

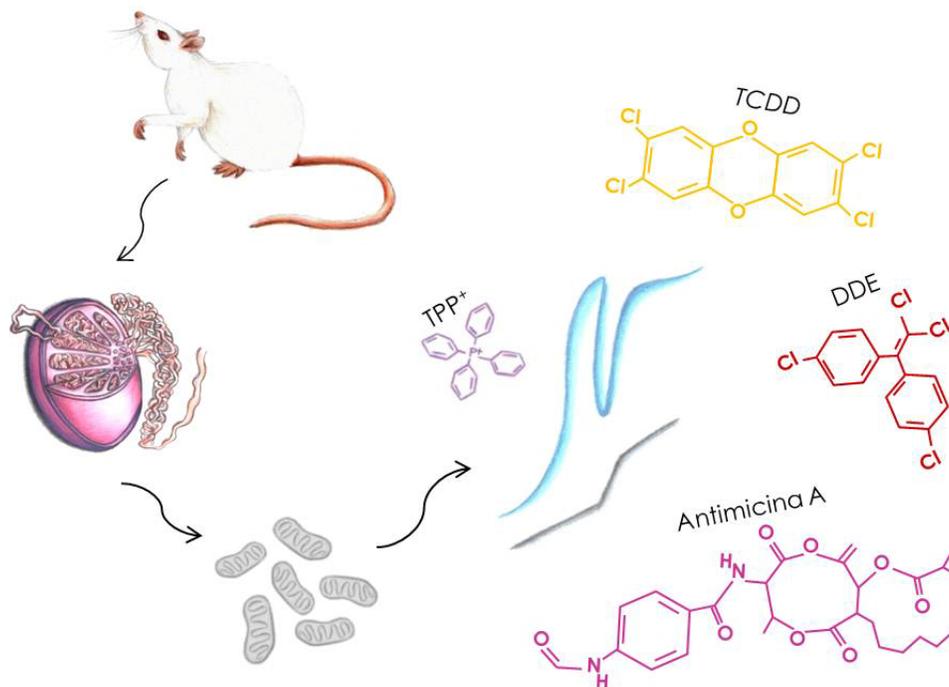


# DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## A Mitocôndria Testicular como Novo Modelo Toxicológico para Avaliar Correctamente o Efeito de Poluentes Ambientais na Reprodução Masculina:

Estudo Comparativo do Impacto do DDE [1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etileno] e TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina) na Bioenergética Mitocôndrial de Testículo e Fígado



Marília Henriques Cordeiro

Coimbra 2009



# DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## A Mitocôndria Testicular como Novo Modelo Toxicológico para Avaliar Correctamente o Efeito de Poluentes Ambientais na Reprodução Masculina:

Estudo Comparativo do Impacto do DDE [1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etileno] e TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina) na Bioenergética Mitocondrial de Testículo e Fígado

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor João Ramalho-Santos (Universidade de Coimbra).

Marília Henriques Cordeiro

Coimbra 2009

***“Se o teu navio não chega, nada até ele”***

Jonathan Winters

*Atos meus pais*

||

## *Agradecimentos*

Ao meu orientador Professor Doutor João Ramalho-Santos por esta valiosa oportunidade e pela confiança depositada. Por acreditar nas minhas capacidades mesmo antes de eu as conseguir ver e, apesar da distância, disponibilizar ajuda e manter sempre a preocupação.

Um agradecimento muito especial à Paula Mota por estar sempre presente, pela infinita paciência e auxílio a todos os níveis. Pelas dores nas pernas e cansaço às nove e meia da noite e pelas corridas antes de disparar o alarme. Por seres minha conselheira e me ajudares nas difíceis decisões do trabalho, mas também por abdicares do teu trabalho e tempo para me ajudar. Pela partilha de tristezas e frustrações, alegrias e vitórias, pela segurança e calma transmitidas.

À Sandra Amaral por tentar ajudar em tudo, pela simpatia, apoio e preocupação.

À Marta e à Renata, e ao restante grupo de Reprodução, Xana, Ana Paula, Sofia, Beatriz, Rita e Dina pelo apoio, pelas conversas e pela confiança depositada.

À Susana pela ajuda com os animais, mas também pelos sábios conselhos, pela segurança e calma que me transmites. Pelo “Buenos dias” aos ratinhos e música dos ficheiros secretos, que foram uma grande ajuda naqueles momentos de stress. Por me lembrares que com esforço e dedicação tudo se consegue embora possa parecer difícil. Pela solidariedade e preocupação do início ao fim do dia (mesmo naqueles dias de muitas horas). Ao Gonçalo pela ajuda com os animais, com os eléctrodos, com as contas, obrigada pela paciência e por largares o teu trabalho para me ajudar.

Ao Professor Doutor Moreno por estar sempre disponível para ensinar, ajudar a interpretar os resultados e a vestir a sua bata branca para aquela chata tarefa.

À Doutora Sancha pela boa disposição e preocupação, por estar sempre pronta a ajudar em qualquer problema, do mais absurdo ao mais complicado, largando tantas vezes o seu trabalho.

À Vilma Sardão e ao Paulo Oliveira pelo apoio, ajuda no laboratório e bons conselhos. À Ana Duarte pela alegria, partilha de experiências e força.

À Sandra das nanopartículas pela companhia, preocupação e interessantes conversas. À Carolina especialmente pelo apoio emocional agora no fim deste trabalho. À Cláudia pelo teu sorriso e disponibilidade mesmo com pouco tempo. Aos restantes colegas de laboratório pelo ambiente de trabalho estimulante e familiar. Um



agradecimento especial à D. Júlia e à D. Paula, não só pela importante ajuda no laboratório, mas principalmente pela boa disposição transmitida.

Aos meus pais e irmão pelo amor e apoio incondicional, por acreditarem sempre em mim e me darem colo quando mais precisei, mas também por tolerarem as minhas alterações de humor e ausências. Um agradecimento especial também ao resto da minha família por serem elementos muito importantes na minha vida.

Às minhas maninhas Vi, Nokas e Leninha por serem a minha família em Coimbra. Obrigada pela amizade e partilha de experiências. Por me darem força, ajudarem a secar as lágrimas e a enfrentar a vida com um sorriso no rosto.

À Andrea, à Marta, ao Pi, à Gabriela e à Gisela pelas nossas conversas, pela preocupação e amizade. E por fim queria agradecer aos restantes amigos de curso, de mestrado e da Batalha pelos bons momentos que passámos juntos e por me incentivarem e apoiarem sempre.

## Resumo

A libertação de contaminantes ambientais, em resultado de diversas actividades humanas, pode ser uma das causas da redução de fertilidade masculina registada nas últimas décadas. De facto muitos destes poluentes funcionam com disruptores endócrinos, mimetizando ou antagonizando a acção de hormonas endógenas, tendo um efeito adverso na saúde humana e na vida selvagem, em especial na fertilidade. Por outro lado, verificou-se que alguns poluentes ambientais, como o pesticida DDT e as dioxinas, podem induzir toxicidade por acção directa nas células testiculares, estando a mitocôndria possivelmente envolvida. Apesar destas evidências não existe um estudo focado na caracterização bioenergética das mitocôndrias testiculares de animais expostos a estes compostos. Assim, neste trabalho foram investigadas possíveis alterações nos parâmetros bioenergéticos de mitocôndrias de testículo após a exposição *in vivo* e *in vitro* a DDE (metabolito do DDT) e TCDD (membro mais potente do grupo das dioxinas), tentando desvendar se a mitocôndria está envolvida na toxicidade induzida por estes compostos. No estudo *in vivo* ratos machos adultos foram sujeitos a uma injeção intraperitoneal de DDE ou TCDD, enquanto que no estudo *in vitro* estes compostos foram aplicados directamente nas mitocôndrias testiculares. Por outro lado, realizou-se também o estudo comparativo do efeito *in vitro* das mesmas doses de DDE e TCDD em mitocôndrias de fígado, correntemente utilizadas como modelo toxicológico para outros órgãos, para averiguar se podem ser usadas para avaliar o efeito de xenobióticos no sistema reprodutor.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que os poluentes ambientais DDE e TCDD afectam directamente diversos parâmetros bioenergéticos das mitocôndrias, revelando um impacto negativo ao nível do sistema fosforilativo. Embora o estudo *in vivo* não tenha revelado diferenças significativas na bioenergética testicular, o estudo *in vitro* permitiu confirmar as tendências observadas e validar este sistema de estudo. Já o estudo comparativo do efeito do DDE e TCDD sobre mitocôndrias de testículo e fígado permitiu concluir que estes dois órgãos apresentam uma sensibilidade e um padrão de resposta diferentes, indicando que as mitocôndrias testiculares devem ser usadas como modelo toxicológico primário para uma correcta avaliação dos efeitos de tóxicos ambientais na espermatogénese e fertilidade masculina.

## Abstract

The release of environmental contaminants as a result of various human activities can be a cause of reduced male fertility observed in the past decades. In fact, many of these pollutants can act as endocrine disruptors, mimicking or antagonizing the action of endogenous hormones, and having an adverse effect on human health and wildlife, especially in terms of fertility. Moreover, some of these environmental pollutants, such as the pesticide DDT and dioxins, can induce toxicity through a direct action on testicular cells, with the possible involvement of mitochondria. Despite these evidences, there is no study focused on the characterization of mitochondrial bioenergetics in the testis of males exposed to these compounds. Thus, this study investigated possible changes in bioenergetic parameters of testis mitochondria after exposure *in vivo* and *in vitro* to DDE (a metabolite of DDT) and TCDD (the most potent dioxin), to determine if mitochondria are involved in the toxicity induced by these compounds. In the *in vivo* study adult male rats were subjected to intraperitoneal injections of TCDD and DDE, while in parallel *in vitro* studies these compounds were applied directly on isolated testis mitochondria. On the other hand, we have also carried out a comparative study regarding the *in vitro* effect of the same doses of DDE and TCDD on liver mitochondria, commonly used as a toxicological model for other organs, to see if these organelles can be used to evaluate the effect of xenobiotics in the male reproductive system.

The results indicated that the environmental pollutants, DDE and TCDD, directly affect directly several parameters of testicular mitochondrial bioenergetics, revealing a negative impact in phosphorylation system. Although no significant differences were observed *in vivo*, the *in vitro* study confirmed the trends observed and validated this approach. The comparative study of DDE and TCDD effects on testis and liver mitochondria also showed that these two organs have different sensitivities and patterns of response, indicating that testis mitochondria should be used as primary toxicological model for a proper evaluation of the effects of environmental toxicants on spermatogenesis and male fertility.

## Lista de Abreviaturas

% - Percentagem

**x g** – Aceleração da gravidade

$\Delta\Psi$  – Potencial eléctrico transmembranar

$\Delta\text{pH}$  – Gradiente de pH

$\mu\text{H}^+$  – Gradiente electroquímico

**Acetil-CoA** – Acetil-Coenzima A

**ADP** – Adenosina difosfato

**AhR** – Receptor aril-hidrocarboneto

**AMP** – Adenosina monofosfato

**ARNT** – Translocador nuclear receptor aril hidrocarboneto

**ATP** – Adenosina trifosfato

**BSA** – Albumina sérica bovina

**Cit c** – Citocromo c

**DDE** – 1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etileno; metabolito do DDT

**DDT** – Diclorodifeniltricloroetano; pesticida

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico

**ADNmt** – ADN mitocondrial

**DTNB** – ácido 5,5V-dithiobis-2-nitrobenzoico

$e^-$  – Electão

**EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético

**EGTA** – Ácido etileno glicol-bis(2-amino etil eter)-N,N,N',N'-tetracético

**FSH** – Hormona foliculo estimulante

**Fum** – Fumarato

**GnRH** – Hormona libertadora de gonadotropinas

$\text{H}^+$  – Protão

**HEPES** – Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2'-etanosulfónico)

**HPLC** – Cromatografia líquida de fase reversa de alta eficiência

**ICR** – Índice de controlo respiratório

**IP** – Injecção intraperitoneal

**KCl** – Cloreto de potássio

**$\text{KH}_2\text{PO}_4$**  – Dihidrogenofosfato de potássio

**KOH** – Hidróxido de potássio

**LH** – Hormona luteinizante

**$\text{MgCl}_2$**  – Cloreto de Magnésio

**$\text{NAD}^+$**  – Nicotinamida adenina dinucleótido, forma oxidada

**NADH** – Nicotinamida adenina dinucleótido, forma reduzida

**NADPH** – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reduzida

**natomsO** – nanoátomos de oxigénio

**$\text{O}_2^-$**  – Anião superóxido

**$\text{O}_2$**  – Oxigénio molecular

**PAS/H** – Ácido Periódico – Reagente de Shiff/Hematoxilina

**PCBs** – Bifenilos policlorados

**PCDDs** – Dibenzo-p-dioxinas policloradas

**PCDFs** – Dibenzofuranos policlorados

**POPs** – Poluentes orgânicos persistentes

**Q** – Ubiquinona

**RNA** – Ácido ribonucleico

**ROS** – Espécies reactivas de oxigénio

**SPSS** – Statistical Package for Social Sciences Program

**Succ** – Succinato

**TCDD** – 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina

**TPP<sup>+</sup>** – Catião tetrafenilfosfónio

**Tris** – 2-amino-2-(hidroximetil)- 1,3-propanodiol

**UCPs** – Proteínas desacopladoras

**XRE** – Elementos de resposta a xenobióticos

# Índice

Resumo .....	V
Abstract .....	VI
Lista de abreviaturas .....	VII
<b>Capítulo 1 – Introdução</b> .....	1
1.1. O Sistema Reprodutor Masculino .....	2
1.1.1 O Testículo .....	2
1.1.2 A Espermatogénese .....	4
1.1.2.1 Regulação Hormonal da Espermatogénese .....	6
1.2. O Metabolismo do Testículo .....	8
1.2.1. A Mitocôndria e o seu papel preponderante na produção de energia .....	8
1.2.1.1. As Mitocôndrias Testiculares .....	11
1.2.2 A Mitocôndria como Modelo Toxicológico .....	12
1.3. O Impacto de Poluentes Ambientais na Fertilidade .....	13
1.3.1. O DDT e o seu metabolito DDE .....	14
1.3.2 Dioxinas e TCDD .....	17
1.4. Objectivo .....	20
<b>Capítulo 2 – Material e Métodos</b> .....	21
2.1. Materiais e Reagentes .....	22
2.2. Animais e sua Manutenção .....	22
2.3. Estudo <i>in vivo</i> .....	22
2.4. Estudo <i>in vitro</i> .....	23
2.5. Isolamento de Mitocôndrias Testiculares .....	24
2.6. Isolamento de Mitocôndrias de Fígado .....	24
2.7. Avaliação do Rendimento do Isolamento pelo Método da Citrato Sintase .....	25
2.8. Potencial Eléctrico Transmembranar Mitocondrial .....	25
2.9. Consumo de Oxigénio Mitocondrial .....	27
2.10. Análise histológica - Coloração com PAS .....	28
2.11. Quantificação de Nucleótidos de Adenina .....	28
2.12. Análise Estatística .....	29
<b>Capítulo 3 – Resultados</b> .....	31
3.1. Caracterização dos animais .....	32
3.2. Análise Histológica .....	33

3.2.1. Órgãos Reprodutores .....	33
3.2.2. Fígado .....	35
3.3. Avaliação do Rendimento do Processo de Isolamento Mitocondrial .....	35
3.4. Respiração e Potencial Transmembranar Mitocondriais .....	36
3.4.1. Estudo <i>in vivo</i> .....	36
3.4.2. Estudo <i>in vitro</i> .....	36
3.4.2.1. Testículo .....	36
3.4.2.2. Fígado .....	38
3.4.2.2. Comparação entre Órgãos .....	40
3.5. Quantificação de Nucleótidos de Adenina .....	43
<b>Capítulo 4 – Discussão .....</b>	<b>45</b>
<b>Capítulo 5 – Conclusão .....</b>	<b>52</b>
<b>Capítulo 6 – Referências bibliográficas .....</b>	<b>54</b>

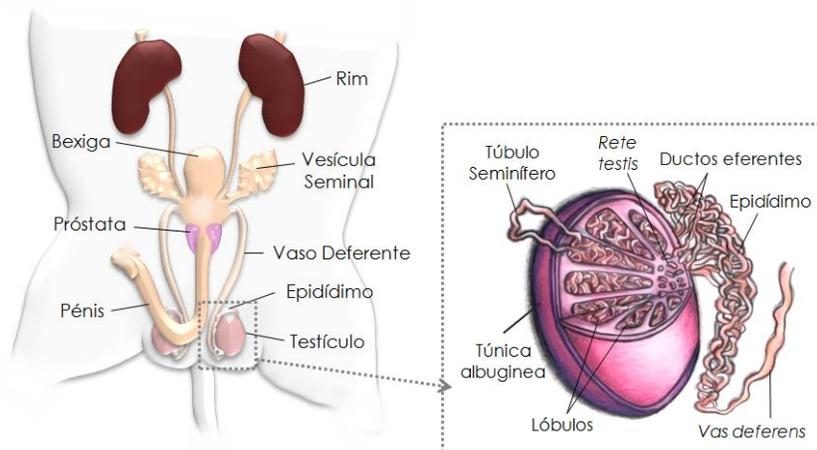
# Capítulo 1

Introdução

## 1. Introdução

### 1.1. O Sistema Reprodutor Masculino

A manutenção de uma espécie animal passa pelo seu sucesso reprodutor, sendo o início de uma nova geração marcado pela junção dos gametas feminino e masculino (McLaren, 2003). A produção de espermatozoides (gametas masculinos) dá-se ao nível do testículo através de um processo designado espermatogénese. Os mamíferos possuem um par de testículos, sendo cada um revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea. Septos dividem o parênquima testicular em lóbulos, sendo cada lóbulo constituído por vários túbulos seminíferos enrolados e unidos por tecido conectivo (Holstein *et al.*, 2003). Os túbulos seminíferos comunicam com a *rete testis* que transporta os espermatozoides até aos ductos eferentes. Estes fazem a ligação entre o testículo e o epidídimo, uma estrutura tubular essencial para a maturação dos gametas. Do epidídimo os espermatozoides são libertados para o *vas deferens* e libertados para o exterior durante a ejaculação através da uretra do pénis. O sémen ejaculado é constituído não só pelos gametas masculinos mas também por um conjunto de secreções que têm origem em glândulas anexas como a próstata e as vesículas seminais (de Kretser & Kerr, 1994; Holstein *et al.*, 2003) (**Fig. 1**).



