característicos dessa condição. Para agentes tóxicos, em geral, é célula-específica e estágio-específica inicialmente, mas com a continuação da exposição, a degeneração celular se torna mais generalizada e inespecífica (Creasy, Bube et al. 2012).

As espermatogônias são as células germinativas mais vulneráveis à agentes tóxicos, porque se situam fora da BHT, pela sua intensa atividade mitótica e pela exposição direta ao fluido intersticial dos túbulos seminíferos. São vulneráveis à apoptose por mecanismos fisiológicos, deficiência androgênica ou citotoxicidade. Podem ser alvo de agentes que alterem a citocinese, podendo levar a formação de células gigantes multinucleadas, que também podem ocorrer em decorrência da incapacidade da célula de Sertoli em manter as junções celulares entre as células germinativas. As células gigantes multinucleadas também podem ser formadas por espermátides (Creasy, Bube et al. 2012).

Apesar de serem menos propensas à apoptose e à necrose em relação às células germinativas, a toxicidade nas células de Sertoli pode se manifestar como uma variedade de efeitos morfológicos, incluindo alterações nas células germinativas.

A exfoliação de células germinativas para a luz tubular pode ser consequência da ruptura das junções celulares nas células de Sertoli, que podem ser resultado de lesão direta na célula de Sertoli ou de um evento secundário relacionado à lesão nas células germinativas (Creasy, Bube et al. 2012, Johnson 2014).

Os corpos residuais atípicos ocorrem quando as espermátides em alongamento não maturam adequadamente e/ou quando as células de Sertoli não conseguem processar os corpos residuais adequadamente. A perda de orientação das espermátides, com posicionamento anormal das cabeças de espermátides para a luz tubular visualizada em alguns túbulos, pode ser em decorrência de alterações na especialização ectoplásmica apical (O'Donnell 2014).

A retenção de espermatídes é uma alteração funcional do processo de espermição, que pode ser devido a alterações nas células de Sertoli ou nas próprias espermatídes, ou por redução de testosterona. Alterações no citoesqueleto de actina das células de Sertoli parecem comprometer a espermição. É frequentemente associada a anormalidades em parâmetros do espermatozoide, como número, motilidade e/ou morfologia podendo, portanto, estar associada à redução da fertilidade (Creasy, Bube et al. 2012, Johnson 2014). Os nossos resultados mostraram diversos genes com expressão diferenciada, que estão envolvidos na conformação do citoesqueleto, nas junções e no movimento celulares, como *Eln*, *Ttll9*, *Arl2*, *Tinagl1*, *Cfap221*, *Cfap46*, *Agt*, *Inpp5b*, *Rhox8*, *Spag6l*, *Inpp5b*, *Spef2*, *Esr1*, *Ttll6* entre outros.

Para registro, não foram encontrados na literatura estudos com exposição à poluição atmosférica que tenham utilizado métodos estereológicos, isolados ou juntamente com o escore de Johnsen para avaliação de parâmetros testiculares.

Em relação à não exposição dos animais durante o período pós-natal, devemos considerar que do ponto de vista da gônada, durante o período pós-natal há a finalização do desenvolvimento do órgão, o início do primeiro ciclo do epitélio seminífero e a produção de espermatozoides ocorrendo por volta dos 30 dias de vida. Apesar de se esperar que a exposição ao MP nesse período pudesse influenciar na qualidade da espermatogênese, um ponto a ser destacado é uma possível adaptação do organismo frente à cronicidade da exposição o que poderia, na idade adulta, não ter impacto expressivo na gametogênese (reprogramação fetal).

Em suma, a exposição no período pré-natal tendeu a reduzir características dos testículos (peso, IGS e volume), porém, com tendência a aumentar as de aspectos relacionados a áreas dos túbulos seminíferos (superfície e seccional). Das estruturas tubulares, uma redução dos volumes do epitélio e da luz levaram ao aumento do volume do interstício.

A exposição exclusiva do período pós-desmame até a idade adulta tendeu a aumentar as características dos testículos (peso e volume), bem como as áreas de superfície e seccional tubulares. Um aumento importante do volume do epitélio

seminífero foi acompanhado por reduções nos volumes da luz tubular e do interstício. Ainda, houve piora da qualidade da espermatogênese.

A exposição ocorrida tanto no período pré-natal quanto no período do pós-desmame até a idade adulta implicou em resultados semelhantes ao da exposição isolada no período pós-desmame, porém, com maior número de parâmetros significativas do ponto de vista estatístico.

Sendo assim, podemos inferir que a exposição após o nascimento teve maior influência sobre os efeitos encontrados nos parâmetros analisados.

Conforme esperado, identificamos diversos genes com alteração da expressão que fazem parte das vias de resposta imune, de estresse oxidativo e de apoptose. Vale ressaltar, porém, que o efeito final da hiper ou da hipoexpressão desses genes, bem como a interação entre eles, nem sempre é conhecida, o que não nos permitiu aprofundar a discussão acerca desses aspectos.

Os nossos resultados contribuem para a construção do conhecimento dos efeitos nocivos da poluição atmosférica relacionados à reprodução. Porém, muito falta a ser esclarecido o que torna este, um vasto campo de estudo a ser explorado.

Ainda, esperamos que esses resultados também possam ser utilizados nas discussões a respeito da adoção de políticas públicas que visam a redução do impacto dos efeitos da poluição no meio ambiente e na saúde da população.

10.

Conclusões

Os resultados deste estudo confirmaram que diferentes cenários de exposição ao MP_{2,5} resultaram em diferentes efeitos sobre os parâmetros analisados:

- ⇒ Para os parâmetros morfométricos e da espermatogênese:
 - os efeitos decorrentes da exposição exclusiva no período pré-natal apresentaram um padrão diferente daquele observado nos demais cenários;
 - houve um padrão de semelhança entre os efeitos observados nas exposições ocorridas do período pós-desmame até a idade adulta e naquela ocorrida tanto no período pré-natal quanto do pós-desmame até a idade adulta;
- ⇒ Para a expressão gênica:
 - o padrão de expressão gênica observado foi distinto entre os grupos e parece se relacionar às alterações histológicas observadas;
 - houve expressão diferencial de diversos genes envolvidos nas funções testiculares;
 - houve expressão diferencial de diversos genes envolvidos nas vias de resposta ao dano de DNA, de resposta imune, de estresse oxidativo e de apoptose.