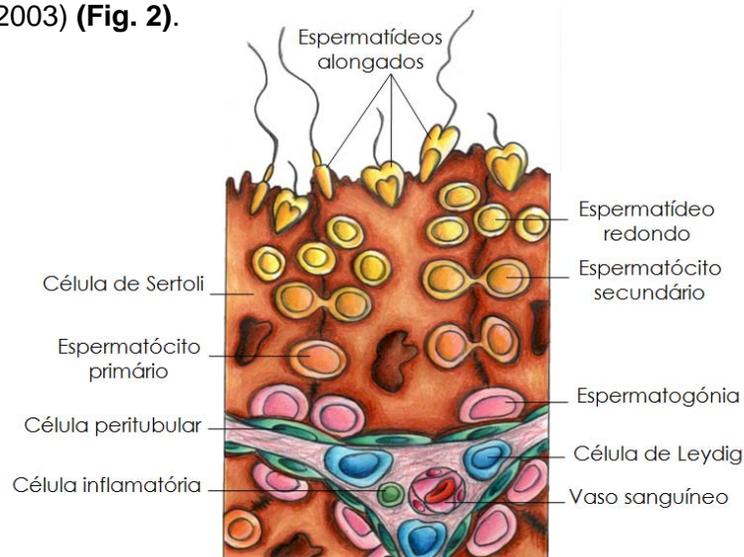
**Figura 1** – Sistema reprodutor masculino do rato e estrutura do testículo. Adaptado de Schauf *et al.*, 1990 e [http://www.biologycorner.com/bio3/anatomy/rat\\_urogenital.html](http://www.biologycorner.com/bio3/anatomy/rat_urogenital.html)

#### 1.1.1. O Testículo

O testículo é constituído pelos túbulos seminíferos e pelas regiões intertubulares. Os túbulos seminíferos de um testículo de mamífero adulto são compostos por epitélio seminífero e tecido peritubular (lâmina própria). O epitélio seminífero é constituído por

células germinais em diferentes estágios de desenvolvimento, localizadas em invaginações das células de Sertoli (Holstein *et al.*, 2003). Este tipo celular permite a criação da barreira hemato-testicular, formada por tight junctions entre células de Sertoli adjacentes, separando o epitélio seminífero em compartimento basal e compartimento adluminal, e constituindo uma delicada fronteira entre células diplóides e haplóides (Peterson & Söder, 2006). A barreira hemato-testicular permite que o sistema imunitário não reconheça os antigénios presentes na superfície das células germinais haplóides, fazendo do testículo um órgão imunologicamente privilegiado (Mruk & Cheng, 2004). Além da formação da barreira testicular, as células de Sertoli têm funções muito importantes na espermatogénese tais como conferir suporte físico e nutritivo às células germinais, tradução dos sinais hormonais, fagocitose de restos celulares e células germinais apoptóticas e criação de um nicho privilegiado para a auto-renovação das células espermatogoniais (Holstein *et al.*, 2003). O tecido peritubular é constituído por camadas de células peritubulares e por depósitos de substâncias como glicosaminoglicanos e ácido hialurónico, que possibilitam as contracções peristálticas dos túbulos seminíferos essenciais para o transporte dos espermatozóides (Holstein *et al.*, 2003; Mruk & Cheng, 2004)

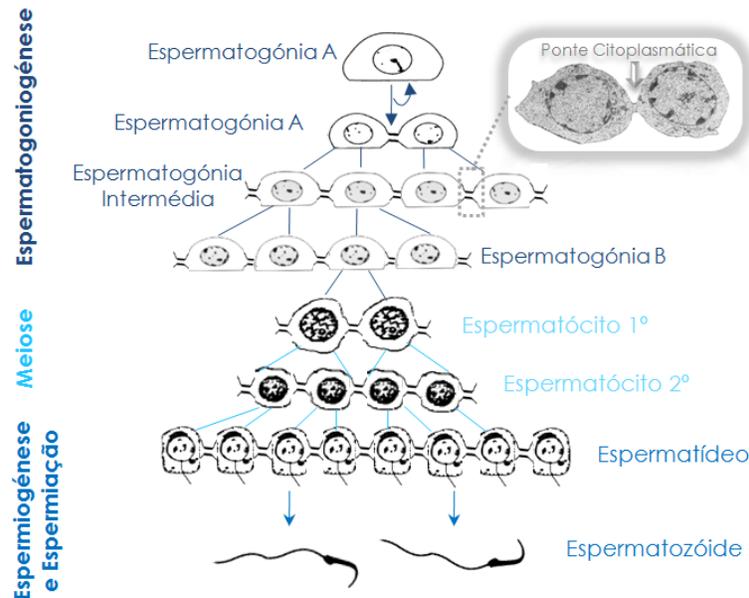
Nas regiões intertubulares existem grupos de células de Leydig, vasos sanguíneos, fibras nervosas, macrófagos, fibroblastos, células de tecido conectivo e vasos linfáticos. Também se podem encontrar linfócitos livres no espaço intertubular por exemplo em caso de degeneração do túbulo seminífero, infecções e reacções alérgicas (Holstein *et al.*, 2003) (**Fig. 2**).



**Figura 2** – Os diferentes tipos celulares presentes no túbulo seminífero. Adaptado de Ramón Piñón, 2002, Junqueira & Carneiro, 2003

### 1.1.2. Espermatogénese

A espermatogénese é o processo através do qual uma população complexa e interdependente de células germinais origina gâmetas masculinos (Holstein *et al.*, 2003) (**Fig. 3**). Este processo envolve a diferenciação de uma espermatogónia diplóide num espermatozóide haplóide e tem lugar nos túbulos seminíferos do testículo. Na espécie humana a espermatogénese inicia-se na puberdade, após um longo período preparatório de “pré-espermatogénese”. No entanto noutras espécies (como no rato) não existe qualquer período preparatório, sendo o processo iniciado pouco depois do nascimento, podendo observar-se espermatozóides nos túbulos seminíferos logo aos 50 dias de idade (de Kretser & Kerr, 1994; Holstein *et al.*, 2003). Na espermatogénese de mamíferos é possível distinguir três fases: espermatogoniogénese, meiose e espermiogénese (Holstein *et al.*, 2003).

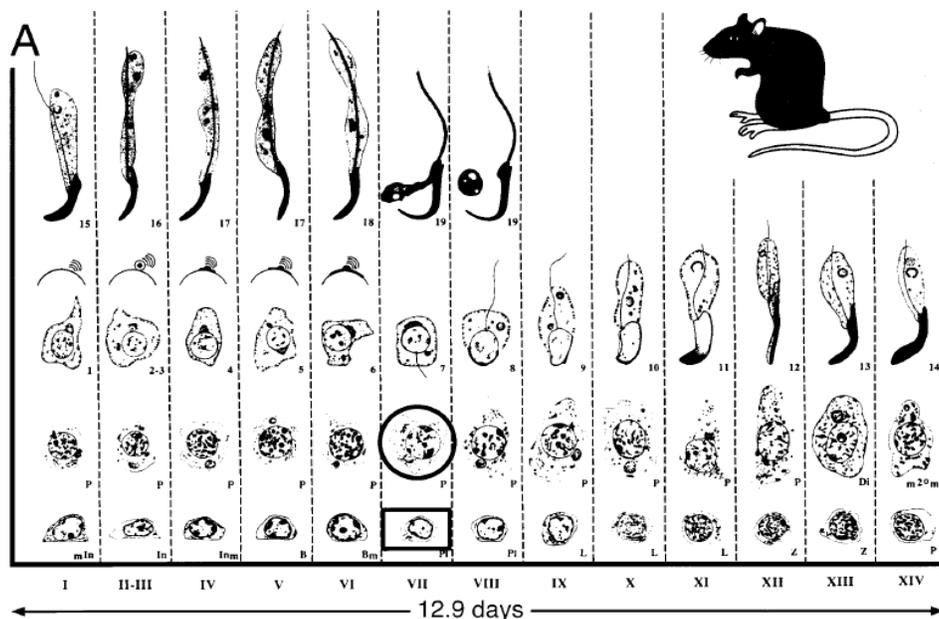


**Figura 3** – Esquema da espermatogénese. Adaptado de de Rooij & Russell, 2000; França *et al.*, 1998; Mays-Hoopes *et al.*, 1995.

Na fase de espermatogoniogénese ocorre divisão mitótica das espermatogónias, que se auto-renovam mantendo o reservatório estaminal ou se diferenciam para originar espermatozóides (Ehmcke *et al.*, 2006). Quando as espermatogónias se dividem, as células resultantes permanecem ligadas por pontes citoplasmáticas, levando à formação de uma área de continuidade citoplasmática. Estes pontos de contacto possibilitam a partilha de substâncias entre células adjacentes, permitindo uma sincronização das actividades celulares (de Rooij & Russell, 2000), mantendo-se até às

fases finais de diferenciação do espermatozóide (Holstein *et al.*, 2003). O estágio de meiose é caracterizado por alterações na configuração da cromatina dos espermatócitos, ocorrendo nesta fase importantes fenómenos como a replicação do ADN, condensação dos cromossomas, emparelhamento dos cromossomas homólogos e crossing-over. Os espermatídeos resultantes do processo de meiose sofrem um processo de citodiferenciação pós-meiótica durante a fase de espermiogénese. Este processo engloba a condensação da cromatina nuclear, redução do volume citoplasmático e desenvolvimento de estruturas específicas como o acrossoma e o flagelo. Após a diferenciação os espermatídeos maduros libertam-se do epitélio seminífero através de um processo denominado espermiacção

O processo de espermatogénese é cíclico e pode ser dividido artificialmente em estádios ou associações celulares. O número de estádios é característico da espécie, sendo que no rato podem ser observados 14 (I-XIV) estádios (**Fig. 4**). Um estágio corresponde a associações específicas entre células germinais no epitélio seminífero, isto porque a organização dos vários tipos celulares não é aleatória. O ciclo espermatogénico engloba o conjunto dos estádios, e a sua duração, dependente da espécie, corresponde ao tempo que uma célula demora a percorrer todos os estádios (no rato é de 12,9 dias). Os estádios encontram-se organizados sequencialmente ao longo do comprimento do túbulo seminífero, denominada onda espermatogénica, fazendo com que numa secção de corte apenas existam células de um estágio.



**Figura 4** – Estádios do ciclo espermatogénico do rato. Adaptado de França *et al.*, 1998.

Contudo, podem ocorrer zonas de transição entre estádios sucessivos, sendo possível observar dois a três estádios no mesmo corte (França *et al.*, 1998; Sauders, 2003).

A espermatogénese é um processo pouco eficiente no que respeita ao controlo de qualidade, já que, a quantidade de células germinativas perdidas e o número de espermatozóides mal formados é extremamente elevado (Holstein *et al.*, 2003). É também um processo redundante, uma vez que a resposta a influências ambientais (como o aumento de temperatura testicular), doenças, falta de nutrientes, agentes terapêuticos, drogas, hormonas e seus metabolitos, substâncias tóxicas e radiação é idêntica. Sob influência de condições negativas, o testículo responde com a redução da espermatogénese através de redução do número de espermátides maduros, e com a produção de espermátides anormais, ausência de espermição, alterações da meiose, paragem da espermatogénese no estágio de espermátocito primário, diminuição da multiplicação ou apoptose das espermatogónias (Hikim *et al.*, 2003; Holstein *et al.*, 2003).

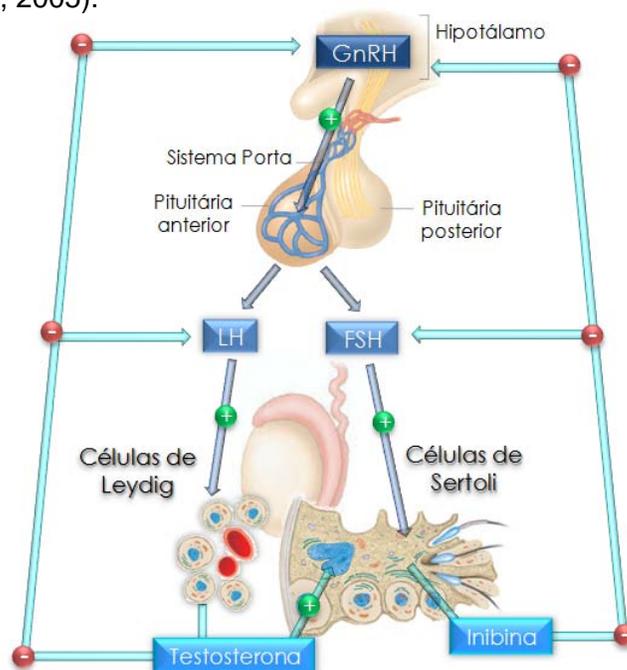
A completa maturação dos espermatozóides só ocorre após a passagem através do epidídimo. O epidídimo é estrutural e funcionalmente diferente dos túbulos seminíferos, sendo as suas maiores funções o transporte de espermatozóides, sua maturação (a mais evidente alteração observada é a aquisição de motilidade) e o seu armazenamento (Robaire & Viger, 1995)

#### **1.1.2.1 Regulação Hormonal da Espermatogénese**

Uma espermatogénese e fertilidade normais dependem de interacções parácrinas entre células somáticas e células germinais, e da regulação endócrina exercida pelo eixo hipotálamo-hipofisário (Sauders, 2003). A hormona chave no controlo hormonal é a hormona libertadora de gonadotropinas (GnRH), um peptídeo produzido por neurónios especializados do hipotálamo. Os pulsos de produção de GnRH sinalizam, através do sistema porta hipotálamo-hipofisário, a produção da hormona folículo estimulante (FSH) e da hormona luteinizante (LH) pelas células da glândula pituitária anterior (ou hipófise anterior), que actuam no testículo e regulam o potencial espermatogénico (Fox, 2003; Walker & Cheng, 2005). As gonadotropinas FSH e LH têm três funções primárias na gónada masculina: estimulação da espermatogénese, estimulação da secreção hormonal e manutenção da estrutura do testículo (Fox, 2003). Apenas as células somáticas do testículo possuem receptores para gonadotropinas (Sauders, 2003). A hormona LH liga-se a receptores na superfície das células de Leydig, estimulando a

produção de androgénios como a testosterona, que se difundem através da corrente sanguínea. Por sua vez a hormona FSH liga-se a receptores existentes nas células de Sertoli e está envolvida, por exemplo, na proliferação das células de Sertoli e na regulação quantitativa da espermatogénese (Walker & Cheng, 2005). Por último, registe-se que o testículo exerce um feedback negativo sobre a secreção de gonadotropinas da produção de testosterona e de inibina B (**Fig. 5**) (Fox, 2003).

Os androgénios e em particular a testosterona são essenciais para a manutenção da espermatogénese. As concentrações intratesticulares de testosterona no rato adulto são aproximadamente 50 a 100 vezes superiores às encontradas no sangue (Walker & Cheng, 2005). Para que a testosterona exerça as suas funções é necessário que se ligue a receptores de androgénios, que no testículo são apenas expressos no núcleo das células peritubulares e das células de Sertoli. Uma vez que o receptor dos androgénios não é expresso nas células germinais, os efeitos da testosterona na regulação da espermatogénese são sinalizados pela modulação dos produtos produzidos pelas células de Sertoli (Sauders, 2003). O mecanismo de sinalização pela testosterona é semelhante ao de outras hormonas esteróides, iniciando-se com a difusão da hormona através da membrana plasmática até a um receptor intracelular. Após a sua ligação, o receptor sofre modificações conformacionais adquirindo afinidade pelo ADN, podendo atrair proteínas co-activadoras e influenciar a transcrição genética (Walker & Cheng, 2005).



**Figura 5** – Regulação hormonal da espermatogénese. Adaptado de Fox, 2003; Meinhardt *et al.*, 1999.

## 1.2. O metabolismo do testículo

A fertilidade e funcionamento testicular estão dependentes da regulação hormonal mas também do normal funcionamento das células, relacionado com o seu nível energético. No testículo adulto a sobrevivência das células germinais depende do metabolismo de hidratos de carbono, quer por via anaeróbica (glicólise) quer por via aeróbia (fosforilação oxidativa). Contudo os diferentes tipos celulares diferem nos substratos preferencialmente usados (Bajpai *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 1984; Robinson & Fritz, 1981). As espermatogónias no compartimento basal têm fácil acesso aos componentes da corrente sanguínea como a glicose, mas as células germinais no compartimento adluminal obtêm energia essencialmente a partir de lactato e piruvato proveniente das células de Sertoli (Boussouar & Benahmed, 2004). Enquanto espermatogónias, espermatozóides maduros e células de Sertoli apresentam alta actividade glicolítica, espermátides e espermatócitos produzem ATP principalmente por fosforilação oxidativa. Isto pode ocorrer por uma questão de disponibilidade de substratos, já que o fluido do túbulo seminífero é rico em lactato e pobre em glicose, como comprovado pelo facto de os espermatócitos possuírem maquinaria para produzir energia pelas duas vias, mas utilizarem preferencialmente o lactato (Ramalho-Santos *et al.*, 2009).

Por outro lado, a espermatogénese ocorre ao longo de um gradiente de pressões de oxigénio, em consequência da presença de vasos sanguíneos exclusivamente nas regiões intertubulares e da entrada do oxigénio nos túbulos seminíferos apenas por difusão (Wenger & Katschinski, 2005). Este gradiente poderia sugerir o uso de vias metabólicas diferentes pelas células germinais, já que as espermatogónias parecem ter fácil acesso a oxigénio e, por outro lado, os espermatócitos estão sujeitos a pressões de oxigénio muito baixas. Contudo parece que a disponibilidade de substratos imposta pela compartimentação dos túbulos seminíferos, juntamente com a exigência de ATP, leva as células a uma adaptação diferente (Ramalho-Santos *et al.*, 2009).

### 1.2.1. A Mitocôndria e o seu papel preponderante na produção de energia

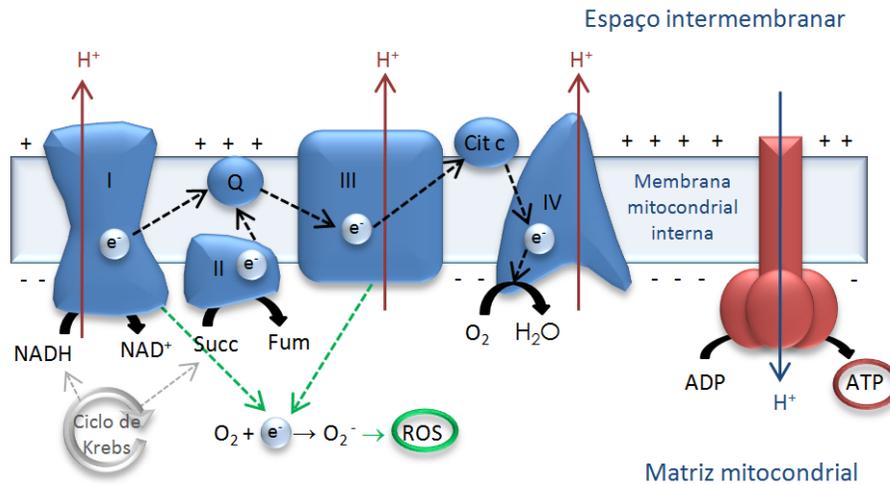
As mitocôndrias são organelos intracelulares, que através da fosforilação oxidativa, representam o maior local de produção de ATP ao nível da célula eucariótica (Kakkar & Sigh, 2007). Estes organelos são extremamente dinâmicos podendo o seu formato, número e distribuição variar consoante o estado funcional da célula e tipo de

tecido onde se encontram (Bereiter-Hahn *et al.*, 2008; Boneh, 2006; Collins & Bootman, 2003; Collins *et al.*, 2002). Embora as mitocôndrias tenham sido descritas ainda antes de 1900, a sua importância e implicações para a vida e morte de um organismo não foi óbvia. A descoberta do envolvimento de defeitos e disfunções mitocondriais num elevado e variado número de doenças (como a doença de Parkinson, a Diabetes Mellitus e no processo de envelhecimento) fez despertar o interesse por este organelo. O papel central que desempenha nos fenómenos de apoptose revela também implicações para a oncobiologia, senescência e morte de um organismo (Kakkar & Singh, 2007). Actualmente sabe-se ainda que estes organelos exercem importante funções nas vias de sinalização metabólica, armazenamento e libertação de cálcio, produção de NADPH, síntese de ADN, RNA, proteínas e termogénese (Pedersen, 1999).

O conhecimento básico da estrutura e funcionamento da mitocôndria mudou de forma extraordinária ao longo dos anos (Frey & Mannella, 2000; Skulachev, 2001), contudo este organelo continua a ser dividido em 4 compartimentos bem definidos: membrana externa, membrana interna, espaço intermembranar e matriz mitocondrial (Wallace & Starkov, 2000). As membranas mitocondriais possuem naturezas distintas, o que lhes confere características diferentes e cria o espaço intermembranar. A membrana interna possui uma elevada área de superfície, permeabilidade limitada e alberga os 4 complexos multiproteicos responsáveis pela fosforilação oxidativa, que constituem a cadeia respiratória (Fariss *et al.*, 2005; Wallace & Starkov, 2000). A matriz mitocondrial é um compartimento aquoso onde se encontra o ADN mitocondrial (ADNmt) e várias enzimas solúveis envolvidas em eventos mitocondriais importantes, como no ciclo de Krebs e na  $\beta$ -oxidação de lípidos (Wallace & Starkov, 2000).

A produção de energia na mitocôndria através do processo de fosforilação oxidativa envolve um fluxo de electrões ao longo da cadeia respiratória mitocondrial, em particular, dos complexos enzimáticos I a IV, acoplada a uma extrusão de prótons que são depois utilizados pelo complexo V (ATP sintase) para a síntese de ATP (**Fig. 6**). Assim de forma resumida, o complexo I (NADH-ubiquinona oxidoreductase) e o complexo II (succinato-ubiquinona oxidoreductase) aceitam electrões provenientes do NADH e do Succinato respectivamente, consistindo nos dois pontos de entrada de electrões na cadeia respiratória a partir de intermediários do ciclo de Krebs. Os electrões são depois enviados para a molécula de ubiquinona e transferidos para o complexo III (ubiquinol-citocromo c oxidoreductase). Daí os electrões são enviados para o

complexo IV (citocromo c-oxigênio oxidoreductase), onde reduzem o oxigênio molecular (aceitador final de electrões) a água. (Boneh, 2006; Kakkar & Sigh, 2007; Pedersen, 1999).



**Figura 6** – Representação esquemática dos vários complexos envolvidos na fosforilação oxidativa (complexos I-IV e ATP sintase). Adaptado de Brookes, 2005; Kakkar & Sigh, 2007; Pederson, 1999. **NADH** – Nicotidamida adenina dinucleótido, forma reduzida; **NAD<sup>+</sup>** – Nicotinamida adenina dinucleótido, forma oxidada; **Succ** – Succinato; **Fum** – Fumarato; **Q** – Ubiquinona; **Cit c** – Citocromo c; **e<sup>-</sup>** – electrão; **H<sup>+</sup>** – próton; **O<sub>2</sub><sup>-</sup>** – anião superóxido; **ROS** – espécies reactivas de oxigênio.

A energia envolvida na transferência de electrões através da cadeia respiratória permite aos complexos I, III e IV catalisar a translocação de protões através da membrana mitocondrial interna para o espaço intermembranar, resultando na formação de um gradiente electroquímico ( $\mu\text{H}^+$ ) (Kakkar & Sigh, 2007; Pedersen, 1999). Este gradiente electroquímico de protões é a forma primária de energia gerada pela mitocôndria e é constituído pela componente eléctrica (potencial eléctrico transmembranar –  $\Delta\Psi$ ), resultante da diferença de cargas entre o espaço intermembranar e a matriz, e pela componente química (gradiente de pH –  $\Delta\text{pH}$ ), resultante da diferença de pH entre estes dois espaços (Wallace & Starkov, 2000). A energia contida no gradiente é utilizada pela ATP sintase para levar a cabo a síntese e libertação de ATP (Kakkar & Sigh, 2007) através da re-entrada por bombas protónicas do complexo V, de protões para a matriz, podendo este processo ocorrer com maior ou menor eficiência.

Contudo a produção de ATP pela mitocôndria é acompanhada pela produção de espécies reactivas de oxigênio (ROS) potencialmente perigosas para a célula. Durante a transferência de electrões ao longo da cadeia respiratória pode ocorrer fuga de electrões (nomeadamente os complexos I e III), que por sua vez reagem directamente

com o oxigénio ou com outros aceitadores de electrões e geram radicais livres (**Fig. 6**) (Fariss *et al.*, 2005; Orrenius *et al.*, 2007). Embora em baixas concentrações ROS possam ser importantes em mecanismos de sinalização celular (Orrenius *et al.*, 2007) e para uma normal fertilidade (Fisher & Aitken, 1997), quando em excesso estão associados a uma função anormal dos espermatozóides e à infertilidade masculina (Agarwal *et al.*, 2003). Assim, as mitocôndrias necessitam de uma protecção constante contra estas espécies, realizada através de uma ampla rede de defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Quando a produção excessiva de ROS não é acompanhada pelos mecanismos de defesa antioxidantes, ocorre uma situação de stress oxidativo, podendo causar danos no ADN, peroxidação lipídica, inactivação de proteínas e o desencadear de morte celular (Ott *et al.*, 2007).

#### 1.2.1.1. As Mitocôndrias Testiculares

Durante o processo de espermatogénese as mitocôndrias das células germinais sofrem gradualmente uma série de alterações morfológicas, sendo possível identificar três tipos de mitocôndrias: forma ortodoxa (espermatogónias e espermatócitos em leptóteno), forma intermédia (espermatócitos em zigóteno, espermatídeos e espermatozóides) e forma condensada (espermatócitos em paquíteno e espermatócitos secundários) (de Martino *et al.*, 1979; Meinhardt *et al.*, 1999), como representado na **Figura 7**. Foi ainda observada uma interessante associação entre a diferente morfologia observada e o estado metabólico nas diferentes fases da espermatogénese, sendo sugerindo que a forma condensada está associada a uma alta eficácia fosforilativa (de Martino *et al.*, 1979)



**Figura 7** – Diferenciação mitocondrial durante o desenvolvimento das células germinais. Adaptado de Meinhardt *et al.*, 1999.

Além das alterações estruturais observadas, várias proteínas mitocondriais são diferentemente expressas durante fases distintas da espermatogénese. Também é importante referir que existem isoformas específicas de proteínas mitocondriais no

testículo (tais como o citocromo c e a subunidade VIb-2 da citocromo c oxidase (COX) - complexo IV), bem como a expressão preferencial de determinadas proteínas nas mitocôndrias deste órgão face a outros (Meinhardt *et al.*, 1999). Estes factos evidenciam o quanto o testículo é um órgão único em termos metabólicos e podem em parte explicar as vias metabólicas preferencialmente usadas pelos diferentes tipos de células germinais.

É ainda importante referir que a produção de hormonas esteróides ocorre ao nível das mitocôndrias das células de Leydig, sendo necessário que estas se encontrem energizadas, polarizadas e a respirar activamente para que ocorra a biossíntese de hormonas (Allen *et al.*, 2006).

### **1.2.2. A mitocôndria como modelo toxicológico**

As características estruturais e funcionais das mitocôndrias tornam-nas particularmente sensíveis ao impacto de poluentes ambientais. De facto, sabe-se que um grande número de substâncias naturais, comerciais, farmacêuticas e ambientais, manifestam a sua toxicidade por interferirem com a bioenergética mitocondrial (Wallace & Starkov, 2000). A identificação da mitocôndria como o alvo primário ou secundário da toxicidade induzida por diversos compostos, conduziu a que este organelo seja hoje amplamente aceite como um bio-sensor efectivo e de confiança para prever a segurança de medicamentos e xenobióticos. Este modelo foi validado também pela possibilidade de se estabelecer uma correlação entre as concentrações de substâncias no plasma, associadas a toxicidade no organismo, e os dados fornecidos pelos estudos mitocondriais, sugerindo a sua utilidade na avaliação do risco humano e ambiental (Pereira *et al.*, 2009). Além disso, muitos dos dados obtidos usando a mitocôndria como modelo toxicológico são concordantes e complementares aos obtidos em culturas de células e modelos animais (como por exemplo os resultados obtidos para Berberina por Pereira *et al.*, 2007 e para Doxorubicina por Oliveira & Wallace, 2006; Sardão *et al.*, 2009). Os testes usando mitocôndrias ou partículas submitocondriais são mais rápidos, fáceis, baratos e envolvem um menor número de animais que os testes *in vivo* ou com culturas de células e poderão prever os efeitos desses químicos numa grande variedade de espécies, visto que as proteínas dos complexos da cadeia respiratória são altamente conservadas durante a evolução (Pereira *et al.*, 2009).

A toxicidade mitocondrial a poluentes ambientais é frequentemente avaliada em tecido hepático devido ao facto deste órgão apresentar uma alta taxa metabólica e estar

envolvido no metabolismo de xenobióticos (Mota *et al.*, 2009). Além disso, os parâmetros bioenergéticos do fígado estão bem documentados e, por ser um órgão particularmente rico em mitocôndrias, o rendimento do isolamento é elevado, permitindo um número elevado de ensaios (Ferreira *et al.*, 1997). Contudo, estudos anteriores usando mitocôndrias testiculares mostraram que estas apresentam parâmetros bioenergéticos diferentes de mitocôndrias extraídas de outros tecidos, como o fígado, apresentando por exemplo um baixo consumo de oxigénio para aproximadamente o mesmo valor de potencial eléctrico máximo (Amaral *et al.*, 2009; Mota *et al.*, 2009). Estas observações sugerem que ao contrário de estudos anteriores, a mitocôndria testicular deve ser considerada como um modelo toxicológico primário para estudar o efeito de poluentes ambientais na espermatogénese e fertilidade masculina (Mota *et al.*, 2009; Tavares *et al.*, 2009).

### **1.3. Impacto de poluentes ambientais na fertilidade**

Num elevado número de estudos recentes observaram-se fortes evidências de que vários contaminantes ambientais podem ter efeitos adversos na saúde humana e da vida selvagem (Saradha & Mathur, 2006). Estes compostos libertados por diversas actividades humanas incluem poluentes orgânicos persistentes (POPs), como diclorodifeniltricloroetano (DDT), dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDDs), bifenilos policlorados (PCBs) e dibenzofuranos policlorados (PCDFs); mas também metais pesados e ftalatos (Tavares *et al.*, 2009; Tiido *et al.*, 2005).

Evidências apontam para que alguns destes poluentes ambientais tenham um impacto negativo sobre a reprodução humana, podendo estar envolvidos em desordens reprodutivas, como cancros testiculares, hipospadias e criptorquidismo, e na diminuição da qualidade espermática registados nos últimos anos (Carlsen *et al.*, 1992; Skakkebaek *et al.*, 2001; Toppari *et al.*, 1996). Actualmente nos países desenvolvidos cerca de 15% dos casais têm problemas de fertilidade, sendo cerca de metade dos casos atribuídos ao homem, através de uma baixa motilidade e/ou concentração de espermatozóides (Tavares *et al.*, 2009). A influência negativa na funcionalidade dos espermatozóides por contaminantes ambientais pode ocorrer por indução de danos no ADN nuclear, aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e stress oxidativo (Rignell-Hydbom *et al.*, 2005; Saradha & Mathur, 2006) ou por acções indirectas, ao mimetizarem o efeito de algumas hormonas, designando-se de disruptores endócrinos. A exposição paterna a níveis elevados de POPs foi associada a

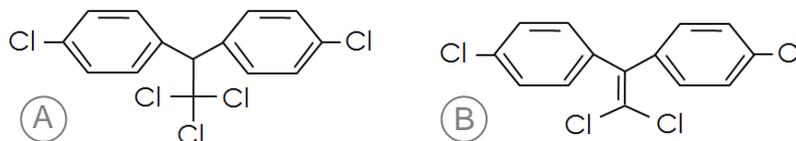
uma diminuição no nascimento de rapazes, enquanto que exposições moderadas podem levar a um desvio do rácio dos sexos num sentido ou noutro. Desconhecem-se os mecanismos que levam a esta alteração havendo no entanto indicações de que a proporção de espermatozóides ejaculados contendo o cromossoma Y pode estar alterada (Tiido *et al.*, 2005). Além destes efeitos directos, alguns estudos associam estas substâncias a alterações transgeracionais, possivelmente por alteração do padrão de metilação das células germinais, podendo estas ser transmitidas até à quarta geração, o que torna o impacto futuro nas populações humanas e animais ainda mais preocupante (Anway *et al.*, 2005; Anway & Skinner, 2006)

Embora tenham sido feitos esforços para reduzir a emissão de poluentes ambientais nos últimos anos, um extenso programa de investigação é necessário para compreender a amplitude deste problema e permitir o desenvolvimento de estratégias de prevenção e intervenção (Toppari *et al.*, 1996), uma vez que estes compostos caracterizam-se por serem altamente persistentes no ambiente. Outras características como resistência à degradação biológica e química e elevada lipossolubilidade permitem a sua bioacumulação ao longo das cadeias alimentares (Aneck-Hahn *et al.*, 2007; Tiido *et al.*, 2005). Alguns dos estudos realizados nos últimos anos focam os efeitos dos poluentes ambientais DDE (1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etileno) e do TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina) no sistema reprodutor masculino.

### **1.3.1. DDT e seu metabolito DDE**

O DDT (diclorodifeniltricloroetano) foi usado na agricultura, durante aproximadamente 30 anos, como um comum pesticida e para controlar doenças transmitidas por insectos como a malária e febre-amarela (Ferreira *et al.*, 1997; Leavens *et al.*, 2002). Devido à sua natureza lipofílica e resistência à biodegradação, o DDT é bioacumulado nas cadeias alimentares e persiste no ambiente, podendo ser acumulado nos sedimentos e solo e ser transportado até longas distância pelo ar ou água (Aneck-Hahn *et al.*, 2007; Clarkson, 1995; Tebourbi *et al.*, 2006; WHO, 2004). Os seus efeitos adversos sobre os ecossistemas naturais levaram a tenha sido banido nos anos 70 na maioria dos países industrializados. Contudo este insecticida ainda é usado em alguns locais do mundo para controlar os vectores transmissores de doenças (Leavens *et al.*, 2002; WHO, 2004). Embora a exposição a DDT possa ocorrer mais directamente em indivíduos envolvidos na produção e aplicação deste insecticida, estima-se que 90% do DDT acumulado na população geral provém da alimentação (WHO, 2004). Devido às

suas propriedades, não existe actualmente no planeta um único organismo vivo que não contenha DDT no seu organismo; resíduos de DDT têm sido encontrados mesmo em animais que vivem em áreas desertas ou no oceano profundo (Turusov *et al.*, 2002).



**Figura 8** – Estrutura química do DDT (A) e do DDE (B). Adaptado de Kelce *et al.*, 1995

Diversos estudos apontam para que o DDT e o seu metabolito DDE (1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etileno) possam causar efeitos adversos no sistema reprodutor masculino (**Fig. 8**) (Leavens *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2008). A maioria dos estudos foca a acção de “disruptor endócrino” destas substâncias, o DDT mimetizando a acção de estrogénios e o DDE antagonizando os receptores dos androgénios (Kelce *et al.*, 1995; Rosselli *et al.*, 2000). Por exemplo, em espécies selvagens estão descritas anomalias reprodutivas, tais como o desenvolvimento de gónadas masculinas com características femininas em répteis e peixes, e um menor espessamento na casca de ovos de aves e outras espécies ovíparas (Aneck-Hahn *et al.*, 2007). A exposição de ratos machos adultos a DDT induz toxicidade reprodutiva, levando a uma diminuição do peso dos órgãos reprodutores e a uma redução da motilidade e número de gâmetas no lúmen dos túbulos seminíferos e no epidídimo. Além disso, este composto provoca uma diminuição da produção de testosterona e um aumento dos níveis de FSH e LH (Ben Rhouma *et al.*, 2001). Já em relação ao metabolito DDE, a exposição *in útero* e durante a puberdade conduz a alterações no desenvolvimento dos órgãos sexuais masculinos em ratos (Kelce *et al.*, 1995; You *et al.*, 1998). Por outro lado, a exposição a DDE em ratos adultos conduz apenas a uma redução do peso de glândulas anexas (vesícula seminal e próstata ventral) sem qualquer alteração no desenvolvimento dos órgãos reprodutores e na concentração de espermatozóides no epidídimo (Kelce *et al.*, 1995; Leavens *et al.*, 2002; Makita *et al.*, 2003a; Makita *et al.*, 2003b; Romero, 1998).

Em humanos, a maioria dos estudos apresenta resultados inconclusivos em relação ao efeito adverso do DDE sobre a fertilidade masculina e possíveis anomalias no sistema reprodutor (como Bathia *et al.*, 2005; Dalvie *et al.*, 2004; Longnecker *et al.*, 2002; Longnecker *et al.*, 2007; Rignell-Hydbom *et al.*, 2004), contudo alguns estudos

fornece indicações que apontam nesse sentido (como Aneck-Hahn *et al.*, 2007; de Jager *et al.*, 2006; Tiido *et al.*, 2005; Tiido *et al.*, 2006).

Estudos recentes usando culturas primárias de células de Sertoli como modelo toxicológico *in vitro*, evidenciam que o DDE pode afectar o sistema reprodutor por acção directa sobre as células somáticas do testículo. No estudo de Xiong *et al.* (2006) verificou-se que a exposição a DDE podia diminuir a viabilidade das células de Sertoli e afectar a expressão de vários genes marcadores de funcionalidade, como a transferrina e proteína de ligação aos androgénios (ABP). A exposição a DDE induzia também morte celular por apoptose, sugerindo que as alterações apoptóticas seriam mediadas pela mitocôndria, visto que se observou elevação dos níveis de ROS, diminuição do potencial de membrana, libertação de citocromo c para o citosol e elevação dos níveis de proteínas envolvidas na cascata apoptótica (Bax, Bak e formas clivadas de procaspase 3 e 9) (Song *et al.*, 2008). Estes resultados sugerem que a geração de ROS pode ter um papel crítico na iniciação da apoptose induzida por DDE, já que as alterações observadas foram em parte bloqueadas por um agente antioxidante (N-acetyl-l-cysteine). Estes estudos vão ao encontro de indicações fornecidas por trabalhos anteriores onde a exposição a DDT já tinha sido associada à indução de morte celular por apoptose (Perez-Maldonado *et al.*, 2004; Tebourbi *et al.*, 1998), quebras no ADN (Hassoun *et al.*, 1993) e peroxidação lipídica (Barros *et al.*, 1994).

Outros estudos indicam que o DDT e o DDE podem ter efeitos directos sobre mitocôndrias de fígado. Enquanto o DDT está associado a uma inibição da ATP sintase/ATPase, o DDE demonstrou não provocar efeitos ao nível deste sistema. Porém a exposição a DDE provoca outras alterações nas mitocôndrias de fígado, como uma diminuição da respiração e do potencial de membrana gerado por estas (Ferreira *et al.*, 1997; Moreno & Madeira, 1991). Em alta concentração provoca também danos na integridade das membranas mitocôndrias, podendo isto estar relacionado com alterações de fluidez associadas ao forte carácter hidrofóbico do DDE (Antunes-Madeira *et al.*, 1993; Ferreira *et al.*, 1997).

Assim, surgem várias evidências de que o DDE, além de afectar o sistema reprodutor masculino por alterações na regulação hormonal, pode ter uma acção mais directa sobre as células testiculares, estando a mitocôndria possivelmente envolvida na toxicidade induzida por este composto.