Referências

3DHISTECH (2005). Panoramic Viewer. Budapest, 3DHISTECH.

Abbing-Karahagopian, V., A. C. van der Gugten, C. K. van der Ent, C. Uiterwaal, M. de Jongh, M. Oldenwening, B. Brunekreef and U. Gehring (2012). "Effect of endotoxin and allergens on neonatal lung function and infancy respiratory symptoms and eczema." Pediatr Allergy Immunol **23**(5): 448-455.

Abel, M. H., P. J. Baker, H. M. Charlton, A. Monteiro, G. Verhoeven, K. De Gendt, F. Guillou and P. J. O'Shaughnessy (2008). "Spermatogenesis and sertoli cell activity in mice lacking sertoli cell receptors for follicle-stimulating hormone and androgen." Endocrinology **149**(7): 3279-3285.

Adhikari, A., T. Reponen, S. A. Grinshpun, D. Martuzevicius and G. LeMasters (2006). "Correlation of ambient inhalable bioaerosols with particulate matter and ozone: a two-year study." Environ Pollut **140**(1): 16-28.

al-Sudairy, A. and K. Howard (1992). "Dietary habits of technical and vocational students in Riyadh, Saudi Arabia--Part II. Eating between meals." J R Soc Health **112**(6): 271-272.

Anderson, E. L., A. E. Baltus, H. L. Roepers-Gajadien, T. J. Hassold, D. G. de Rooij, A. M. van Pelt and D. C. Page (2008). "Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(39): 14976-14980.

Andre, V., S. Billet, D. Pottier, J. Le Goff, I. Pottier, G. Garcon, P. Shirali and F. Sichel (2011). "Mutagenicity and genotoxicity of PM2.5 issued from an urbano-industrialized area of Dunkerque (France)." J Appl Toxicol **31**(2): 131-138.

AVMA (2013). Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. A. V. M. Association. Schaumburg: 102.

Barret, K., S. Barman, S. Boitano and H. Brooks (2010). Ganong Fisiologia Médica. Álvaro Obregón, McGraw-Hill Companies.

Beardsley, A. and L. O'Donnell (2003). "Characterization of normal spermiation and spermiation failure induced by hormone suppression in adult rats." Biol Reprod **68**(4): 1299-1307.

Bell, M. L., K. Belanger, K. Ebisu, J. F. Gent, H. J. Lee, P. Koutrakis and B. P. Leaderer (2010). "Prenatal exposure to fine particulate matter and birth weight: variations by particulate constituents and sources." Epidemiology **21**(6): 884-891.

Bell, M. L., K. Ebisu, R. D. Peng, J. M. Samet and F. Dominici (2009). "Hospital admissions and chemical composition of fine particle air pollution." Am J Respir Crit Care Med **179**(12): 1115-1120.

Blake JA, E. J., Kadin JA, Richardson JE, Smith CL, Bult CJ, and the Mouse Genome Database Group 2017 (2017). "Mouse Genome Database (MGD)-2017: community knowledge resource for the laboratory mouse." Nucl. Acids Res **4**(45): D723-729.

Bowers, R. M., A. P. Sullivan, E. K. Costello, J. L. Collett, Jr., R. Knight and N. Fierer (2011). "Sources of bacteria in outdoor air across cities in the midwestern United States." Appl Environ Microbiol **77**(18): 6350-6356.

Boyce RW, Dorph-Petersen KA, Lyck L and Gundersen HJG (2010). "Design-based stereology: introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number." Toxicol Pathol **38**(7): 1011-1025.

Brasil (1981). Lei nº 6938, de 31 de Agosto de 1981. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. Brasília, Presidência da República, Casa Civil.

Brasil (1990). Resolução Conama nº 3, de 28 de junho de 1990. Dispõe sobre padrões de qualidade do ar, previstos no PRONAR. Brasília, Diário Oficial da União.

Cao, X. N., L. J. Shen, S. D. Wu, C. Yan, Y. Zhou, G. Xiong, Y. C. Wang, Y. Liu, B. Liu, X. L. Tang, M. Guo, D. Y. Liu, C. L. Long, M. Sun, D. W. He, T. Lin and G. H. Wei (2017). "Urban fine particulate matter exposure causes male reproductive injury through destroying blood-testis barrier (BTB) integrity." Toxicol Lett **266**: 1-12.

Carlsen, E., A. Giwercman, N. Keiding and N. E. Skakkebaek (1992). "Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years." British Medical Journal **305**(6854): 609-613.

Carre, J., N. Gatimel, J. Moreau, J. Parinaud and R. Leandri (2017). "Does air pollution play a role in infertility?: a systematic review." Environ Health **16**(1): 82.

Cetesb (2012). Qualidade do ar no estado de São Paulo 2011. São Paulo.

Cetesb. (2013). "Qualidade do ar." Retrieved Acesso em 20 de Abril de 2017, from <http://ar.cetesb.sp.gov.br/>.

Cetesb. (2015). "Padrões de Qualidade do Ar." Retrieved 20 Nov, 2015, from <http://ar.cetesb.sp.gov.br/padroes-de-qualidade-do-ar/>.

CETESB (2015). Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo: Qualidade do ar no Estado de São Paulo 2014. São Paulo, CETESB: 134.

CETESB (2016). Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo: Qualidade do ar no Estado de São Paulo 2015. São Paulo, CETESB: 165.

Chen, H., R. T. Burnett, J. C. Kwong, P. J. Villeneuve, M. S. Goldberg, R. D. Brook, A. van Donkelaar, M. Jerrett, R. V. Martin, J. R. Brook and R. Copes (2013). "Risk of incident diabetes in relation to long-term exposure to fine particulate matter in Ontario, Canada." Environ Health Perspect **121**(7): 804-810.

Chen, R., B. Hu, Y. Liu, J. Xu, G. Yang, D. Xu and C. Chen (2016). "Beyond PM2.5: The role of ultrafine particles on adverse health effects of air pollution." Biochim Biophys Acta **1860**(12): 2844-2855.