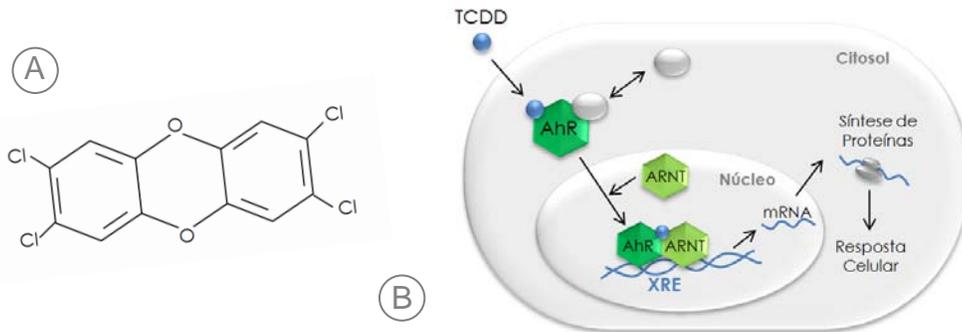
### 1.3.2. Dioxinas e TCDD

As dioxinas são uma classe de contaminantes ambientais altamente tóxicos e amplamente dispersos que incluem PCDDs, PCDFs e PCBs. De uma forma simplificada o termo dioxina é usado para referir compostos que exercem os seus efeitos ligando a receptores aril-hidrocarboneto (AhR). O TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina) é o membro mais potente da classe das dioxinas sendo por isso normalmente usado para estudar os seus efeitos em ensaios toxicológicos (Dhooge *et al.*, 2006; Mandal *et al.*, 2005). Estes contaminantes ambientais são produzidos de forma não intencional, por exemplo por processos de combustão, incineração e processos industriais, dispersando-se pela atmosfera, solo e água. Embora as concentrações ambientais de dioxinas sejam geralmente baixas, estes compostos de elevada estabilidade, metabolização lenta e natureza lipofílica, tendem a acumular-se nos organismos, principalmente no tecido adiposo. Aproximadamente 80% da exposição humana a dioxinas ocorre através do consumo de alimentos contaminados (Grassman *et al.*, 1998).

Os efeitos provocados pela exposição a dioxinas já foram observados em várias espécies selvagens, domésticas e laboratoriais; evidenciando alguma variabilidade entre espécies. A exposição a TCDD está associada a toxicidade em de diversos sistemas e órgãos como fígado, coração, pele; sistema imunitário, sistema nervoso e sistema reprodutor. A acção de disruptor endócrino do TCDD também é reconhecida, estando relatadas diversas alterações em sistemas endócrinos (Birnbaum & Tuomisto, 2000; Pocar *et al.*, 2005). Por outro lado também está descrita uma maior incidência de tumores após a exposição a TCDD, levando a que fosse classificado como um agente cancerígeno em humanos (Ray & Swanson, 2009).

Sabe-se que as dioxinas podem induzir toxicidade por se ligarem ao receptor aril-hidrocarboneto (AhR), sendo esta possibilidade fortemente suportada pela observação de que ratinhos knock-out para o AhR são resistentes à toxicidade induzida por dioxinas (Fernandez-Salguero *et al.*, 1996). O AhR no estado inactivo encontra-se no citosol complexado a proteínas, mas após a ligação do TCDD sofre uma transformação conformacional, sendo translocado para o núcleo e dimerizando com o ARNT (translocador nuclear do receptor aril hidrocarboneto). O complexo AhR-ARNT fica assim activo e liga-se ao ADN em elementos de resposta a xenobióticos (XRE), induzindo a transcrição genética de vários genes e desencadeando uma resposta celular (**Fig. 9**) (Pocar *et al.*, 2005; Rosselli *et al.*, 2000). Sabe-se que o AhR regula a

transcrição de muitos genes incluindo alguns envolvidos no metabolismo de ácidos gordos, regulação do ciclo celular, resposta imunitária e metabolismo de xenobióticos (Biswas *et al.*, 2008); podendo também ter um papel importante na fisiologia do sistema reprodutor, como sugerido pela diminuição de fertilidade em ratinhos knock-out para o AhR (Pocar *et al.*, 2005).



**Figura 9** – Estrutura química do TCDD (A) e seu mecanismo de ação dependente do receptor AhR (B). Adaptado de Mandal *et al.*, 2005; Pocar *et al.*, 2005; Rosselli *et al.*, 2000.

Em relação aos efeitos do TCDD no sistema reprodutor, estudos com animais de laboratório indicaram que os efeitos mais potentes deste composto ocorrem durante a exposição in utero e período de aleitamento, provocando anomalias no sistema reprodutor masculino e feminino da descendência. Nos descendentes masculinos foram detectadas diversas alterações como malformações nos órgãos reprodutores, diminuição da concentração de espermatozoides e aumento do número de espermatozoides anormais, diminuição do peso dos órgãos reprodutores e comportamento sexual desmasculinizado (Faqi *et al.*, 1998; Gray *et al.*, 1995; Gray *et al.*, 1997; Ikeda *et al.*, 2005). Já a exposição num período próximo e após a maturação sexual não causa alterações tão evidentes na fertilidade masculina. Contudo em alguns estudos foi detectada uma diminuição do peso do testículo e glândulas anexas e diminuição na produção, motilidade e reacção acrossómica de espermatozoides, bem como alteração nos níveis de FSH, LH e testosterona (Choi *et al.*, 2008; el-Sabeawy *et al.*, 1998; Simanainen *et al.*, 2004).

Muitos dos dados relativos à toxicidade das dioxinas no sistema reprodutor humano provêm de populações sujeitas a libertações acidentais, contaminação elevada dos alimentos e exposição ocupacional em diversas indústrias. Nestas populações apesar de muitos estudos serem inconclusivos ou indicarem uma ausência de efeitos, estão descritas alterações na razão dos sexos com maior probabilidade de gerar

descendência feminina (Mocarelli *et al.*, 2000), alterações nos níveis hormonais (Kogevinas *et al.*, 2001; Mocarelli *et al.*, 2008) e redução da concentração e motilidade de espermatozóides após exposição na infância (Mocarelli *et al.*, 2008).

Recentemente surgiram evidências que o TCDD pode afectar o sistema reprodutor por acção directa sobre as células testiculares. Em culturas primárias de células de Sertoli foi observado que este composto pode modular a expressão de produtos secretados por estas células e interferir com a comunicação intercelular, podendo conduzir a uma perturbação na espermatogénese (Lai *et al.*, 2005a). Também se observou que o TCDD pode alterar o processo de esteroidogénese em culturas primárias de células de Leydig (Lai *et al.*, 2005b). O que vai ao encontro de resultados previamente obtidos com animais tratados com TCDD onde foram observadas anomalias testiculares, como uma redução do volume e número das células de Leydig (Johnson *et al.*, 1992) e alterações nas conexões entre células de Sertoli e espermatogónias (Rune *et al.*, 1991).

Além disso, verificou-se que a exposição a TCDD induz stress oxidativo em vários órgãos indicando que a mitocôndria pode ter um papel importante na toxicidade induzida por TCDD. De facto observou-se um aumento na produção de anião superóxido, peroxidação lipídica e danos no ADN em tecidos hepáticos e cerebrais de animais expostos a dioxinas (Hassoun *et al.*, 2001; Hassoun *et al.*, 2000). Além disso também se observou um aumento da produção de ROS, alterações em vários complexos, incluindo defeitos no complexo ATPsintase, e alterações em vários parâmetros bioenergéticos em mitocôndrias de fígado de ratinhos tratados com TCDD (Senft *et al.*, 2002a; Shertzer *et al.*, 2006). No sistema reprodutor verificou-se que o TCDD suscita o stress oxidativo em espermatozóides epididimais e no testículo, uma diminuição da actividade de enzimas sistema de defesa antioxidante e um aumento nos níveis de peróxido de hidrogénio (Latchoumycandane *et al.*, 2003).

O mecanismo biológico pelo qual o TCDD exerce estes efeitos no sistema reprodutor ainda não está completamente esclarecido. Enquanto diversos estudos indicam que a toxicidade induzida por TCDD é mediada pelo AhR (como Fernandez-Salguero *et al.*, 1996; Fisher *et al.*, 2005; Pocar *et al.*, 2005; Senft *et al.*, 2002b), outros apontam para que o TCDD possa activar vias alternativas de resposta independentes deste receptor (Ahmed *et al.*, 2005; Biswas *et al.*, 2008; Hassain *et al.*, 1998; Simanainen *et al.*, 2004). Biswas *et al.* (2008) sugerem que o TCDD pode promover a progressão de tumores por actuar directamente na transcrição e stress oxidativo

mitocôndria, indicando que a mitocôndria pode ser importante na toxicidade por vias independentes do AhR.

#### **1.4. Objectivos**

Este trabalho teve como objectivo avaliar o impacto do DDE e TCDD na bioenergética testicular através de estudos *in vivo* e *in vitro*, com injeção intraperitoneal de DDE/TCDD em ratos machos adultos ou aplicação directa destes dois compostos em mitocôndrias, respectivamente. As possíveis alterações nos parâmetros bioenergéticos serão avaliadas usando eléctrodos de TPP<sup>+</sup> e oxigénio, permitindo avaliar alterações na respiração e no potencial eléctrico transmembranar mitocondriais. Além disso realizar-se-á também quantificação do conteúdo em nucleótidos de adenina após um ciclo fosforilativo e a análise histológica de alguns tecidos. Após avaliação destes parâmetros pretende-se sugerir o mecanismo de acção pelo qual estes poluentes ambientais afectam a mitocôndria de testículo, tentando desvendar se a toxicidade induzida por estes compostos ocorre por impacto directo nas mitocôndrias ou se tem de ser mediada por receptores.

Comparando os resultados dos estudos *in vivo* e *in vitro*, pretende-se avaliar se a mitocôndria testicular pode ser usada como um modelo toxicológico para estudar o efeito de tóxicos ambientais no sistema reprodutor masculino.

Por outro lado, uma vez que é recorrente o uso de mitocôndrias de fígado como modelo para outros órgãos, o estudo comparativo do efeito das mesmas doses de DDE e TCDD sobre mitocôndrias de fígado, terá como objectivo verificar se estes dois órgãos apresentam o mesmo tipo de resposta a estes compostos e permitir validar ou descartar a utilização deste tipo de mitocôndrias na avaliação os efeitos de xenobióticos no sistema reprodutor.

## Capítulo 2

Material e Métodos

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Materiais e Reagentes

Todos os reagentes usados neste trabalho foram adquiridos à Sigma (San Louis, EUA) excepto quando referido. As soluções foram preparadas com água desionizada ultra pura. Todos os reagentes e químicos utilizados possuíam elevado grau de pureza.

DDE (1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etileno; 99,1% de pureza) foi dissolvido em Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 20 mg/ml. TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina; 99% de pureza) foi adquirido à LGC Standards (Barcelona, Espanha) e foi também dissolvido em DMSO na concentração 66,7 µg/ml. A escolha do DMSO como veículo teve em conta o facto de o TCDD ser insolúvel noutros solventes orgânicos não tóxicos, bem como, poder ser injectado nos animais nos estudos *in vivo* ou aplicado directamente às mitocôndrias nos estudos *in vitro*. A solução stock de Antimicina A (derivada de *Streptomyces* sp.) foi dissolvida na concentração de 1 mg/ml em DMSO. Todos os stocks de compostos descritos em cima, bem como as diluições subsequentes, foram congelados e mantidos a -20°C até ao momento do uso.

### 2.2. Animais e sua Manutenção

Os ratos Wistar machos adultos (9-16 semanas) utilizados neste trabalho foram mantidos em condições controladas de luz (ciclos de luz artificial de 12 horas/12 horas de escuridão), humidade (45%-65%) e temperatura (22-24°C), com livre acesso a comida e água, no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Este estudo foi feito de acordo com os princípios de cuidado e uso de animais de laboratório (do Requerimento Europeu para Investigação com animais vertebrados e do procedimento interno para investigação com animais do Centro de Neurociências e Biologia Celular).

### 2.3. Estudo *in vivo*

Os ratos foram divididos aleatoriamente em vários grupos de 5 animais: no grupo DDE os animais foram injectados intraperitonealmente (IP) com uma única dose de 55 mg/kg de DDE; no grupo TCDD foram injectados também por via intraperitoneal com uma única dose de 50 µg/kg de TCDD. A dose de DDE usada foi baseada nos níveis deste composto observados na natureza (Bentzen *et al.*, 2008) e em estudos

anteriores que avaliaram a sua interferência no aparelho reprodutor masculino (Kelce *et al.*, 1995; Leavens *et al.*, 1998; Makita *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 1998). A dose de TCDD utilizada neste estudo foi também baseada em trabalhos que indicaram alterações na capacidade reprodutora (Choi *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 1992; Simanainen *et al.*, 2004; Rune *et al.*, 1991; Fisher *et al.*, 2005; el-Sabeawy *et al.*, 1998).

No grupo Controlo para cada um destes grupos (Controlo DDE e Controlo TCDD) os animais foram injectados com o mesmo volume de veículo (DMSO) que os respectivos animais tratados. O volume médio injectado aos animais do grupo DDE e respectivo controlo foi de 766  $\mu\text{l}$ , enquanto que, o volume médio injectado nos animais do grupo TCDD e Controlo TCDD foi de 229  $\mu\text{l}$ . Os animais foram sacrificados 24 horas após a injeção com estes poluentes ambientais e procedeu-se à avaliação dos parâmetros bioenergéticos das mitocôndrias de testículo em relação aos respectivos grupos controlo.

#### **2.4. Estudo *in vitro***

Além dos animais usados no estudo *in vivo*, já referidos, também foram usados 10 ratos Wistar machos para ensaios *in vitro*. O estudo *in vitro* pretendia avaliar se o DDE e o TCDD tinham efeitos directos sobre as mitocôndrias de testículo, independentemente dos efeitos via receptores já descritos para estes dois compostos. Para este estudo foram também isoladas mitocôndrias de fígado, em que o efeito das drogas era já conhecido, para validar ou descartar a utilização deste tipo de mitocôndrias em estudos que pretendam avaliar o efeito e mecanismos de acção de tóxicos na reprodução.

A escolha das concentrações de DDE, TCDD utilizadas nos ensaios foi baseada em ensaios prévios *in vitro* com mitocôndrias de testículo, correspondendo à mínima concentração da droga que induziu uma alteração no máximo potencial eléctrico gerado por estas mitocôndrias. O DDE foi aplicado sobre as mitocôndrias isoladas (0,8 mg de proteína/ml) na concentração de 126  $\mu\text{M}$ , ao passo que, o TCDD foi usado a uma concentração de 0,828  $\mu\text{M}$ . A Antimicina A foi utilizada numa concentração inferior à normalmente usada para inibir completamente o complexo III (0,01  $\mu\text{g/ml}$  de Antimicina A) (Ferreira *et al.*, 2003; Tahara *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2000), determinada em ensaios *in vitro* de mitocôndrias isoladas de fígado, e foi utilizada como controlo de sensibilidade em relação às mitocôndrias isoladas de testículo. Pretendia-se assim, ver o efeito de uma ligeira inibição ao nível do complexo III, sem ocorrer o bloqueio completo da cadeia respiratória.

## 2.5. Isolamento de Mitocôndrias Testiculares

A suspensão de mitocôndrias testiculares foi preparada por centrifugação diferencial com base na metodologia descrita por Amaral *et al.* (2009). Os animais foram sacrificados por deslocação cervical seguida de decapitação e os testículos foram dissecados imediatamente e mantidos sobre o gelo. Removeu-se cuidadosamente o epidídimo e o excesso de gordura que envolve esta estrutura. Após a pesagem dos testículos e respectivos epidídimos, os testículos foram descapsulados e fragmentados com uma tesoura numa solução de isolamento contendo 250 mM de sacarose, 0,2 mM de EGTA, 0,1 mM de EDTA, 5 mM de HEPES (pH 7,4; acertado com KOH). Após diversas lavagens com este meio para remover a maioria do sangue, o tecido testicular foi ressuspenso em meio de isolamento contendo 0,1% BSA (sem ácidos gordos) e homogenizado cuidadosamente com um homogenizador de vidro tipo “Potter-Elvehjem” com um pistão de teflon estreitamente ajustado, a 80 rotações por minuto. O homogeneizado foi centrifugado a 750 x g durante 10 minutos a 4°C (Centrífuga Sorvall RC6, rotor SS 34), sendo o sedimento, contendo núcleos e detritos celulares, descartado. O sobrenadante foi centrifugado a 12000 x g durante 10 minutos. O sedimento (contendo as mitocôndrias) foi ressuspenso cuidadosamente com um pincel em meio de lavagem. O meio de lavagem é idêntico ao meio de isolamento mas não possui EDTA, EGTA e BSA. Este procedimento foi repetido mais duas vezes para obter uma população mais pura de mitocôndrias. O conteúdo em proteína mitocondrial foi determinado pelo método do Biureto usando concentrações conhecidas de BSA a 0,4% como padrão. A absorvância das amostras e do padrão foi determinada usando um espectrofotómetro (Bausch & Lomb, Spectronic 21), a 540 nm. As suspensões de mitocôndrias de testículo foram mantidas em gelo durante a determinação dos parâmetros bioenergéticos.

## 2.6. Isolamento de Mitocôndrias de Fígado

A suspensão de mitocôndrias de fígado foi preparada com base na metodologia descrita por Moreno *et al.* (2007). Logo após o sacrifício dos animais, o fígado foi imediatamente colocado em meio de isolamento contendo 300 mM de Sacarose, 10 mM de HEPES, 1m M de EGTA e 0,1% BSA sem ácidos gordos (pH 7,4; acertado com KOH). Após a pesagem do fígado este foi fragmentado em meio com o auxílio de uma tesoura e foram efectuadas diversas lavagens para remover a maioria do sangue. O

tecido foi homogenizado com um homogenizador de vidro tipo “Potter-Elvehjem” com um pistão de teflon, a 1500 rotações por minuto. O homogeneizado foi centrifugado a 750 x g durante 10 minutos a 4°C (Centrífuga Sorvall RC6, rotor SS 34), a película de gordura superficial foi aspirada e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Este foi depois centrifugado a 12000 x g durante 10 minutos. O sedimento (fracção mitocondrial) foi ressuspenso cuidadosamente com um pincel em meio de lavagem. O meio de lavagem é idêntico ao meio de isolamento mas não possui EGTA e BSA. Seguidamente centrifugou-se e ressuspenso-se mais duas vezes em meio de lavagem à semelhança do que se fez para o testículo. O conteúdo em proteína mitocondrial foi também determinado pelo método do Biureto e as suspensões de mitocôndrias de fígado foram mantidas em gelo durante a determinação dos parâmetros bioenergéticos.

### **2.7 Avaliação do Rendimento do Isolamento Mitocondrial pelo Método da Citrato Sintase**

Para assegurar que a interpretação dos resultados não fosse distorcida devido a um conteúdo mitocondrial diferente entre as amostras (o teste do Biureto apenas permite avaliar a amostra em termos de proteína e não concretamente em mitocôndrias), determinou-se a actividade da citrato sintase, de acordo com Coore *et al.* (1971). Os sedimentos de mitocôndrias de testículo e de fígado conservadas a -80°C foram descongeladas e incubadas (50 µg) com 1 ml de meio contendo 100 mM de Tris, 200 µM de Acetil-CoA e 200 µM de ácido 5,5V-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB). A absorvância da suspensão foi continuamente medida a 412 nm, com agitação e a 30°C usando um espectrofotómetro (Jasco V-560 UV/VIS). Após a definição de uma linha basal foi adicionado 100 µM de oxaloacetato. Após 100 segundos, foi adicionado 20 µl de Triton-X100 a 10% e medida a actividade total da citrato sintase. Neste protocolo é avaliada a formação de um produto colorido resultante da condensação do DTNB e da coenzima A. A absorvância das amostras foi determinada recorrendo ao software Spectra Manager.

### **2.8. Potencial Eléctrico Transmembranar Mitocondrial**

O potencial eléctrico transmembranar mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) foi estimado com base na actividade do catião lipídico tetrafenilfosfónio (TPP<sup>+</sup>) (adquirido à Merk, Darmstadt, Alemanha), com recurso a um eléctrodo de TPP<sup>+</sup> associado a um eléctrodo de

referência saturado em Ag/AgCl (Kamo *et al.*, 1979). Não se fez a correcção para a ligação passiva do TPP<sup>+</sup> à membrana mitocondrial, uma vez que neste estudo não é essencial determinar os valores absolutos de  $\Delta\Psi$ , mas sim identificar alterações relativas.