Cheng, C. Y. and D. D. Mruk (2010). "A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis." Nat Rev Endocrinol **6**(7): 380-395.

Cheng, C. Y., E. W. Wong, H. H. Yan and D. D. Mruk (2010). "Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: new insights and advances." Mol Cell Endocrinol **315**(1-2): 49-56.

Consortium, G. R. (2012). Genome Reference Consortium Mouse Build 38 patch release 5 (GRCm38.p5).

Cosselman, K. E., A. Navas-Acien and J. D. Kaufman (2015). "Environmental factors in cardiovascular disease." Nat Rev Cardiol **12**(11): 627-642.

Creasy, D., A. Bube, E. de Rijk, H. Kandori, M. Kuwahara, R. Masson, T. Nolte, R. Reams, K. Regan, S. Rehm, P. Rogerson and K. Whitney (2012). "Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system." Toxicol Pathol **40**(6 Suppl): 40S-121S.

Culty, M., Y. Liu, G. Manku, W. Y. Chan and V. Papadopoulos (2015). "Expression of steroidogenesis-related genes in murine male germ cells." Steroids **103**: 105-114.

Dagher, Z., G. Garcon, S. Billet, P. Gosset, F. Ledoux, D. Courcot, A. Aboukais and P. Shirali (2006). "Activation of different pathways of apoptosis by air pollution particulate matter (PM2.5) in human epithelial lung cells (L132) in culture." Toxicology **225**(1): 12-24.

Danni-Oliveira, I. M. (2008). "Poluição do ar como causa de morbidade e mortalidade da população urbana." RA'EGA **15**: 113-126.

Davel, A. P., M. Lemos, L. M. Pastro, S. C. Pedro, P. A. de Andre, C. Hebeda, S. H. Farsky, P. H. Saldiva and L. V. Rossoni (2012). "Endothelial dysfunction in the pulmonary artery induced by concentrated fine particulate matter exposure is associated with local but not systemic inflammation." Toxicology **295**(1-3): 39-46.

De Gendt, K., J. V. Swinnen, P. T. Saunders, L. Schoonjans, M. Dewerchin, A. Devos, K. Tan, N. Atanassova, F. Claessens, C. Lecureuil, W. Heyns, P. Carmeliet, F. Guillou, R. M. Sharpe and G. Verhoeven (2004). "A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(5): 1327-1332.

de Kok, T. M., J. G. Hogervorst, J. J. Briede, M. H. van Herwijnen, L. M. Maas, E. J. Moonen, H. A. Driecce and J. C. Kleinjans (2005). "Genotoxicity and physicochemical characteristics of traffic-related ambient particulate matter." Environ Mol Mutagen **46**(2): 71-80.

Demircioglu, E., A. Sofuoglu and M. Odabasi (2011). "Atmospheric Concentrations and Phase Partitioning of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Izmir, Turkey." CLEAN - Soil, Air, Water **39**(4): 319-327.

Deng, X., W. Rui, F. Zhang and W. Ding (2013). "PM2.5 induces Nrf2-mediated defense mechanisms against oxidative stress by activating PIK3/AKT signaling pathway in human lung alveolar epithelial A549 cells." Cell Biol Toxicol **29**(3): 143-157.

Dergham, M., C. Lepers, A. Verdin, S. Billet, F. Cazier, D. Courcot, P. Shirali and G. Garcon (2012). "Prooxidant and proinflammatory potency of air pollution particulate matter (PM_{2.5}) produced in rural, urban, or industrial surroundings in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B)." Chem Res Toxicol **25**(4): 904-919.

Eze, I. C., E. Schaffner, E. Fischer, T. Schikowski, M. Adam, M. Imboden, M. Tsai, D. Carballo, A. von Eckardstein, N. Kunzli, C. Schindler and N. Probst-Hensch (2014). "Long-term air pollution exposure and diabetes in a population-based Swiss cohort." Environ Int **70**: 95-105.

Falcon-Rodriguez, C. I., A. R. Osornio-Vargas, I. Sada-Ovalle and P. Segura-Medina (2016). "Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases." Front Immunol **7**: 3.

Feng, S., D. Gao, F. Liao, F. Zhou and X. Wang (2016). "The health effects of ambient PM2.5 and potential mechanisms." Ecotoxicol Environ Saf **128**: 67-74.

Field, A. (2009). Descobriendo a estatística usando o SPSS. Porto Alegre, Artmed.

Fisch, H., E. F. Ikeguchi and E. T. Goluboff (1996). "Worldwide variations in sperm counts." Urology **48**(6): 909-911.

Franklin, M., P. Koutrakis and P. Schwartz (2008). "The role of particle composition on the association between PM2.5 and mortality." Epidemiology **19**(5): 680-689.

Fuzzi, S., U. Baltensperger, K. Carslaw, S. Decesari, H. Denier van der Gon, M. C. Facchini, D. Fowler, I. Koren, B. Langford, U. Lohmann, E. Nemitz, S. Pandis, I. Riipinen, Y. Rudich, M. Schaap, J. G. Slowik, D. V. Spracklen, E. Vignati, M. Wild, M. Williams and S. Gilardoni (2015). "Particulate matter, air quality and climate: lessons learned and future needs." Atmospheric Chemistry and Physics **15**(14): 8217-8299.

Gangamma, S. (2012). "Airborne particulate matter-associated endotoxin and proinflammatory responses." J Allergy Clin Immunol **130**(4): 1012; author reply 1012-1013.

Garber, J. C. (2011). Guide for the care and use of laboratory animals: Eighth edition. Washington, Institute for Laboratory Animal Research: 246.

Gautam, S., A. Yadav, C. J. Tsai and P. Kumar (2016). "A review on recent progress in observations, sources, classification and regulations of PM2.5 in Asian environments." Environ Sci Pollut Res Int **23**(21): 21165-21175.

Graff, D. W., W. E. Cascio, J. A. Brackhan and R. B. Devlin (2004). "Metal particulate matter components affect gene expression and beat frequency of neonatal rat ventricular myocytes." Environ Health Perspect **112**(7): 792-798.

Griswold, M. D. (2016). "Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis." Physiol Rev **96**(1): 1-17.

Gualtieri, M., E. Longhin, M. Mattioli, P. Mantecchia, V. Tinaglia, E. Mangano, M. C. Proverbio, G. Bestetti, M. Camatini and C. Battaglia (2012). "Gene expression profiling of A549 cells exposed to Milan PM2.5." Toxicol Lett **209**(2): 136-145.

Gualtieri, M., J. Ovrevik, S. Mollerup, N. Asare, E. Longhin, H. J. Dahlman, M. Camatini and J. A. Holme (2011). "Airborne urban particles (Milan winter-PM2.5) cause mitotic arrest and cell death: Effects on DNA, mitochondria, AhR binding and spindle organization." Mutat Res **713**(1-2): 18-31.

Guazzone, V. A., P. Jacobo, M. S. Theas and L. Lustig (2009). "Cytokines and chemokines in testicular inflammation: A brief review." Microsc Res Tech **72**(8): 620-628.

Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A and West MJ (1988). "Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis." APMIS **96**: 379-394.

Hai, Y., J. Hou, Y. Liu, Y. Liu, H. Yang, Z. Li and Z. He (2014). "The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis." Semin Cell Dev Biol **29**: 66-75.

Hammoud, A., D. T. Carrell, M. Gibson, M. Sanderson, K. Parker-Jones and C. M. Peterson (2010). "Decreased sperm motility is associated with air pollution in Salt Lake City." Fertil Steril **93**(6): 1875-1879.

Hemmingsen, J. G., K. S. Hougaard, C. Talsness, A. Wellejus, S. Loft, H. Wallin and P. Moller (2009). "Prenatal exposure to diesel exhaust particles and effect on the male reproductive system in mice." Toxicology **264**(1-2): 61-68.

Hess, R. A. and L. R. de França (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Molecular Mechanisms in Spermatogenesis. C. Y. Cheng. Texas, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media: 289.

Hogarth, C. A. and M. D. Griswold (2010). "The key role of vitamin A in spermatogenesis." J Clin Invest **120**(4): 956-962.

Hogarth, C. A. and M. D. Griswold (2013). "Retinoic acid regulation of male meiosis." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **20**(3): 217-223.

IBM (2014). IBM SPSS Statistics for Windows: Released 2014. Armonk, IBM Corp.

ImageJ (1997). ImageJ, U. S. National Institutes of Health. W. S. Rasband. Bethesda, USA: <https://imagej.nih.gov/ij/>.

INAIRA (2009). Manual de Operação: Concentrador de partículas ambientais (CPA). São Paulo.

Janssen, B. G., H. M. Byun, W. Gyselaers, W. Lefebvre, A. A. Baccarelli and T. S. Nawrot (2015). "Placental mitochondrial methylation and exposure to airborne particulate matter in the early life environment: An ENVIRONAGE birth cohort study." Epigenetics **10**(6): 536-544.

Jarvis, S., D. J. Elliott, D. Morgan, R. Winston and C. Readhead (2005). "Molecular markers for the assessment of postnatal male germ cell development in the mouse." Hum Reprod **20**(1): 108-116.

Jeng, H. A. and L. Yu (2008). "Alteration of sperm quality and hormone levels by polycyclic aromatic hydrocarbons on airborne particulate particles." J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng **43**(7): 675-681.

Johnsen, S. G. (1970). "Testicular biopsy score count - a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males." Hormones **1**: 2-25.

Johnson, K. J. (2014). "Testicular histopathology associated with disruption of the Sertoli cell cytoskeleton." Spermatogenesis **4**(2): e979106.

Kannan, S., D. P. Misra, J. T. Dvornch and A. Krishnakumar (2006). "Exposures to airborne particulate matter and adverse perinatal outcomes: a biologically plausible mechanistic framework for exploring potential effect modification by nutrition." Environ Health Perspect **114**(11): 1636-1642.

Kastury, F., E. Smith and A. L. Juhasz (2017). "A critical review of approaches and limitations of inhalation bioavailability and bioaccessibility of metal(loid)s from ambient particulate matter or dust." Sci Total Environ **574**: 1054-1074.

Kelly, F. J. and J. C. Fussell (2015). "Air pollution and public health: emerging hazards and improved understanding of risk." Environ Geochem Health **37**(4): 631-649.

Kouassi, K. S., S. Billet, G. Garcon, A. Verdin, A. Diouf, F. Cazier, J. Djaman, D. Courcot and P. Shirali (2010). "Oxidative damage induced in A549 cells by physically and chemically characterized air particulate matter (PM_{2.5}) collected in Abidjan, Cote d'Ivoire." J Appl Toxicol **30**(4): 310-320.

Laurent, O., J. Hu, L. Li, M. Cockburn, L. Escobedo, M. J. Kleeman and J. Wu (2014). "Sources and contents of air pollution affecting term low birth weight in Los Angeles County, California, 2001-2008." Environ Res **134**: 488-495.

Lawrence, J., J. M. Wolfson, S. Ferguson, P. Koutrakis and J. Godleski (2004). "Performance Stability of the Harvard Ambient Particle Concentrator." Aerosol Science and Technology **38**(3): 219-227.

Lee, P. C., J. M. Roberts, J. M. Catov, E. O. Talbott and B. Ritz (2013). "First trimester exposure to ambient air pollution, pregnancy complications and adverse birth outcomes in Allegheny County, PA." Matern Child Health J **17**(3): 545-555.

Lemos, A. T., C. T. Lemos, A. N. Flores, E. O. Pantoja, J. A. V. Rocha and V. M. F. Vargas (2016). "Genotoxicity biomarkers for airborne particulate matter (PM2.5) in an area under petrochemical influence." Chemosphere **159**: 610-618.

Lemos, M. and P. S. P. Silveira. Retrieved Dec 06, 2015, from <http://www.inaira.org/br/intoxicacao/concentrador.shtml>.

Li, N., E. I. Tang and C. Y. Cheng (2016). "Regulation of blood-testis barrier by actin binding proteins and protein kinases." Reproduction **151**(3): R29-41.