Para o cálculo do  $\Delta\Psi$ , assumiu-se o volume da matriz mitocondrial como 1,1  $\mu\text{l}/\text{mg}$  de proteína. O meio de reacção para mitocôndrias de testículo continha 65 mM de KCl, 125 mM de sacarose, 10 mM de Tris, 20  $\mu\text{M}$  de EGTA, 2,5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4; acertado com KOH), suplementado com BSA (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). O meio de reacção de mitocôndrias de fígado continha 130 mM de Sacarose, 50 mM de KCl, 5 mM de Hepes, 100  $\mu\text{M}$  de EGTA, 5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,3; acertado com KOH). As reacções foram realizadas a 27°C com ambos os eléctrodos colocados na câmara, em 1 ml de meio de reacção suplementado com 2  $\mu\text{M}$  de TPP<sup>+</sup>, 5 mM de succinato (substrato para o Complexo II) e 2  $\mu\text{M}$  rotenona (inibidor do Complexo I), com agitação constante.

No estudo *in vivo* a reacção foi iniciada com 0,8 mg de mitocôndrias (**Fig. 10, A1**). Apenas se procedeu à avaliação dos parâmetros bioenergéticos estudando o complexo II, visto que este complexo se mantém estável durante mais tempo e devido ao baixo rendimento do isolamento de mitocôndrias de testículo. No estudo *in vitro* com os compostos DDE e TCDD, a reacção foi iniciada com a adição das mitocôndrias. Uma vez que após a adição de Antimicina A, se observou que o potencial transmembranar mitocondrial demorava muito tempo a estabilizar, optou-se por realizar uma pré-incubação com este composto antes da energização das mitocôndrias com succinato. Assim, as mitocôndrias foram colocadas no meio de reacção na presença de rotenona e de Antimicina A, sendo energizadas com succinato após a estabilização do potencial (**Fig. 10, B1**).

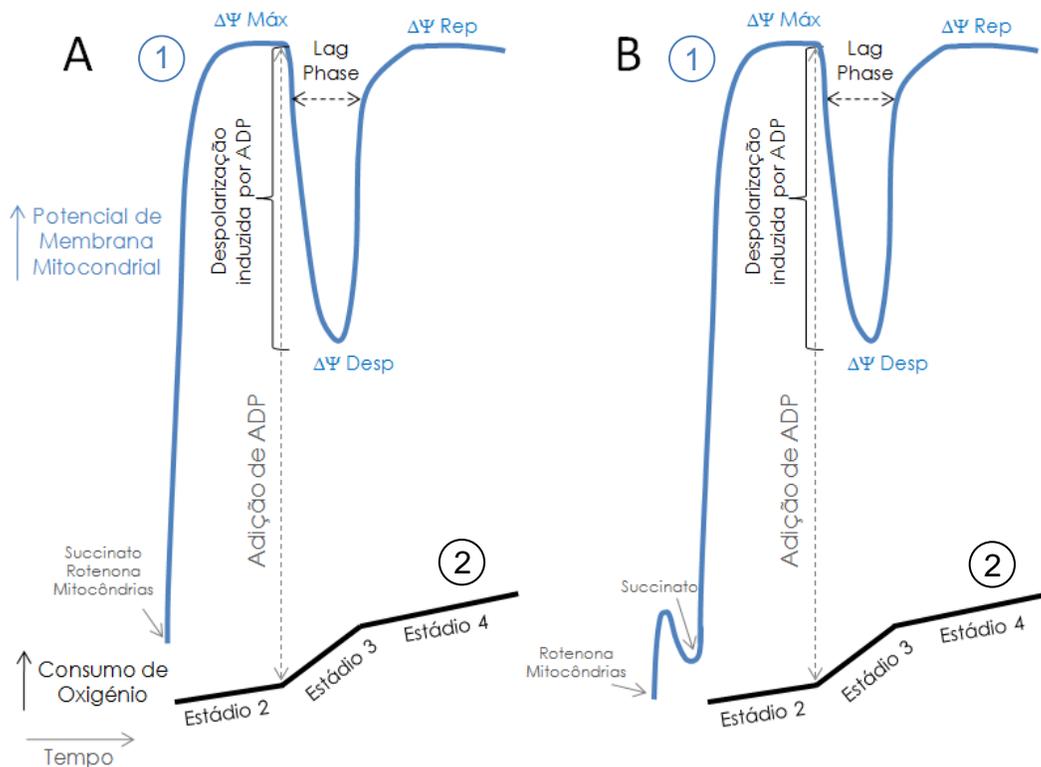
Os parâmetros bioenergéticos determinados foram: o potencial máximo, o potencial de despolarização, o potencial de repolarização e a despolarização induzida por ADP para cada um dos ensaios. Também se determinou a lag-phase de cada ensaio, ou seja, o tempo necessário para que o potencial eléctrico mitocondrial retorne ao estado estacionário inicial, correspondendo à fase de fosforilação do ADP (**Fig. 10, A1 e B1**).

Sempre que necessário, lavou-se a membrana do eléctrodo e a câmara de reacção com uma suspensão de proteína. Isto permite remover resíduos dos compostos

mantendo o tempo de resposta e a sensibilidade do eléctrodo, e evita também a contaminação dos ensaios posteriores com os compostos usados anteriormente.

## 2.9. Consumo de Oxigénio Mitocôndrial

O consumo de oxigénio e o potencial eléctrico transmembranar mitocondrial foram registados simultaneamente, como representado na **Figura 10**. O consumo de oxigénio das mitocôndrias de testículo e de fígado foi monitorizado polarograficamente com um eléctrodo de oxigénio tipo Clark (Yellow Springs Instruments, OH) (Estabrook, 1967) conectado a registador (Kipp & Zonen, BD) numa câmara aberta com agitação magnética, a 27°C.



**Figura 10** – Registos representativos dos diferentes ensaios realizados. **A** – Ensaio controlo normal (iniciado com proteína); **B** – Ensaio controlo pré-incubação (iniciado com succinato); **1** – Registo representativo das alterações do potencial eléctrico mitocondrial medidas com o eléctrodo de TPP<sup>+</sup>; **2** – Registos representativos das alterações no consumo de oxigénio mitocondrial usando um eléctrodo de oxigénio

O estágio respiratório 2 foi monitorizado durante alguns minutos antes da adição de 25 μM de ADP às mitocôndrias de testículo e 100 μM de ADP às de fígado, induzindo o estágio respiratório 3. Esta baixa concentração usada nas mitocôndrias de

testículo foi escolhida com o objectivo de evitar a saturação da maquinaria fosforilativa mitocondrial, para que uma situação fisiológica possa ser mimetizada (de Martino *et al.*, 1979). O estágio respiratório 4 corresponde ao estado estacionário do consumo de oxigénio atingido após a fosforilação de ADP. O índice de controlo respiratório (ICR) foi determinado como a razão entre a respiração mitocondrial no estágio 3 (consumo de oxigénio na presença de substrato e ADP) e estágio 4. A razão ADP/O, um indicador da eficiência do sistema fosforilativo, representa o número de moléculas de ADP fosforiladas por átomo de oxigénio consumido, sendo expressa pela razão entre a quantidade de ADP adicionada (nmol) e o consumo de oxigénio durante o estágio 3 (natomsO) (Chance & Williams, 1956).

## **2.10. Análise Histológica - Coloração com PAS/H**

Após observação macroscópica os órgãos foram fixados em reagente de Bouin durante 24 horas e processados para incorporação em parafina, após diversas lavagens com etanol a 70%. Foram realizadas secções de tecido de 5 µm, usando um micrótomo, que foram colocadas em lâminas revestidas com poli-L-lisina. Após dois dias sobre uma placa de aquecimento, para permitir uma melhor aderência ao vidro, as secções foram desparafinadas em xilol e rehidratadas com concentrações decrescentes de etanol (100%, 99%, 95%, 70%). Todas as lâminas foram coradas com Ácido Periódico/Reagente de Schiff e Hematoxilina (PAS/H). A aplicação de ácido periódico e reagente de Schiff, permite revelar a presença de hidratos de carbono no tecido que coram de vermelho, enquanto que a hematoxilina, corante basófilo que cora substâncias ácidas de azul, em particular o ADN, permite identificar os núcleos das células. As amostras foram desidratadas numa graduação crescente de etanol (70%, 95%, 99%, 100%) e xilol. As lâminas foram depois montadas com meio de montagem permanente Eukitt e procedeu-se à análise microscópica dos órgãos (Microscópio Leica DM 4000B; câmara Leica DFC480).

## **2.11. Quantificação de Nucleótidos de Adenina**

A quantificação de nucleótidos de adenina (ATP, ADP e AMP) presentes no meio de reacção no final do ensaio, teve como objectivo determinar se os compostos analisados (DDE e TCDD) interferem com a conversão destes nucleótidos. Assim, no final de cada ensaio recolheu-se 500 µl de meio de reacção ao qual se adicionou 1 µl de

Oligomicina (2 mg/ml em etanol) para inibir a actividade da ATPase, evitando alterações nos níveis dos nucleótidos.

Os nucleótidos ATP, ADP e AMP no meio de reacção de cada ensaio foram extraídos adicionando 0,6 M de ácido perclórico suplementado com 25 mM de EDTA-Na ao meio recolhido. Seguidamente, procedeu-se à centrifugação a 16 x g, durante 2,5 minutos, a 4°C (centrífuga eppendorf, 5415R), para precipitar as mitocôndrias rebentadas e algumas proteínas. Os sobrenadantes foram neutralizados com KOH 3 M e Tris 1,5 M e centrifugados novamente. Após a recolha do sobrenadante resultante, as amostras foram mantidas a -80°C até ao momento da análise.

O conteúdo em nucleótidos de adenina das amostras foi determinado através de HPLC (cromatografia líquida de fase reversa de alta eficiência) de acordo com o protocolo previamente descrito por Stocchi *et al.* (1985), utilizando um aparelho Beckman-System Gold. O comprimento de onda de detecção usado foi de 254 nm, e a amostra correu numa coluna Lichrosphere 100 RP-18 da Merk. Foi realizada uma eluição isocrática com tampão fosfato 0,1 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , (pH 6,5) e 0,1% metanol com uma velocidade de fluxo de 1 ml/minuto. A solução de eluição foi filtrada e desgaseificada com recurso a vácuo, evitando possíveis obstruções da coluna ou interferências com a detecção. A identidade do pico foi determinada comparando com o tempo de retenção dos padrões. Procedeu-se ao cálculo da concentração dos nucleótidos por miligrama de proteína, da razão ATP/ADP e da carga energética determinada através da fórmula:  $\text{ATP}+0,5\text{ADP}/(\text{ATP}+\text{ADP}+\text{AMP})$ .

## 2.12. Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada usando o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences Program), versão 16.00, software para o Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Antes dos testes estatísticos foi realizada a busca de outliers e sua eliminação quando justificado. Verificou-se se todas as variáveis apresentavam uma distribuição normal utilizando o teste de Shapiro-Wilk, mais apropriado a análise de populações com um n baixo. Nas variáveis com distribuição normal usaram-se testes t emparelhados para determinar diferenças entre animais injectados e controlo. Nos casos em que os dados não apresentavam uma distribuição normal foi usado o teste não paramétrico correspondente (teste de Mann-Whitney-Wilcoxon para amostras emparelhadas). Os resultados foram apresentados no formato

Média  $\pm$  Erro padrão. As diferenças foram consideradas significativas quando associadas a um valor de  $p \leq 0,05$ .

## Capítulo 3

Resultados

### 3. Resultados

#### 3.1. Caracterização dos Animais

Observou-se uma redução ligeira de peso nos animais (controlos e tratados), após 24 horas da injeção mas não foi possível discriminar se este efeito se deveu ao stress da injeção, ao veículo (DMSO) ou a uma variação entre balanças (**Tabela I**).

**Tabela I** – Peso corporal e peso dos órgãos reprodutores nos diferentes grupos de animais

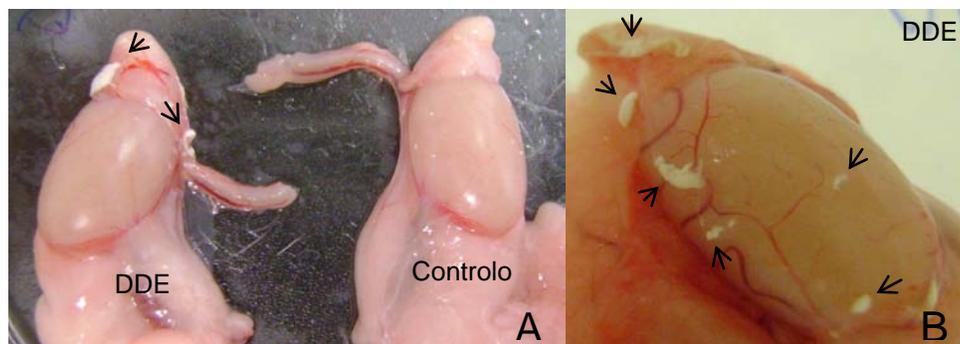
	Controlo DDE	DDE	Controlo TCDD	TCDD
Peso corporal injeção (g)	279,60 ± 7,84	278,00 ± 6,67	322,00 ± 9,402	293,00 ± 4,669
Peso corporal sacrifício (g)	265,00 ± 10,56 <sup>*a</sup>	259,00 ± 6,73 <sup>*a</sup>	316,60 ± 7,724	278,20 ± 6,445 <sup>*a,b</sup>
Peso Testículos (g) ♦	2,83 ± 0,19	2,90 ± 0,09	3,29 ± 0,14	2,93 ± 0,13
Peso Epidídimos (g) •	0,43 ± 0,00	0,46 ± 0,04	0,48 ± 0,02	0,51 ± 0,01

Dados representados no formato Média ± Erro padrão. Teste t para amostras emparelhadas. \*p≤0,05 em comparação com o grupo controlo respectivo para cada grupo de animais.

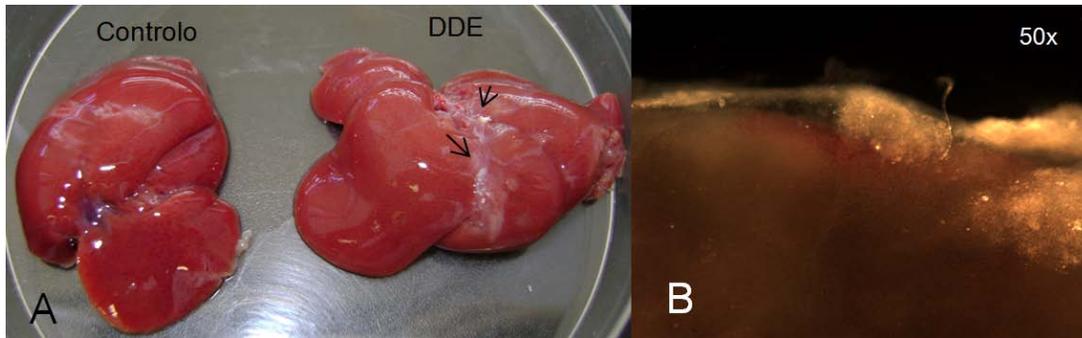
a - em relação ao peso do animal no dia da injeção; b - em relação ao peso do animal controlo

♦ Média da soma do peso dos dois testículo; • Média do peso de cada epidídimo

Não foram observadas diferenças significativas no peso nos órgãos reprodutores entre os animais tratados com DDE e TCDD e respectivos grupos controlo. Contudo, é importante referir alterações macroscópicas observadas à superfície dos órgãos reprodutores e de outros órgãos (como o fígado), de animais injectados com DDE (**Fig. 11 e 12**). Foram observados aglomerados de cor branca e tamanho variável, localizados na cápsula do testículo, recobrimo o epidídimo e na gordura envolvente dos órgãos reprodutores, possuindo relevo e textura firme (**Fig. 11**). Nos animais controlo injectados apenas com DMSO não se observaram quaisquer alterações.



**Figura 11** – Fotografias dos órgãos reprodutores de animais injectados com DDE. **A** – Testículo de um animal injectado com DDE e de animal injectado apenas com o veículo. De destacar a ausência de aglomerados brancos no testículo do animal controlo; **B** – Detalhe dos aglomerados brancos (setas) sobre a superfície do testículo de outro animal injectado com DDE.



**Figura 12** – Fotografias com o aspecto de fígados de animais injectados com DDE. **A** – Fígado de um animal injectado apenas com DMSO (veículo) em comparação com o de um animal injectado com DDE. De destacar a ausência de aglomerados brancos (setas) no fígado do animal controlo; **B** – Observação ao microscópio óptico dos aglomerados de cor branca no rebordo do fígado, na superfície da cápsula.

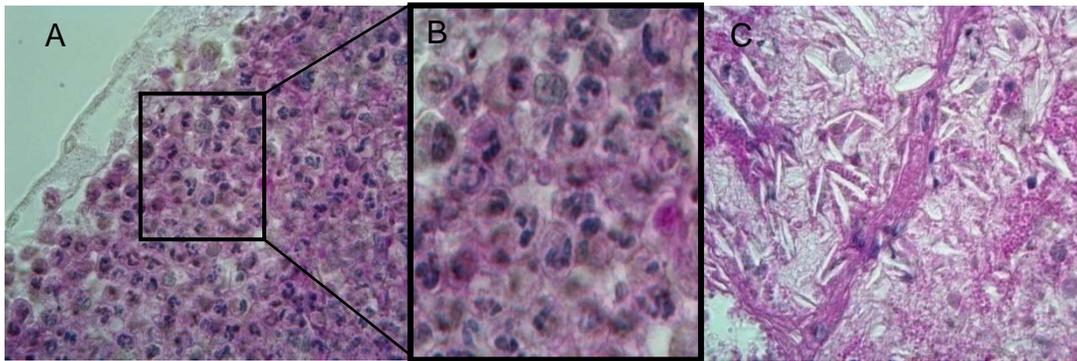
No fígado dos animais injectados com DDE também foi possível observar a presença aglomerados de cor branca na zona de junção entre os diferentes lóbulos e no rebordo do órgão (**Fig. 12**). De salientar a ausência dos mesmos nos animais controlo injectados apenas com o veículo.

### 3.2. Análise Histológica

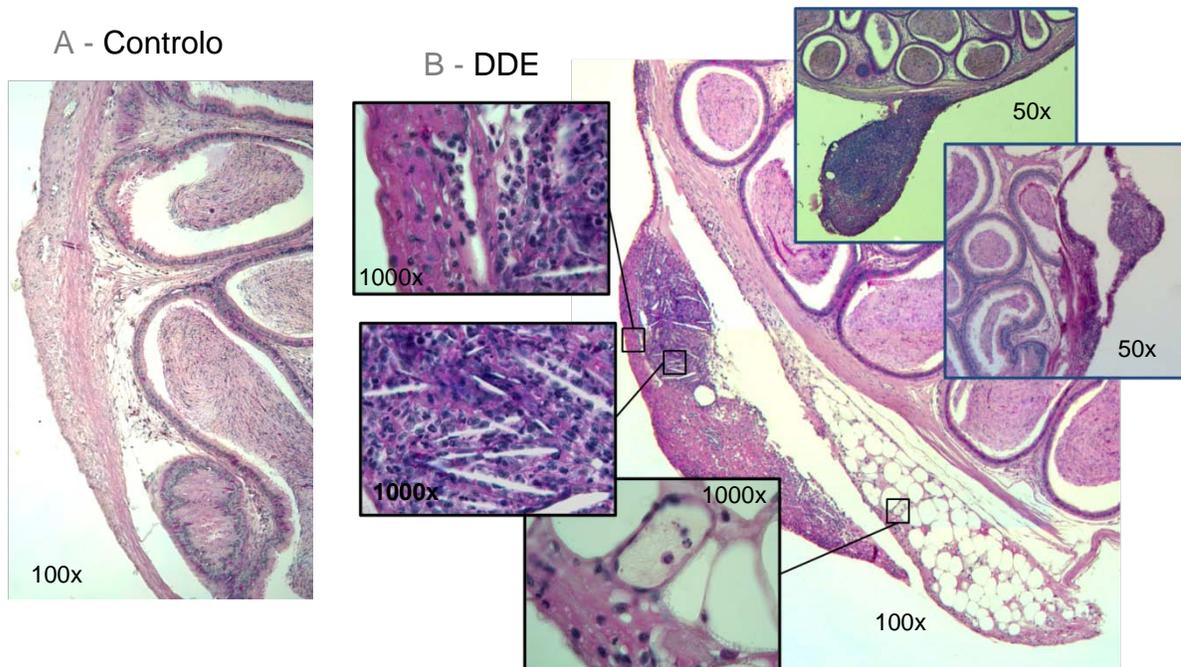
#### 3.2.1. Órgãos Reprodutores

Após observação macroscópica dos aglomerados de cor branca na cápsula do fígado e epidídimo de animais injectados com DDE, procedeu-se à análise histológica desses tecidos e respectivos tecidos controlo. Após a coloração com PAS/H foi possível verificar que estes agregados eram constituídos por aglomerados de células inflamatórias (essencialmente neutrófilos e macrófagos) (**Fig. 13 A e B**). Na zona da inflamação foi possível observar a existência de áreas não coradas de dimensões variáveis, correspondendo a locais de deposição de cristais de DDE que foram dissolvidos durante o processamento para análise histológica (**Fig. 13 C**).