Li, X., S. Huang, A. Jiao, X. Yang, J. Yun, Y. Wang, X. Xue, Y. Chu, F. Liu, Y. Liu, M. Ren, X. Chen, N. Li, Y. Lu, Z. Mao, L. Tian and H. Xiang (2017). "Association between ambient fine particulate matter and preterm birth or term low birth weight: An updated systematic review and meta-analysis." Environ Pollut **227**: 596-605.

Li, Z., J. D. Carter, L. A. Dailey and Y. C. Huang (2005). "Pollutant particles produce vasoconstriction and enhance MAPK signaling via angiotensin type I receptor." Environ Health Perspect **113**(8): 1009-1014.

Lichtenfels, A. J., J. B. Gomes, P. C. Pieri, S. G. El Khouri Miraglia, J. Hallak and P. H. Saldiva (2007). "Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in Sao Paulo, Brazil." Fertil Steril **87**(1): 230-232.

Lie, P. P., C. Y. Cheng and D. D. Mruk (2013). "Signalling pathways regulating the blood-testis barrier." Int J Biochem Cell Biol **45**(3): 621-625.

Lin, Y., M. E. Gill, J. Koubova and D. C. Page (2008). "Germ cell-intrinsic and -extrinsic factors govern meiotic initiation in mouse embryos." Science **322**(5908): 1685-1687.

Longhin, E., J. A. Holme, K. B. Gutzkow, V. M. Arlt, J. E. Kucab, M. Camatini and M. Gualtieri (2013). "Cell cycle alterations induced by urban PM2.5 in bronchial epithelial cells: characterization of the process and possible mechanisms involved." Part Fibre Toxicol **10**: 63.

LPAE. (2009). "Instituto Nacional de Análise Integrada do Risco Ambiental." 2017, from <http://www.inaira.org/br/index.html>.

Mahalingaiah, S., J. E. Hart, F. Laden, L. V. Farland, M. M. Hewlett, J. Chavarro, A. Aschengrau and S. A. Missmer (2016). "Adult air pollution exposure and risk of infertility in the Nurses' Health Study II." Hum Reprod **31**(3): 638-647.

Manna, P. R., J. Cohen-Tannoudji, R. Counis, C. W. Garner, I. Huhtaniemi, F. B. Kraemer and D. M. Stocco (2013). "Mechanisms of action of hormone-sensitive lipase in mouse Leydig cells: its role in the regulation of the steroidogenic acute regulatory protein." J Biol Chem **288**(12): 8505-8518.

Martin, S., E. Fernandez-Alanis, V. Delfosse, P. Evelson, J. S. Yakisich, P. H. Saldiva and D. R. Tasat (2010). "Low doses of urban air particles from Buenos Aires promote oxidative stress and apoptosis in mice lungs." Inhal Toxicol **22**(13): 1064-1071.

Mauduit, C., F. Gasnier, C. Rey, M. A. Chauvin, D. M. Stocco, P. Louisot and M. Benahmed (1998). "Tumor necrosis factor-alpha inhibits leydig cell steroidogenesis through a decrease in steroidogenic acute regulatory protein expression." Endocrinology **139**(6): 2863-2868.

McLaren, A. (1998). "Gonad development: assembling the mammalian testis." Curr Biol **8**(5): R175-177.

McLean, D. J., P. J. Friel, D. S. Johnston and M. D. Griswold (2003). "Characterization of spermatogonial stem cell maturation and differentiation in neonatal mice." Biol Reprod **69**(6): 2085-2091.

MCTI (2013). Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos. Brasília, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal 50.

MCTI (2015). Normativas do CONCEA para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal: 221.

Miller, W. L. and R. J. Auchus (2011). "The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders." Endocr Rev **32**(1): 81-151.

Mital, P., B. T. Hinton and J. M. Dufour (2011). "The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions." Biol Reprod **84**(5): 851-858.

MMA. (2017). "Ministério do Meio Ambiente: Poluentes Atmosféricos." Retrieved 19 abr 2017, from <http://www.mma.gov.br/cidades-sustentaveis/qualidade-do-ar/poluentes-atmosf%C3%A9ricos>.

Mohallem, S. V., D. J. de Araujo Lobo, C. R. Pesquero, J. V. Assuncao, P. A. de Andre, P. H. Saldiva and M. Dolhnikoff (2005). "Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of Sao Paulo." Environ Res **98**(2): 196-202.

Morakinyo, O. M., M. I. Mokgobu, M. S. Mukhola and R. P. Hunter (2016). "Health Outcomes of Exposure to Biological and Chemical Components of Inhalable and Respirable Particulate Matter." Int J Environ Res Public Health **13**(6).

Murphy, C. J. and J. H. Richburg (2014). "Implications of Sertoli cell induced germ cell apoptosis to testicular pathology." Spermatogenesis **4**(2): e979110.

Murphy, C. J., A. R. Stermer and J. H. Richburg (2014). "Age- and species-dependent infiltration of macrophages into the testis of rats and mice exposed to mono-(2-Ethylhexyl) phthalate (MEHP)." Biol Reprod **91**(1): 18.

Nakata, H., T. Wakayama, T. Sonomura, S. Honma, T. Hatta and S. Iseki (2015). "Three-dimensional structure of seminiferous tubules in the adult mouse." J Anat **227**(5): 686-694.

Nam, H. Y., B. H. Choi, J. Y. Lee, S. G. Lee, Y. H. Kim, K. H. Lee, H. K. Yoon, J. S. Song, H. J. Kim and Y. Lim (2004). "The role of nitric oxide in the particulate matter (PM_{2.5})-induced NFκappaB activation in lung epithelial cells." Toxicol Lett **148**(1-2): 95-102.

Nikasinovic, L., J. Just, F. Sahraoui, N. Seta, A. Grimfeld and I. Momas (2006). "Nasal inflammation and personal exposure to fine particles PM_{2.5} in asthmatic children." J Allergy Clin Immunol **117**(6): 1382-1388.

Noorafshan, A. (2014). "Stereology as a valuable tool in the toolbox of testicular research." Ann Anat **196**(1): 57-66.