Na superfície dos epidídimos dos animais injectados com DDE também foi possível observar aglomerados de cor branca. A análise microscópica das áreas revelou o depósito de cristais e elevado número de células inflamatórias. Por outro lado, não foi possível observar zonas de inflamação nos epidídimos dos animais injectados apenas com DMSO (**Fig. 14**).



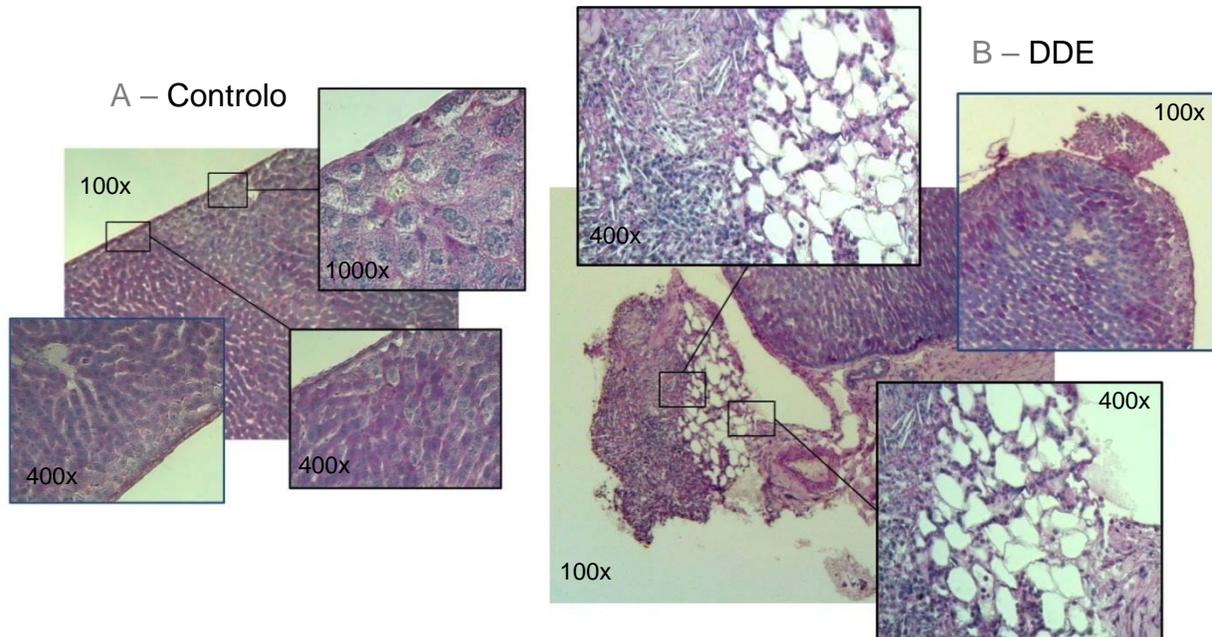
**Figura 13** – Cortes histológicos de um dos aglomerados de cor branca presentes na superfície do testículo. **A** – Zona periférica do aglomerado onde é possível observar um elevado número de neutrófilos e macrófagos (**B** – maior ampliação) **C** – Áreas vazias (cor branca) resultantes da dissolução dos cristais de DDE durante o processamento histológico. Ampliação 1000x.



**Figura 14** – Cortes histológicos da cauda de epidídimos de animais controlo (**A**) e tratados com DDE (**B**). Foi possível observar que os aglomerados de cor branca correspondiam a uma reacção inflamatória localizada superficialmente, constituída essencialmente por neutrófilos e macrófagos e cristais de DDE. Não se observaram células do sistema imunitário ou cristais no lúmen e no epitélio do epidídimo.

### 3.2.2. Fígado

Nos cortes histológicos de fígado foi possível observar no animal injectado com DDE a existência de zonas de inflamação, ao passo que, no animal controlo estas estavam ausentes. As áreas de inflamação possuíam um aspecto idêntico às observadas nos órgãos reprodutores, com inúmeras células do sistema imunitário e cristais de DDE (**Fig. 15**).



**Figura 15** – Cortes histológicos de fígado de um animal controlo (**A**) e de um animal tratado com DDE (**B**). Como no testículo e epidídimo, os aglomerados de cor branca correspondiam a uma reacção inflamatória localizada superficialmente constituída essencialmente por neutrófilos, macrófagos e cristais de DDE. As zonas de inflamação foram visualizadas no rebordo do órgão e na zona de junção entre os diferentes lóbulos do fígado nos animais injectados com o composto. Não se observaram alterações microscópicas no tecido hepático 24 horas após injeção de DDE.

### 3.3 Avaliação do Rendimento do Processo de Isolamento Mitocondrial

Não foram observadas diferenças estatísticas na actividade total da citrato sintase das amostras, o que significa que o conteúdo mitocondrial por miligrama de proteína era idêntico entre os ratos injectados e respectivos controlos, e entre os animais usados no estudo *in vitro*. Isto permite assegurar que as diferenças observadas na bioenergética mitocondrial não se devem a um rendimento de isolamento diferente entre as amostras.

### 3.4. Respiração e Potencial Transmembranar Mitocondriais

#### 3.4.1. Estudo *in vivo*

Não foram observadas diferenças estatísticas nos parâmetros bioenergéticos dos animais tratados com DDE em relação aos animais controlo. Contudo existe uma tendência para que as mitocôndrias testiculares dos animais injectados com DDE tenham um potencial máximo e potencial de despolarização mais elevados ( $p=0,084$  e  $p=0,085$ ; respectivamente) do que os animais controlo (**Tabela II**). Também não se observaram diferenças significativas na função respiratória e nos parâmetros do potencial eléctrico transmembranar no grupo TCDD relação ao grupo controlo para este composto (**Tabela II**).

**Tabela II** – Função respiratória e parâmetros de potencial eléctrico transmembranar nos ratos controlo e injectados com DDE e TCDD

	Controlo DDE	DDE	Controlo TCDD	TCDD
$\Delta\Psi$ Máx (-mV)	212,52 ± 2,30	215,62 ± 1,76	216,87 ± 0,65	217,01 ± 0,96
$\Delta\Psi$ Desp (-mV)	186,17 ± 3,46	188,97 ± 3,28	197,65 ± 1,15	197,49 ± 1,22
$\Delta\Psi$ Rep (-mV)	26,33 ± 1,66	26,47 ± 1,81	18,20 ± 1,72	20,39 ± 0,90
Desp induzida ADP (-mV)	209,26 ± 2,73	211,79 ± 2,27	213,41 ± 0,65	214,07 ± 1,48
Lag-phase (s)	37,10 ± 7,98	33,90 ± 3,78	23,33 ± 4,21	23,83 ± 3,68
Estádio 3 (natmsO/min/mgprot)	42,03 ± 11,95	51,65 ± 8,24	40,06 ± 2,44	50,13 ± 5,26
Estádio 4 (natmsO/min/mgprot)	24,65 ± 3,36	26,63 ± 4,01	31,97 ± 4,86	30,90 ± 4,24
ICR	1,64 ± 0,25	1,93 ± 0,07	1,29 ± 0,14	1,75 ± 0,47
ADP/O	2,19 ± 0,25	2,50 ± 0,39	1,53 ± 0,18	1,75 ± 0,35

Dados representados no formato Média ± Erro padrão. Testes t para amostras emparelhadas. \* $p \leq 0,05$

#### 3.4.2. Estudo *in vitro*

##### 3.4.2.1. Testículo

Para confirmar as tendências observadas no estudo *in vivo* e visualizar melhor o efeito do DDE e TCDD sobre os parâmetros bioenergéticos, efectuaram-se ensaios mitocondriais *in vitro* aplicando estes compostos directamente sobre as mitocôndrias. Além disso, testou-se também uma substância com efeitos já descritos em mitocôndrias de fígado e testículo, Antimicina A, em concentrações baixas de forma a provocar uma inibição parcial do complexo III (mínima concentração com efeito no potencial de mitocôndrias de fígado).

Nos ensaios *in vitro* com mitocôndrias de testículo tratadas com DDE (**Tabela III**) o potencial máximo foi significativamente mais elevado do que nos ensaios controlo ( $p=0,026$ ). Também se observaram diferenças significativas no potencial de despolarização e na despolarização induzida por ADP ( $p=0,014$  e  $p=0,029$ ; respectivamente). O DDE aumentou significativamente o tempo que as mitocôndrias de testículo demoraram a repolarizar após a adição de ADP, que é visível pelo aumento da lag-phase nas mitocôndrias tratadas ( $p=0,001$ ). Além disso, as mitocôndrias tratadas com DDE apresentaram velocidades de estágio 3 e 4 menores que as mitocôndrias dos ensaios controlo ( $p=0,011$  para o estágio 3 e  $p=0,0644$  para o estágio 4, representando esta última apenas uma tendência).

**Tabela III** – Função respiratória e parâmetros de potencial eléctrico transmembranar de mitocôndrias de testículo tratadas *in vitro* com DDE/TCDD e ensaios controlo

	Controlo	DDE	TCDD
$\Delta\Psi$ Máx (-mV)	213,28 ± 0,84	216,98 ± 0,78*	212,72 ± 1,93
$\Delta\Psi$ Desp (-mV)	194,25 ± 1,49	200,68 ± 1,54*	200,72 ± 1,18*
$\Delta\Psi$ Rep (-mV)	211,32 ± 1,22	210,54 ± 1,18	210,53 ± 1,70
Desp induzida ADP (-mV)	19,34 ± 0,72	16,30 ± 1,24*	12,06 ± 1,70*
Lag-phase (s)	30,26 ± 1,54	41,06 ± 1,58*	68,50 ± 13,47*
Estádio 3 (natmsO/min/mgprot)	60,57 ± 5,21	49,13 ± 2,50*	49,82 ± 5,31*
Estádio 4 (natmsO/min/mgprot)	31,84 ± 2,18	29,00 ± 1,87	32,14 ± 1,85
Estádio 2 (natmsO/min/mgprot)	19,75 ± 2,95	20,03 ± 2,88	27,09 ± 1,27
Estádio 2 + Composto (natmsO/min/mgprot)		20,36 ± 2,63	27,09 ± 1,27
ICR	1,93 ± 0,11	1,73 ± 0,11	1,54 ± 0,13
ADP/O	1,40 ± 0,08	1,21 ± 0,07	1,11 ± 0,12

Dados representados no formato Média ± Erro padrão. Testes t para amostras emparelhadas. \* $p \leq 0,05$

As mitocôndrias tratadas *in vitro* com TCDD (**Tabela III**) apresentaram um potencial de despolarização significativamente maior e uma despolarização induzida por ADP significativamente menor que a observada nos ensaios controlo ( $p=0,027$  e  $p=0,021$ ; respectivamente). Além disso, observou-se um aumento significativo da lag-phase nas mitocôndrias tratadas com o composto ( $p=0,05$ ). Quanto à função respiratória, observou-se que as mitocôndrias expostas a TCDD apresentavam velocidades de estágio 3 significativamente menores ( $p=0,020$ ) e uma tendência para uma diminuição do ICR ( $p=0,057$ ).

Os ensaios com Antimicina A foram comparados com ensaios controlo pré-incubação em que se iniciou a reacção com substrato. Isto porque foram observadas diferenças significativas em alguns parâmetros bioenergéticos de ensaios controlo normais iniciados com proteína em comparação com ensaios controlo pré-incubação iniciados com o substrato (dados não mostrados). Após a pré-incubação das mitocôndrias de testículo com Antimicina A, observou-se diminuição significativa do potencial de despolarização e do potencial de repolarização ( $p=0,036$  e  $p=0,009$ ; respectivamente). Observou-se ainda uma tendência para uma menor velocidade do estágio 3 nas mitocôndrias expostas a este composto ( $p=0,063$ ) (**Tabela IV**).

**Tabela IV** – Função respiratória e parâmetros de potencial eléctrico transmembranar de mitocôndrias de testículo tratadas *in vitro* com Antimicina A e ensaios controlo

	Controlo pré-inc	Antimicina A
$\Delta\Psi$ Máx (-mV)	215,50 $\pm$ 1,16	209,94 $\pm$ 1,89
$\Delta\Psi$ Desp (-mV)	202,72 $\pm$ 0,93	196,78 $\pm$ 1,70*
$\Delta\Psi$ Rep (-mV)	214,02 $\pm$ 1,14	207,42 $\pm$ 1,89*
Desp induzida ADP (-mV)	12,88 $\pm$ 0,63	12,94 $\pm$ 0,53
Lag-phase (s)	48,75 $\pm$ 3,93	47,44 $\pm$ 4,18
Estádio 3 (natmsO/min/mgprot)	50,73 $\pm$ 2,32	41,60 $\pm$ 2,89
Estádio 4 (natmsO/min/mgprot)	36,13 $\pm$ 1,73	29,33 $\pm$ 2,13
Estádio 2 (natmsO/min/mgprot)	22,48 $\pm$ 3,07	23,65 $\pm$ 1,41
ICR	1,42 $\pm$ 0,06	1,44 $\pm$ 0,05
ADP/O	1,12 $\pm$ 0,06	1,12 $\pm$ 0,05

Dados representados no formato Média  $\pm$  Erro padrão. Testes t para amostras emparelhadas.  
\* $p \leq 0,05$

### 3.4.2.2. Fígado

Verificou-se que com a adição de DDE (**Tabela V**), o potencial gerado pelas mitocôndrias de fígado diminui de forma acentuada, sendo este valor significativamente diferente do potencial máximo antes da adição do composto ( $p=0,003$ ) e do potencial máximo dos ensaios controlo ( $p=0,007$ ). Também se observou uma diminuição significativa do potencial de despolarização e do potencial de repolarização ( $p=0,003$  e  $p=0,012$ ; respectivamente). Em relação à função respiratória, observou-se que as mitocôndrias expostas a DDE apresentavam velocidades de estágio 3 e 4 significativamente menores ( $p=0,007$  e  $0,027$ ; respectivamente). Não se apresentam

valores para a lag-phase nos ensaios com DDE porque em muitos deles as mitocôndrias ou não repolarizavam ou apresentavam uma repolarização mínima, dificultando a determinação deste parâmetro.

Não se observaram diferenças significativas nos parâmetros bioenergéticos nas mitocôndrias de fígado tratadas *in vitro* com TCDD, em comparação com os ensaios controlo (**Tabela V**).

**Tabela V** – Função respiratória e parâmetros de potencial eléctrico transmembranar de mitocôndrias de fígado tratadas *in vitro* com DDE/TCDD e ensaios controlo

	Controlo	DDE	TCDD
$\Delta\Psi$ Máx (-mV)	217,79 ± 1,30	203,28 ± 4,92*	216,93 ± 2,59
$\Delta\Psi$ Desp (-mV)	192,70 ± 1,53	178,64 ± 4,51*	195,70 ± 1,19
$\Delta\Psi$ Rep (-mV)	217,74 ± 1,35	188,47 ± 9,52*	216,71 ± 1,68
Desp induzida ADP (-mV)	24,98 ± 1,01	27,45 ± 0,92	21,00 ± 2,07
Lag-phase (s)	65,25 ± 3,08	-----	69,38 ± 9,73
Estádio 3 (natmsO/min/mgprot)	94,94 ± 7,39	51,30 ± 7,63*	80,05 ± 11,96
Estádio 4 (natmsO/min/mgprot)	27,64 ± 1,38	22,63 ± 2,21*	26,55 ± 0,83
Estádio 2 (natmsO/min/mgprot)	25,08 ± 2,55	21,57 ± 3,71	15,31 ± 3,09
Estádio 2 + Composto (natmsO/min/mgprot)		16,42 ± 0,98	26,14 ± 0,54
ICR	3,50 ± 0,27	2,92 ± 0,40	3,02 ± 0,42
ADP/O	2,27 ± 0,18	2,60 ± 0,23	2,69 ± 0,23

Dados representados no formato Média ± Erro padrão. Testes t para amostras emparelhadas. \*p≤0,05

Os ensaios com Antimicina A também foram comparados com os ensaios controlo pré-incubação, à semelhança do que foi feito no testículo. A Antimicina A afecta diversos parâmetros bioenergéticos das mitocôndrias de fígado (**Tabela VI**). Observou-se que o potencial máximo e o potencial de despolarização das mitocôndrias expostas a Antimicina A foi significativamente mais baixo que nos controlos pré-incubação (p=0,001 e p=0,005), assim como o potencial de repolarização (p=0,001). O período de lag-phase foi significativamente maior (p=0,002) nas mitocôndrias tratadas com este composto. A Antimicina A diminui também a velocidade respiratória do estágio 3 e 4 (p=0,003 e p=0,05; respectivamente) e provoca ainda uma diminuição significativa do ICR (p=0,039), em comparação com os ensaios controlo pré-incubação.