O'Donnell, L. (2014). "Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed." Spermatogenesis **4**(2): e979623.

O'Donnell, L., P. K. Nicholls, M. K. O'Bryan, R. I. McLachlan and P. G. Stanton (2011). "Spermiation: The process of sperm release." Spermatogenesis **1**(1): 14-35.

Oberdörster, G., E. Oberdörster and J. Oberdörster (2005). "Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles." Environmental Health Perspectives **113**(7): 823-839.

Ohta, H., T. Wakayama and Y. Nishimune (2004). "Commitment of fetal male germ cells to spermatogonial stem cells during mouse embryonic development." Biol Reprod **70**(5): 1286-1291.

Park, E., S. Kumar, B. Lee, K. J. Kim, J. E. Seo, H. S. Choi and K. Lee (2017). "Estrogen receptor-related receptor gamma regulates testicular steroidogenesis through direct and indirect regulation of steroidogenic gene expression." Mol Cell Endocrinol **452**: 15-24.

Payne, A. H. and D. B. Hales (2004). "Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones." Endocr Rev **25**(6): 947-970.

Pei, Y., D. Xing, X. Gao, L. Liu and T. Chen (2007). "Real-time monitoring full length bid interacting with Bax during TNF-alpha-induced apoptosis." Apoptosis **12**(9): 1681-1690.

Peixoto, M. S., M. F. de Oliveira Galvao and S. R. Batistuzzo de Medeiros (2017). "Cell death pathways of particulate matter toxicity." Chemosphere **188**: 32-48.

Peng, R. D., M. L. Bell, A. S. Geyh, A. McDermott, S. L. Zeger, J. M. Samet and F. Dominici (2009). "Emergency admissions for cardiovascular and respiratory diseases and the chemical composition of fine particle air pollution." Environ Health Perspect **117**(6): 957-963.

Pires, A., E. N. de Melo, T. Mauad, P. H. Nascimento Saldiva and H. M. de Siqueira Bueno (2011). "Pre- and postnatal exposure to ambient levels of urban particulate matter (PM_{2.5}) affects mice spermatogenesis." Inhal Toxicol **23**(4): 237-245.

- Radwan, M., J. Jurewicz, K. Polanska, W. Sobala, P. Radwan, M. Bochenek and W. Hanke (2016). "Exposure to ambient air pollution--does it affect semen quality and the level of reproductive hormones?" Ann Hum Biol **43**(1): 50-56.
- Ramaswamy, S. and G. F. Weinbauer (2014). "Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone." Spermatogenesis **4**(2): e996025.
- Rengaraj, D., W. S. Kwon and M. G. Pang (2015). "Effects of motor vehicle exhaust on male reproductive function and associated proteins." J Proteome Res **14**(1): 22-37.
- Riccioli, A., D. Starace, A. D'Alessio, G. Starace, F. Padula, P. De Cesaris, A. Filippini and E. Ziparo (2000). "TNF-alpha and IFN-gamma regulate expression and function of the Fas system in the seminiferous epithelium." J Immunol **165**(2): 743-749.
- Risom, L., P. Moller and S. Loft (2005). "Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution." Mutat Res **592**(1-2): 119-137.
- Rossi, P. and S. Dolci (2013). "Paracrine mechanisms involved in the control of early stages of Mammalian spermatogenesis." Front Endocrinol (Lausanne) **4**: 181.
- Saito, K., L. O'Donnell, R. I. McLachlan and D. M. Robertson (2000). "Spermiation failure is a major contributor to early spermatogenic suppression caused by hormone withdrawal in adult rats." Endocrinology **141**(8): 2779-2785.
- SãoPaulo (2013). Decreto Nº 59.113, de 23 de abril de 2013. Estabelece novos padrões de qualidade do ar e dá providências correlatas. G. d. E. d. S. Paulo. São Paulo, Casa Civil.
- Schell, L. M., K. K. Burnitz and P. W. Lathrop (2010). "Pollution and human biology." Ann Hum Biol **37**(3): 347-366.
- Schlatt, S. and J. Ehmcke (2014). "Regulation of spermatogenesis: an evolutionary biologist's perspective." Semin Cell Dev Biol **29**: 2-16.
- Schlesinger, R. B., N. Kunzli, G. M. Hidy, T. Gotschi and M. Jerrett (2006). "The health relevance of ambient particulate matter characteristics: coherence of toxicological and epidemiological inferences." Inhal Toxicol **18**(2): 95-125.
- Shah, P. S., T. Balkhair and L. B. W. b. Knowledge Synthesis Group on Determinants of Preterm (2011). "Air pollution and birth outcomes: a systematic review." Environ Int **37**(2): 498-516.
- Sharpe, R. M. and N. E. Skakkebaek (1993). "Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?" Lancet **341**(8857): 1392-1395.
- Shima, Y., S. Matsuzaki, K. Miyabayashi, H. Otake, T. Baba, S. Kato, I. Huhtaniemi and K. Morohashi (2015). "Fetal Leydig Cells Persist as an Androgen-Independent Subpopulation in the Postnatal Testis." Mol Endocrinol **29**(11): 1581-1593.

Shimizu-Albergine, M., L. C. Tsai, E. Patrucco and J. A. Beavo (2012). "cAMP-specific phosphodiesterases 8A and 8B, essential regulators of Leydig cell steroidogenesis." Mol Pharmacol **81**(4): 556-566.

Sirianni, R., A. Chimento, C. Ruggiero, A. De Luca, R. Lappano, S. Ando, M. Maggiolini and V. Pezzi (2008). "The novel estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30, mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol on mouse spermatogonial GC-1 cell line." Endocrinology **149**(10): 5043-5051.

Siu, M. K. and C. Y. Cheng (2004). "Extracellular matrix: recent advances on its role in junction dynamics in the seminiferous epithelium during spermatogenesis." Biol Reprod **71**(2): 375-391.

Siu, M. K. and C. Y. Cheng (2004). "Interactions of proteases, protease inhibitors, and the beta1 integrin/laminin gamma3 protein complex in the regulation of ectoplasmic specialization dynamics in the rat testis." Biol Reprod **70**(4): 945-964.