**Tabela VI** – Função respiratória e parâmetros de potencial eléctrico transmembranar de mitocôndrias de fígado tratadas *in vitro* com Antimicina A e ensaios controlo

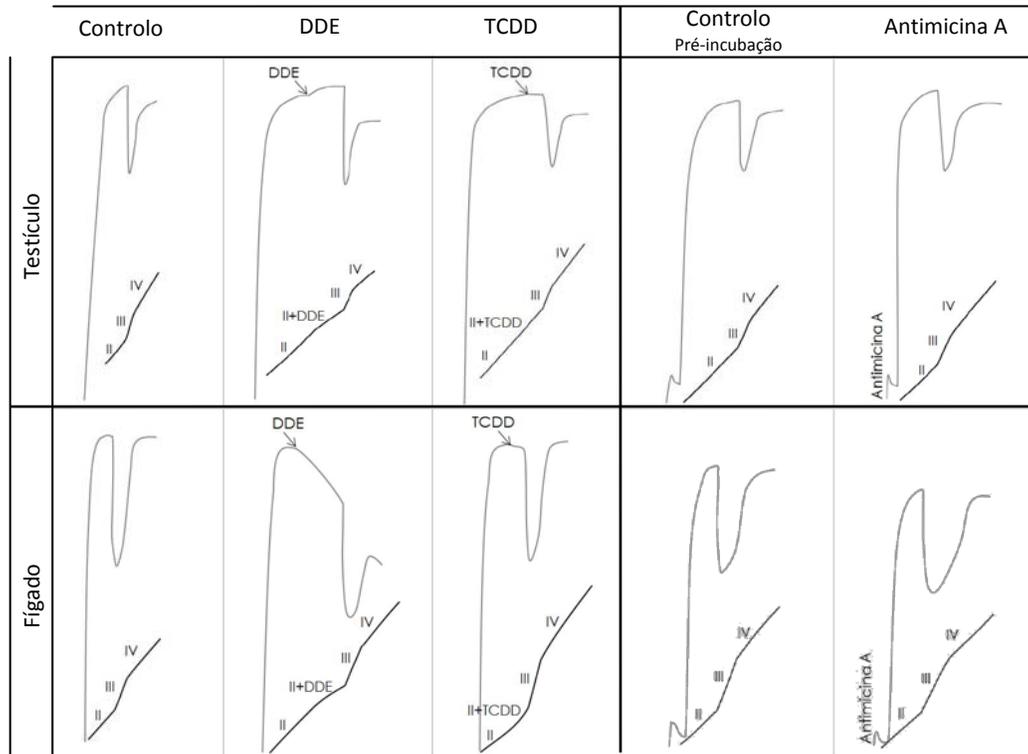
	Controlo pré-inc	Antimicina A
$\Delta\Psi$ Máx (-mV)	213,90 ± 1,15	209,36 ± 1,67*
$\Delta\Psi$ Desp (-mV)	194,05 ± 1,68	190,14 ± 2,20*
$\Delta\Psi$ Rep (-mV)	213,99 ± 0,88	208,08 ± 1,94*
Desp induzida ADP (-mV)	19,83 ± 1,05	19,22 ± 0,97
Lag-phase (s)	86,85 ± 6,49	126,15 ± 12,17*
Estádio 3 (natmsO/min/mgprot)	81,99 ± 11,60	57,36 ± 7,45*
Estádio 4 (natmsO/min/mgprot)	27,95 ± 2,57	21,09 ± 0,90*
Estádio 2 (natmsO/min/mgprot)	27,26 ± 2,03	21,94 ± 1,45
ICR	3,18 ± 0,39	2,73 ± 0,32*
ADP/O	2,18 ± 0,23	2,21 ± 0,34

Dados representados no formato Média ± Erro padrão. Testes t para amostras emparelhadas.  
\*p≤0,05

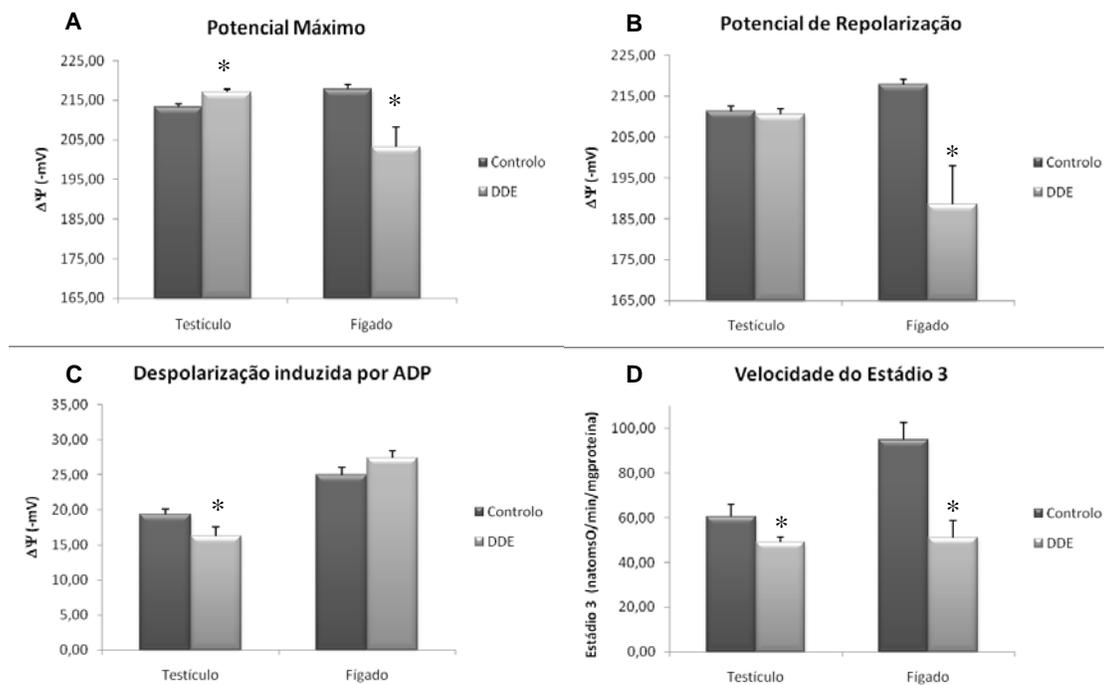
### 3.4.2.3. Comparação entre órgãos

As diferenças de comportamento do testículo e do fígado em relação aos compostos estudados estão esquematizadas na **Figura 16**. Esta tabela foi feita com base em registos das mitocôndrias dos dois órgãos do mesmo animal.

Após a adição da mesma dose de DDE a mitocôndrias de testículo e fígado, o efeito no potencial máximo é completamente oposto (**Fig. 17; Gráfico A**). Enquanto no testículo há um aumento significativo do potencial gerado pelas mitocôndrias; no fígado ocorre uma diminuição significativa do potencial. Por outro lado, o potencial de repolarização no fígado diminui significativamente com a adição de DDE, ao passo que no testículo o potencial de repolarização é estatisticamente igual ao dos ensaios controlo (**Fig. 17; Gráfico B**). Além disso, no testículo observou-se uma diminuição significativa da despolarização induzida por ADP após adição de DDE, mas no fígado não ocorre uma alteração deste parâmetro em relação aos ensaios controlo (**Fig. 17; Gráfico C**). Quanto à velocidade do estágio 3, o DDE provoca o mesmo padrão de alterações significativas nos dois órgãos, ocorrendo porém no fígado uma diminuição mais acentuada da velocidade (**Fig. 17; Gráfico D**). Em relação à velocidade do estágio 4, no fígado ocorre uma diminuição significativa, enquanto no testículo há apenas uma tendência para o decréscimo desta velocidade.

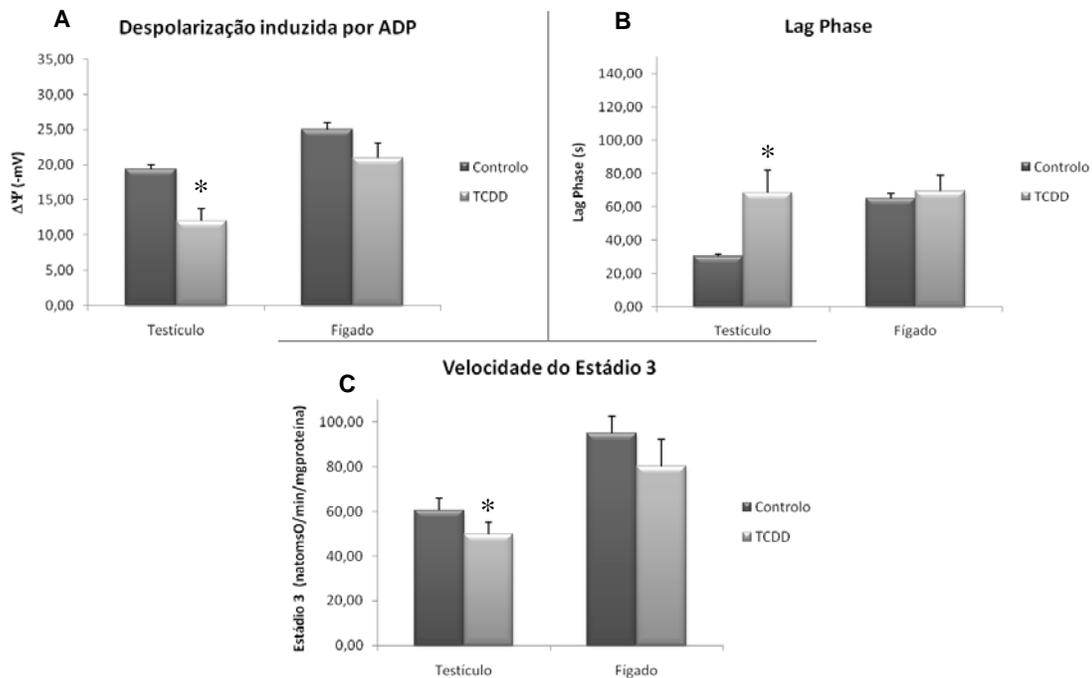


**Figura 16** – Figura resumo com os efeitos *in vitro* dos compostos DDE, TCDD e Antimicina A nas mitocôndrias de Testículo e Fígado.



**Figura 17** – Gráficos com a variação de parâmetros bioenergéticos, após a adição de DDE, no testículo e no fígado. **A** – Potencial Máximo; **B** – Potencial de repolarização; **C** – Despolarização induzida por ADP; **D** – Velocidade do estágio 3. Todas as colunas representam Média + Erro Padrão. Testes t para amostras emparelhadas. \* p<0,05.

A adição da mesma dose por miligrama de proteína de TCDD a mitocôndrias de testículo e de fígado, apenas provoca alterações significativas nos parâmetros bioenergéticos das mitocôndrias de testículo. Assim, o TCDD causa uma diminuição significativa da despolarização induzida por ADP e da velocidade do estágio 3 e um aumento significativo da lag-phase nas mitocôndrias de testículo (**Fig. 18; Gráfico A, B e C**). Há ainda uma tendência quase significativa para a diminuição do ICR neste órgão, enquanto que, as mitocôndrias de fígado tratadas com TCDD têm um ICR estatisticamente igual aos ensaios controlo.



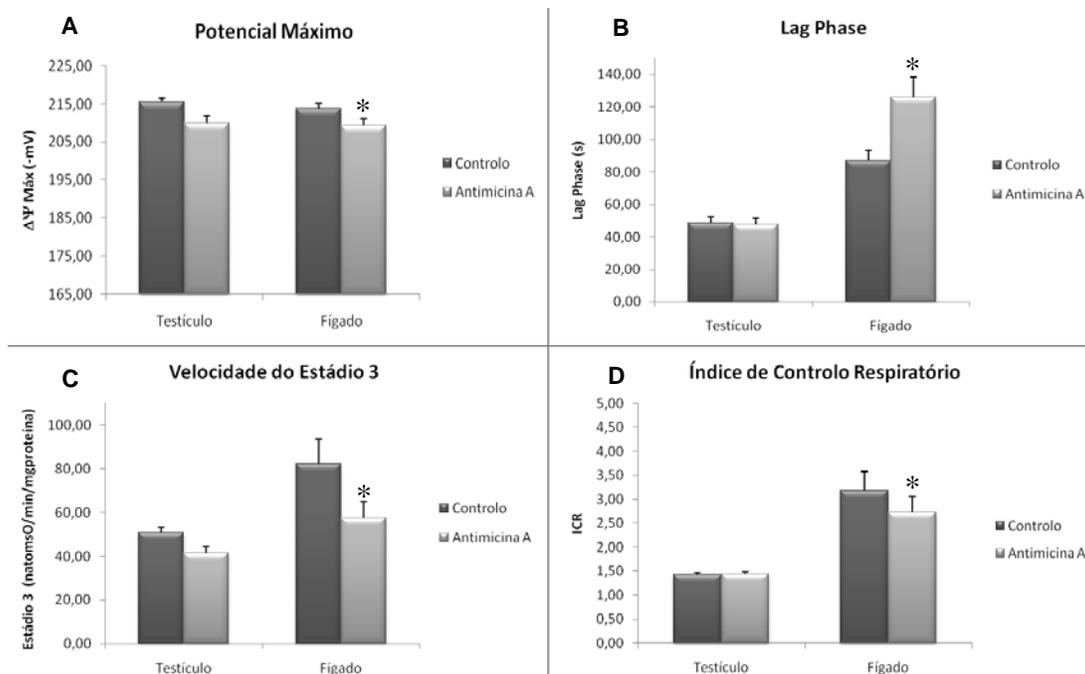
**Figura 18** – Gráficos com a variação de parâmetros bioenergéticos, após a adição de TCDD, no testículo e no fígado. **A** – Despolarização induzida por ADP; **B** – Lag-Phase; **C** – Velocidade do estágio 3.

Todas as colunas representam Média+Erro padrão. Testes t para amostras emparelhadas.

\* p<0,05.

Por outro lado, a mesma dose de Antimicina A, provoca mais alterações nos parâmetros bioenergéticos das mitocôndrias de fígado do que nas de testículo. Por exemplo, o potencial máximo é significativamente menor e a lag-phase significativamente maior nas mitocôndrias de fígado tratadas com Antimicina A; não havendo alterações destes parâmetros no testículo (**Fig. 19; Gráfico A e B**). Já o potencial de repolarização é significativamente menor em ambos os órgãos. A velocidade do estágio 3 diminui significativamente nas mitocôndrias de fígado tratadas

com Antimicina A, ao passo que apenas tende a ser menor nas mitocôndrias de testículo (**Fig.19; Gráfico C**). A velocidade do estágio 4 tende também a ser menor no fígado o que poderá justificar uma alteração significativa do ICR nas mitocôndrias de fígado tratadas com Antimicina A, algo que não se verifica no testículo (**Fig. 19; Gráfico D**).

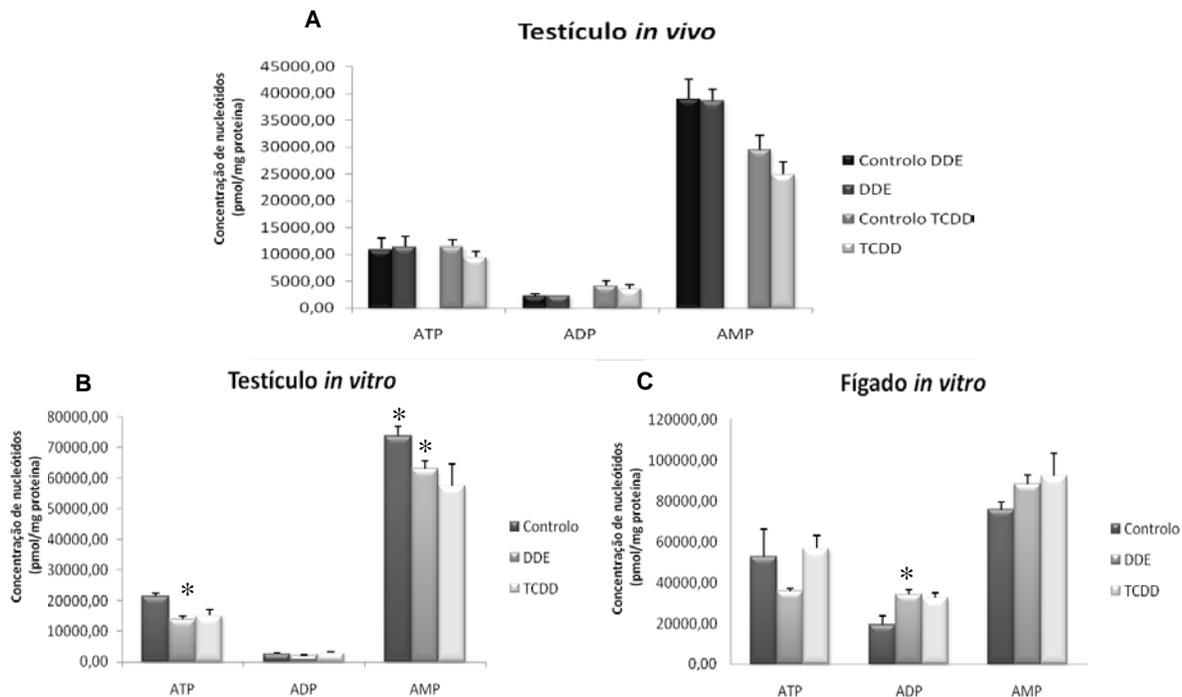


**Figura 19** – Gráficos com a variação de parâmetros bioenergéticos, após pré-incubação com Antimicina A, no testículo e no fígado. **A** – Potencial Máximo; **B** – Lag-Phase; **C** – Velocidade do estágio 3; **D** – Índice de Controlo Respiratório. Todas as colunas representam Média+Erro padrão. Testes t para amostras emparelhadas. \* p<0,05.

### 3.5. Quantificação de Nucleótidos de Adenina

Não foram observadas diferenças significativas no conteúdo dos diferentes nucleótidos entre ensaios com animais injectados com DDE ou TCDD e os respectivos grupos controlo. Contudo o padrão de variação de concentrações foi idêntico ao observado em ensaios *in vitro* com mitocôndrias de testículo. Nestes últimos observaram-se diferenças significativas na concentração de alguns nucleótidos, havendo uma diminuição na concentração de ATP nas mitocôndrias tratadas com DDE e uma diminuição dos níveis de AMP nas mitocôndrias expostas a DDE e TCDD, em relação aos ensaios controlo (**Fig. 20; Gráfico A e B**).

Por outro lado, os ensaios com mitocôndrias de fígado apresentam um padrão de variação das concentrações de ATP, ADP e AMP diferente do observado para as mitocôndrias de testículo quer nos ensaios *in vivo* quer nos ensaios *in vitro*. Embora a única diferença significativa observada seja um aumento da concentração de ADP para as mitocôndrias de fígado expostas a DDE, o padrão de variação da concentração de nucleótidos é claramente diferente e nalguns casos até oposto ao observado em testículo (**Fig. 20; Gráfico C**).



**Figura 20** – Gráficos com a variação na concentração dos nucleótidos ATP, ADP e AMP no fim dos ensaios realizados com mitocôndrias de testículo e de fígado. **A** – Ensaios com mitocôndrias de testículo de animais injectados *in vivo* com DDE e TCDD e respectivos controlos; **B** – Ensaios *in vitro* com mitocôndrias de testículo expostas a DDE e TCDD em comparação com os ensaios controlo; **C** – Ensaios *in vitro* com mitocôndrias de fígado expostas a DDE e TCDD em comparação com os ensaios controlo.

Todas as colunas representam Média+Erro padrão. Os dados referentes aos gráficos A e B foram analisados com testes t para amostras emparelhadas e os do gráfico C com testes não paramétricos equivalentes também para amostras emparelhadas. \*  $p \leq 0,05$

Não se observaram diferenças significativas para a razão ATP/ADP e para a carga energética entre ensaios controlo e DDE ou TCDD nos estudo *in vivo* e *in vitro* para o testículo e fígado.

## Capítulo 4

Discussão

## 4. Discussão

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que os poluentes ambientais DDE e TCDD têm algum impacto negativo na bioenergética mitocondrial das células de testículo. Indicando também que a mitocôndria testicular pode e deve ser usada como modelo para uma correcta avaliação dos efeitos de tóxicos ambientais na reprodução, uma vez que a extrapolação de resultados obtidos com outros tipos de mitocôndrias mais utilizadas em modelos toxicológicos (nomeadamente hepáticas) pode não reflectir o que se passa na gónada masculina.

O protocolo de isolamento de mitocôndrias testiculares permite a obtenção de uma população heterogénea de mitocôndrias provenientes dos vários tipos celulares presentes no testículo. Não foi possível realizar um estudo pormenorizado com mitocôndrias isoladas de tipos individualizados de células, uma vez que o isolamento de mitocôndrias funcionais de testículo está associado a um rendimento extremamente baixo em termos de proteína mitocondrial. Assim, o testículo foi analisado como um todo, sendo a resposta das mitocôndrias aos poluentes ambientais observada representativa de todo o órgão. Estudos futuros, pelo menos procurando diferenciar entre mitocôndrias de células somáticas e células germinais, deverão procurar particularizar os resultados em termos dos tipos celulares presentes.