Slama, R., S. Bottagisi, I. Solansky, J. Lepeule, L. Giorgis-Allemand and R. Sram (2013). "Short-term impact of atmospheric pollution on fecundability." Epidemiology **24**(6): 871-879.

Slama, R., L. Darrow, J. Parker, T. J. Woodruff, M. Strickland, M. Nieuwenhuijsen, S. Glinianaia, K. J. Hoggatt, S. Kannan, F. Hurley, J. Kalinka, R. Sram, M. Brauer, M. Wilhelm, J. Heinrich and B. Ritz (2008). "Meeting report: atmospheric pollution and human reproduction." Environ Health Perspect **116**(6): 791-798.

Smith, L. B. and W. H. Walker (2014). "The regulation of spermatogenesis by androgens." Semin Cell Dev Biol **30**: 2-13.

Snider, G., C. L. Weagle, K. K. Murdymootoo, A. Ring, Y. Ritchie, E. Stone, A. Walsh, C. Akoshile, N. X. Anh, R. Balasubramanian, J. Brook, F. D. Qonitan, J. Dong, D. Griffith, K. He, B. N. Holben, R. Kahn, N. Lagrosas, P. Lestari, Z. Ma, A. Misra, L. K. Norford, E. J. Quel, A. Salam, B. Schichtel, L. Segev, S. Tripathi, C. Wang, C. Yu, Q. Zhang, Y. Zhang, M. Brauer, A. Cohen, M. D. Gibson, Y. Liu, J. V. Martins, Y. Rudich and R. V. Martin (2016). "Variation in global chemical composition of PM_{2.5}: emerging results from SPARTAN." Atmospheric Chemistry and Physics **16**(15): 9629-9653.

Soberanes, S., D. Urich, C. M. Baker, Z. Burgess, S. E. Chiarella, E. L. Bell, A. J. Ghio, A. De Vizcaya-Ruiz, J. Liu, K. M. Ridge, D. W. Kamp, N. S. Chandel, P. T. Schumacker, G. M. Mutlu and G. R. Budinger (2009). "Mitochondrial complex III-generated oxidants activate ASK1 and JNK to induce alveolar epithelial cell death following exposure to particulate matter air pollution." J Biol Chem **284**(4): 2176-2186.

Solomon, W. R. (2002). "Airborne pollen: a brief life." J Allergy Clin Immunol **109**(6): 895-900.

Somers, C. M., B. E. McCarry, F. Malek and J. S. Quinn (2004). "Reduction of particulate air pollution lowers the risk of heritable mutations in mice." Science **304**(5673): 1008-1010.

Somers, C. M., C. L. Yauk, P. A. White, C. L. Parfett and J. S. Quinn (2002). "Air pollution induces heritable DNA mutations." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 15904-15907.

Sram, R. J., B. Binkova, J. Dejmek and M. Bobak (2005). "Ambient air pollution and pregnancy outcomes: a review of the literature." Environ Health Perspect **113**(4): 375-382.

Staal, F. J., M. van der Burg, L. F. Wessels, B. H. Barendregt, M. R. Baert, C. M. van den Burg, C. van Huffel, A. W. Langerak, V. H. van der Velden, M. J. Reinders and J. J. van Dongen (2003). "DNA microarrays for comparison of gene expression profiles between diagnosis and relapse in precursor-B acute lymphoblastic leukemia: choice of technique and purification influence the identification of potential diagnostic markers." Leukemia **17**(7): 1324-1332.

Stanek, L. W., J. S. Brown, J. Stanek, J. Gift and D. L. Costa (2011). "Air pollution toxicology--a brief review of the role of the science in shaping the current understanding of air pollution health risks." Toxicol Sci **120 Suppl 1**: S8-27.

Sun, X., X. Luo, C. Zhao, B. Zhang, J. Tao, Z. Yang, W. Ma and T. Liu (2016). "The associations between birth weight and exposure to fine particulate matter (PM_{2.5}) and its chemical constituents during pregnancy: A meta-analysis." Environ Pollut **211**: 38-47.

Svechnikov, K., G. Izzo, L. Landreh, J. Weisser and O. Soder (2010). "Endocrine disruptors and Leydig cell function." J Biomed Biotechnol **2010**.

Torres-Ramos, Y. D., A. Montoya-Estrada, A. M. Guzman-Grenfell, J. Mancilla-Ramirez, B. Cardenas-Gonzalez, S. Blanco-Jimenez, J. D. Sepulveda-Sanchez, A. Ramirez-Venegas and J. J. Hicks (2011). "Urban PM_{2.5} induces ROS generation and RBC damage in COPD patients." Front Biosci (Elite Ed) **3**: 808-817.

Tremblay, J. J. (2015). "Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells." Steroids **103**: 3-10.

Treuting P M, Dintzis S M, Frevert C W, Liggitt D and M. K. S (2012). Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas. San Diego, Elsevier.

van den Hooven, E. H., F. H. Pierik, Y. de Kluizenaar, A. Hofman, S. W. van Ratingen, P. Y. Zandveld, H. Russcher, J. Lindemans, H. M. Miedema, E. A. Steegers and V. W. Jaddoe (2012). "Air pollution exposure and markers of placental growth and function: the generation R study." Environ Health Perspect **120**(12): 1753-1759.

Veras, M. M. (2008). Efeitos da poluição do ar da cidade de São Paulo sobre o processo reprodutivo de camundongos com ênfase no desenvolvimento da placenta e cordão umbilical. Doutorado, Universidade de São Paulo.

Veras, M. M., N. R. Damaceno-Rodrigues, R. M. Guimaraes Silva, J. N. Scoriza, P. H. Saldiva, E. G. Caldini and M. Dolnikoff (2009). "Chronic exposure to fine particulate matter emitted by traffic affects reproductive and fetal outcomes in mice." Environ Res **109**(5): 536-543.

Veras, M. M., R. M. Guimaraes-Silva, E. G. Caldini, P. H. Saldiva, M. Dolhnikoff and T. M. Mayhew (2012). "The effects of particulate ambient air pollution on the murine umbilical cord and its vessels: a quantitative morphological and immunohistochemical study." Reprod Toxicol **34**(4): 598-606.

Vergouwen, R. P., R. Huiskamp, R. J. Bas, H. L. Roepers-Gajadien, J. A. Davids and D. G. de Rooij (1993). "Postnatal development of testicular cell populations in mice." J Reprod Fertil **99**(2): 479-485.

Vergouwen, R. P., S. G. Jacobs, R. Huiskamp, J. A. Davids and D. G. de Rooij (1991). "Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice." J Reprod Fertil **93**(1): 233-243.

Walker, W. H. (2009). "Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis." Steroids **74**(7): 602-607.

Wang, G., R. Jiang, Z. Zhao and W. Song (2013). "Effects of ozone and fine particulate matter (PM_{2.5}) on rat system inflammation and cardiac function." Toxicol Lett **217**(1): 23-33.

Wang, G., J. Zhao, R. Jiang and W. Song (2015). "Rat lung response to ozone and fine particulate matter (PM_{2.5}) exposures." Environ Toxicol **30**(3): 343-356.

Wang, Q., K. Kobayashi, S. Lu, D. Nakajima, W. Wang, W. Zhang, K. Sekiguchi and M. Terasaki (2016). "Studies on size distribution and health risk of 37 species of polycyclic aromatic hydrocarbons associated with fine particulate matter collected in the atmosphere of a suburban area of Shanghai city, China." Environ Pollut **214**: 149-160.

Watanabe, N. (2005). "Decreased number of sperms and Sertoli cells in mature rats exposed to diesel exhaust as fetuses." Toxicol Lett **155**(1): 51-58.

Watanabe, N. and Y. Oonuki (1999). "Inhalation of diesel engine exhaust affects spermatogenesis in growing male rats." Environ Health Perspect **107**(7): 539-544.

Watterson, T. L., J. Sorensen, R. Martin and R. A. Coulombe, Jr. (2007). "Effects of PM_{2.5} collected from Cache Valley Utah on genes associated with the inflammatory response in human lung cells." J Toxicol Environ Health A **70**(20): 1731-1744.

Wen, Q., C. Y. Cheng and Y. X. Liu (2016). "Development, function and fate of fetal Leydig cells." Semin Cell Dev Biol **59**: 89-98.

West MJ (2012). "Introduction to stereology." Cold Spring Harb Protoc **2012**(8).

WHO (2000). Regional Office for Europe: Air Quality Guidelines - Second Edition. Copenhagen: 40.

WHO (2006). Air quality guidelines: particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. Global update 2005. Copenhagen, WHO: 496.

WHO (2010). WHO Guidelines for Indoor Air Quality: Selected Pollutants. Geneva, World Health Organization: 484.

WHO (2013). Review of evidence on health aspects of air pollution: REVIHAAP Project. W. E. C. f. E. a. Health. Copenhagen: 309.

WHO. (2016). "WHO releases country estimates on air pollution exposure and health impact." Retrieved 08 set 2017, 2017, from <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/air-pollution-estimates/en/>.

WHO (2016). World Health Organization: Ambient air pollution a global assessment of exposure and burden of disease. Geneva, World Health Organization: 121.

WHO. (2017). "Air pollution." Retrieved 22 ago 2017, 2017, from http://www.who.int/topics/air_pollution/en/.

Xie, Y., X. Zhang, Z. Tian, R. Jiang, R. Chen, W. Song and J. Zhao (2013). "Preexposure to PM_{2.5} exacerbates acute viral myocarditis associated with Th17 cell." Int J Cardiol **168**(4): 3837-3845.

Xu, D., N. Huang, Q. Wang and H. Liu (2008). "[Study of ambient PM_{2.5} on the influence of the inflammation injury and the immune function of subchronic exposure rats]." Wei Sheng Yan Jiu **37**(4): 423-428.

Xu, X., S. Y. Jiang, T. Y. Wang, Y. Bai, M. Zhong, A. Wang, M. Lippmann, L. C. Chen, S. Rajagopalan and Q. Sun (2013). "Inflammatory response to fine particulate air pollution exposure: neutrophil versus monocyte." PLoS One **8**(8): e71414.

Yauk, C., A. Polyzos, A. Rowan-Carroll, C. M. Somers, R. W. Godschalk, F. J. Van Schooten, M. L. Berndt, I. P. Pogribny, I. Koturbash, A. Williams, G. R. Douglas and O. Kovalchuk (2008). "Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(2): 605-610.

Ying, Z., X. Xu, Y. Bai, J. Zhong, M. Chen, Y. Liang, J. Zhao, D. Liu, M. Morishita, Q. Sun, C. Spino, R. D. Brook, J. R. Harkema and S. Rajagopalan (2014). "Long-term exposure to concentrated ambient PM_{2.5} increases mouse blood pressure through abnormal activation of the sympathetic nervous system: a role for hypothalamic inflammation." Environ Health Perspect **122**(1): 79-86.

Yoshida, S., N. Ono, N. Tsukue, S. Oshio, T. Umeda, H. Takano and K. Takeda (2006). "In utero exposure to diesel exhaust increased accessory reproductive gland weight and serum testosterone concentration in male mice." Environ Sci **13**(3): 139-147.

Yoshida, S., M. Sagai, S. Oshio, T. Umeda, T. Ihara, M. Sugamata, I. Sugawara and K. Takeda (1999). "Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice." International Journal of Andrology **22**: 307-315.

Zhao, J., Z. Gao, Z. Tian, Y. Xie, F. Xin, R. Jiang, H. Kan and W. Song (2013). "The biological effects of individual-level PM_{2.5} exposure on systemic immunity and inflammatory response in traffic policemen." Occup Environ Med **70**(6): 426-431.

Zhong, L., F. C. Su and S. Batterman (2017). "Volatile Organic Compounds (VOCs) in Conventional and High Performance School Buildings in the U.S." Int J Environ Res Public Health **14**(1).

Zhu, X., Y. Liu, Y. Chen, C. Yao, Z. Che and J. Cao (2015). "Maternal exposure to fine particulate matter (PM_{2.5}) and pregnancy outcomes: a meta-analysis." Environ Sci Pollut Res Int **22**(5): 3383-3396.