A dose aguda e o curto tempo de exposição a DDE e TCDD, não teve como objectivo principal simular as condições a que animais e humanos estão normalmente expostos, mas sim determinar se as mitocôndrias estão envolvidas nas etapas iniciais de toxicidade causada por estes compostos, observando-se o efeito directo sobre as mitocôndrias independentemente dos efeitos mediados por receptores (receptor AhR, receptor de estrogénios e receptor de androgénio). O possível efeito do veículo DMSO, foi excluído neste estudo, visto que os parâmetros bioenergéticos das mitocôndrias dos animais tratados foram sempre avaliados em comparação com o grupo controlo. Além disso, embora a média dos volumes de DMSO injectado nos animais controlo para o DDE e TCDD tenha sido muito diferente (766 µl e 229 µl, respectivamente) não se observaram efeitos dependentes da dose, podendo-se inferir que apesar da perda de peso no grupo controlo, o DMSO não está a interferir directamente nos resultados obtidos.

Embora a exposição a DDT possa ocorrer mais directamente em indivíduos envolvidos na produção e aplicação deste insecticida, estima-se que 90% do DDT

acumulado na população geral provém da alimentação (WHO, 2004). O DDE, metabolito mais comum do DDT, é ainda mais estável no ambiente (Song *et al.*, 2008; Ando, 1982), estimando-se que o tempo de vida média do DDE no plasma seja de aproximadamente 10 anos (Turusov *et al.*, 2002). Estudos anteriores sugerem que o DDE, além de afectar o sistema reprodutor masculino através de alterações na regulação hormonal (Kelce *et al.*, 1995; Rosselli *et al.*, 2000), pode ter uma acção mais directa sobre as células testiculares (Song *et al.*, 2008; Xiong *et al.*, 2006), estando a mitocôndria possivelmente envolvida na toxicidade induzida por este composto. Os primeiros estudos com aplicação directa de DDT e DDE em mitocôndrias foram realizados com recurso a mitocôndrias de fígado, principal órgão de desintoxicação do organismo, e revelaram que estes compostos podem ter efeitos adversos sobre a bioenergética mitocondrial (Ferreira *et al.*, 1997; Moreno & Madeira, 1991). Estes resultados foram confirmados por este estudo, embora a dose de DDE utilizada nos ensaios *in vitro* com mitocôndrias de fígado tenha sido superior à usada anteriormente. Por outro lado, as indicações de que o DDE pode induzir apoptose por via mitocondrial em culturas de células de Sertoli, podendo a geração de ROS ter um papel crítico nesse processo, realçam a necessidade de estudos utilizando mitocôndrias de testículo (Song *et al.*, 2008).

Na superfície de órgãos de animais injectados com DDE foi possível observar aglomerados de cor branca e tamanho variável. A análise histológica permitiu concluir que estes aglomerados representavam zonas de inflamação, resultantes da deposição do composto químico (observável como cristais). Como esperado, não se observaram outras alterações microscópicas no epidídimo ou fígado, dada a natureza do ensaio. De facto, não se esperariam efeitos radicais na arquitectura testicular 24 horas após injeção.

Nos ensaios *in vivo* não foram observadas diferenças estatísticas nos parâmetros bioenergéticos dos animais tratados com DDE em relação aos animais controlo. Contudo observou-se uma tendência para que as mitocôndrias dos animais injectados com DDE tivessem um potencial máximo e um potencial de despolarização mais elevados. Isto foi posteriormente confirmado, de forma inequívoca e estatisticamente significativa, utilizando ensaios *in vitro*. Estes resultados foram completamente inesperados, visto que no fígado está descrito que o DDE provoca uma diminuição do potencial quando é adicionado a mitocôndrias isoladas (Ferreira *et al.*, 1997). Para

confirmar que estes efeitos não se deviam, por exemplo, a uma possível contaminação do stock de DDE ou a efeitos inesperados e inespecíficos de DMSO nas mitocôndrias de testículo, efectuou-se também um estudo *in vitro* com aplicação directa do composto sobre mitocôndrias de fígado, usando uma dose igual à utilizada nos ensaios com testículo *in vitro*. Os resultados obtidos com estas mitocôndrias vão ao encontro dos previamente descritos, ocorrendo uma diminuição drástica do potencial após a adição deste contaminante ambiental. Isto permitiu concluir que as mitocôndrias destes dois órgãos apresentam respostas opostas à mesma dose de DDE, comprovando a necessidade da utilização de tecido testicular para testar os efeitos toxicológicos neste órgão.

Embora se possa especular sobre o possível mecanismo de acção do DDE nas mitocôndrias de testículo, este não pôde ser determinado experimentalmente. A diminuição do “leak” a protões pode ser um dos mecanismos envolvidos no aumento do potencial pelas mitocôndrias de testículo. A entrada de protões na matriz sem envolver a síntese de ATP pode ocorrer por interferência directa com a estabilidade das membranas, pelo aumento do acoplamento entre as subunidades  $F_1$  e  $F_0$  da ATP sintase (normalmente fraco nas mitocôndrias testiculares como sugerido por Vázquez-Memije *et al.*, 1988) ou por inibição de transportadores, como as proteínas desacopladoras (UCPs) cuja presença funcional no testículo foi previamente confirmada (Amaral *et al.*, 2008) ou inibição de canais de potássio sensíveis a ATP (cuja presença e funcionalidade ainda não foi comprovada nas mitocôndrias testiculares; embora tenha sido detectado neste órgão a expressão de uma isoforma da subunidade SUR (SUR2) destes canais por Inagaki *et al.*, 1996). Uma vez que se observou uma respiração mais lenta após o tratamento das mitocôndrias com DDE, e dado que o uso desta substância como substrato ser altamente improvável, estas hipóteses foram descartadas na análise do aumento do potencial mitocondrial.

Além disso, em testículo observaram-se diferenças significativas na despolarização induzida por ADP (menor nas mitocôndrias tratadas) e na lag phase (maior nas mitocôndrias expostas a DDE), indicando que o DDE pode estar a causar uma inibição do sistema fosforilativo, confirmado também pela diminuição dos níveis de ATP, medidos por HPLC, após um ciclo de fosforilação. Por outro lado no fígado não se observaram estas alterações o que é concordante com os resultados utilizando mitocôndrias de fígado já relatados por Ferreira *et al.* (1997). Já os parâmetros

respiratórios apresentam um comportamento idêntico nestes dois órgãos induzindo velocidades de respiração no estágio 3 e 4 menores. Foi previamente sugerido (Ferreira *et al.*, 1997) que a inibição da respiração mitocondrial na presença de DDE se deve a uma inibição directa do complexo II e da translocação do succinato para a mitocôndria, já que quando as mitocôndrias foram energizadas com substratos para o complexo I não houve qualquer alteração na respiração mitocondrial. Não foi possível confirmar se o mesmo se verifica em mitocôndrias de testículo, uma vez que este estudo foi direccionado para o complexo II, deixando esta hipótese em aberto.

O TCDD, membro mais potente da classe das dioxinas, está associado a toxicidade em diversos sistemas e órgãos, incluindo o sistema reprodutor (Birnbau & Tuomisto, 2000; Pocar *et al.*, 2005). O mecanismo biológico pelo qual o TCDD exerce estes efeitos ainda não é completamente conhecido. Estudos anteriores indicam que a toxicidade induzida por TCDD pode ser mediada pelo receptor AhR (Fernandez-Salguero *et al.*, 1996; Fisher *et al.*, 2005; Pocar *et al.*, 2005; Senft *et al.*, 2002), cuja expressão no tecido testicular foi demonstrada (Schultz *et al.*, 2003). Contudo outros estudos sugerem que alguns efeitos no testículo possam ser independentes do receptor AhR, podendo ser originados pela acção directa do TCDD noutros componentes celulares (Simanainen *et al.*, 2004). O testículo não seria exemplo único desta acção directa, uma vez que o TCDD pode promover a progressão de tumores por actuar directamente na transcrição e stress oxidativo mitocondrial, indicando que a mitocôndria pode ser importante na toxicidade por vias independentes do AhR (Biswas *et al.*, 2008). Por outro lado, verificou-se que a exposição a TCDD induz stress oxidativo no sistema reprodutor (Latchoumycandane *et al.*, 2003), demonstrando a necessidade de estudar o impacto do TCDD em mitocôndrias testiculares.

Nos ensaios *in vivo* não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros bioenergéticos dos animais tratados com TCDD. No entanto, a utilização *in vitro* deste composto nas mitocôndrias de testículo revelou uma diminuição da despolarização induzida por ADP, um aumento da lag-phase, uma redução da velocidade do estágio 3 e uma tendência quase significativa para uma diminuição do ICR. Uma vez que não há alteração nos valores de potencial gerados pelas mitocôndrias expostas a TCDD, estes resultados sugerem que este composto afecta a função mitocondrial ao nível do sistema fosforilativo. Os resultados deste estudo indicam que o TCDD tem efeitos directos sobre mitocôndrias de testículo, independentes dos receptores. A discrepância de resultados

*in vivo* e *in vitro* pode dever-se à biodistribuição do TCDD no organismo, uma vez que este composto se acumula principalmente no tecido adiposo. A dose usada nos ensaios *in vitro* parece não afectar a bioenergética das mitocôndrias de fígado. No entanto, se recorrermos à literatura existente verificamos que os efeitos descritos para mitocôndrias de fígado em ensaios *in vivo* voltam a ser diferentes dos observados em mitocôndrias de testículo, com um ligeiro aumento do potencial, aumento da velocidade 3 e 4 e também um aumento significativo do ICR, quando energizadas com substrato para o complexo II (Shertzer *et al.*, 2006). A ausência de efeitos do TCDD na bioenergética mitocondrial do fígado *in vitro* neste estudo sugere que a possível resposta a este composto neste órgão possa ocorrer apenas para doses mais elevadas ou ser mediada pelo receptor AhR.

Curiosamente, ao contrário do que acontece para o TCDD, a Antimicina A (substância cujos efeitos são bem conhecidos ao nível do Complexo III) provoca mais alterações significativas nos parâmetros bioenergéticos das mitocôndrias de fígado do que nas de testículo apresentando, no entanto, o mesmo padrão de alterações bioenergéticas, como era esperado. Assim, a ligeira inibição da cadeia respiratória ao nível do complexo III, provocou uma diminuição do potencial máximo gerado, aumento da lag-phase e diminuição do potencial de repolarização, bem como diminuição da velocidade do estágio 3 e 4 e do ICR. Os ensaios com Antimicina A serviram assim como um controlo positivo permitindo validar as diferenças observadas entre órgãos na resposta aos poluentes ambientais.

Os estudos *in vitro* usando estes dois órgãos permitiram concluir que as mitocôndrias testiculares apresentam uma sensibilidade e um padrão de resposta diferente das mitocôndrias de fígado quando expostas a DDE, TCDD e Antimicina A, em vários parâmetros bioenergéticos. A não observação de diferenças para DDE e TCDD na razão ATP/ADP dos níveis destes nucleótidos de adenina, após um ciclo fosforilativo, é consistente com a ausência de diferenças no ADP/O nos ensaios com mitocôndrias de testículo e fígado. Os ensaios *in vitro* foram muito úteis porque permitiram confirmar algumas das tendências observadas *in vivo*, o que valida este sistema de estudo e realça a sua importância para avaliar rapidamente o possível efeito de poluentes ambientais na fertilidade masculina. Além disso o sistema *in vitro* tem a vantagem de permitir a observação do efeito directo sobre as mitocôndrias permitindo contornar alguns aspectos relacionados com o estudo *in vivo*, como a distribuição

sistémica do composto, ou o tempo e custo envolvidos nos ensaios. Este estudo realça mais uma vez a importância de testar o efeito de um composto sobre as mitocôndrias de testículo em vez de fazer inferências através dos seus efeitos noutros órgãos. Isto é especialmente importante porque muitas vezes as mitocôndrias de fígado são usadas como modelo toxicológico para outros órgãos, como por exemplo no estudo de Hase *et al.* (2008), em que se usaram mitocôndrias de fígado para avaliar os efeitos do herbicida Atrazina em espermatozóides. Embora o nosso modelo seja representativo da resposta de todo o testículo, deve sem dúvida ser considerado como um modelo mais adequado para este tipo de análises.

É importante destacar que as concentrações de DDE e TCDD usadas neste estudo são muito superiores às que ocorrem nos tecidos na maioria dos organismos. Além disso não podem ser feitas inferências directas dos resultados obtidos neste modelo animal para a espécie humana. Contudo, sendo a mitocôndria um organelo particularmente sensível a poluentes ambientais, vital para os mecanismos de vida e morte da célula, bem como para a fertilidade masculina; a influência de poluentes ambientais nas mitocôndrias de testículo deve ser considerada como um bom indicador inicial de toxicidade reprodutiva.

## Capítulo 5

Conclusão

## 5. Conclusão

Neste trabalho a utilização de mitocôndrias testiculares como modelo toxicológico foi amplamente validada, indicando que podem e devem ser usadas como modelo primário para estudar o efeito de poluentes ambientais na espermatogénese e fertilidade masculina. Os resultados indicaram que os poluentes ambientais DDE e TCDD têm um impacto negativo na bioenergética mitocondrial das células de testículo, afectando ao nível do sistema fosforilativo, por actuação directa sobre as mitocôndrias. Pode concluir-se também que a mitocôndria pode estar envolvida nas vias de toxicidade independentes de receptores anteriormente sugeridas para estes compostos.

As diferenças observadas na resposta e sensibilidade das mitocôndrias dos dois órgãos estudados quando expostas a DDE e TCDD evidenciam o facto de o testículo ser um órgão único em termos metabólicos e indicam que as mitocôndrias de fígado podem não ser adequadas para avaliar o impacto de poluentes ambientais no sistema reprodutor, realçando a importância da mitocôndria testicular como novo modelo toxicológico.

No futuro seria interessante avaliar a produção de ROS nas mitocôndrias após a exposição a estes contaminantes ambientais, já que está descrito que estão associados a stress oxidativo, na tentativa de elucidar se o aumento do potencial mitocondrial após exposição a DDE nas mitocôndrias de testículo está associado a uma maior produção de ROS. Seria também interessante elucidar os mecanismos de acção pelos quais estes compostos afectam as mitocôndrias testiculares, avaliando por exemplo se a diferente resposta entre órgãos se deve a um diferente conteúdo lipídico das membranas mitocondriais ou a diferentes componentes proteicos, já referenciados por outros autores. O conhecimento da existência de diferentes isoformas de proteínas nas mitocôndrias de testículo leva também a questionar a razão do seu aparecimento e funcionamento e demonstra que a mitocôndria testicular deve ser encarada como entidade única. No entanto resta igualmente determinar eventuais diferenças entre mitocôndrias de diferentes tipos celulares existentes no testículo.

## Capítulo 6

Referências Bibliográficas

54

## 6. Referências Bibliográficas

- Agarwal A., Saleh R.A., Bedaiwy M.A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*. 79 (4), 829-843.
- Ahmed S.I., Shibasaki M., Takeuchi T., Kikuchi H. (2005). Protein kinase C $\theta$  activity is involved in the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced signal transduction pathway leading to apoptosis in L-MAT, a human lymphoblastic T-cell line. *FEBS Journal*. 272, 903-915.
- Allen J.A., Shankara T., Janus P., Buck S., Diemer T., Hales K.H., Hales D.B. (2006). Energized, polarized, and actively respiring mitochondria are required for acute Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology*. 147(8), 3924-3935.
- Amaral S., Mota P.C., Lacerda B., Alves M., Pereira M.L., Oliveira P.J., Ramalho-Santos J. (2009). Testicular mitochondrial alterations in untreated streptozotocin-induced diabetic rats. *Mitochondrion*. 9, 41-50.
- Amaral S., Mota P., Rodrigues A.S., Martins L., Oliveira P.J., Ramalho-Santos J. (2008). Testicular aging involves mitochondrial dysfunction as well as an increase in UCP2 levels and proton leak. *FEBS Letters*. 582(30), 4191-4196.
- Ando M. (1982). Dose-Dependent Excretion of DDE (1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene) in Rats. *Archives of Toxicology*. 49, 139-147.
- Aneck-Hahn N.H., Schulenburg G.W., Bornman M.S., Farias P., de Jager C. (2007). Impaired Semen Quality Associated With Environmental DDT Exposure in Young Men Living in a Malaria Area in Limpopo Province, South Africa. *Journal of Andrology*. 28(3), 423-434.
- Antunes-Madeira M.C. & Madeira V.M. (1993). Effects of DDE on the fluidity of model and native membranes: implications for the mechanisms of toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1149, 86-92.
- Anway M.D., Cupp A.S., Uzumcu M., Skinner M.K. (2005). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308, 1466-1469.

- Anway M.D., Skinner M.K. (2006). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology*. 147 (6) supplement, S43-S49.
- Bajpai M. Gupta G. Setty B.S. (1998). Changes in carbohydrate metabolism of testicular germ cells during meiosis in the rat. *European Journal of Endocrinology*. 138(3), 322-327.
- Barros S.B., Pimente R., Simizu K., Azzalis L.A., Costa I.S., Junqueira V.B. (1994). Dose-dependent study of liver lipid peroxidation related parameters in rats treated with p,p'-DDT. *Toxicology Letters*. 70, 33-38.
- Ben Rhouma K., Tébourbi O., Krichah R., Sakly M. (2001). Reproductive toxicity of DDT in adult male rats. *Human & Experimental Toxicology*. 20 (8), 393-397.
- Bentzen T.W., Muir D.C., Amstrup S.C., O'Hara T.M. (2008) Organohalogen concentrations in blood and adipose tissue of Southern Beaufort Sea polar bears. *Science of the Total Environment*. 406 (1-2), 352-67.
- Bereiter-Hahn J., Vöth M., Mai S., Jendrach M. (2008). Structural implications of mitochondrial Dynamics. *Biotechnology Journal*. 3, 765–780.
- Bhatia R., Shiau R., Petreas M., Weintraub J.M., Farhang L., Eskenazi B. (2005). Organochlorine pesticides and male genital anomalies in the child health and development studies. *Environmental Health Perspectives*. 113(2), 220-224.
- Birnbaum L.S., Tuomisto J. (2000). Non-carcinogenic effects of TCDD in animals. *Food Additives and Contaminants*. 17(4), 275-88.
- Biswas G., Srinivasan S., Anandatheerthavarada H.K., Avadhani N.G. (2008). Dioxin-mediated tumor progression through activation of mitochondria-to-nucleus stress signaling. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*. 105(1), 186-91.
- Bohen A. (2006). Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation by second messenger-mediated signal transduction mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 63, 1236–1248.

- Boussouar F., Benahmed M. (2004). Lactate and energy metabolism in male germ cells. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 15(7), 345-350.
- Brookes P.S. (2005). Mitochondria H<sup>+</sup> leak and ROS generation: An odd couple. *Free Radical Biology & Medicine*. 38, 12-23.
- Carlsen E., Giwercman A., Keiding N., Skakkebaek N.E. (1992). Evidence for the decreasing quality of semen during the past 50 years. *British Medical Journal*. 305, 609–612.
- Chance B. & Williams G.R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry*. 17, 65–134.
- Choi J.S., Kim I.W., Hwang S.Y., Shin B.J., Kim S.K. (2008). Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on testicular spermatogenesis-related panels and serum sex hormone levels in rats. *BJU International*. 101(2), 250-255.
- Clarkson T.W. (1995). Environmental contaminants in the food chain. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 61, 682S-686S.
- Collins T.J., Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *European Molecular Biology Organization*. 1616-1627.
- Collins T.J. & Bootman M.D. (2003). Mitochondria are morphologically heterogeneous within cells. *The Journal of Experimental Biology*. 206, 1993-2000.
- Coore H.G., Denton R.M., Martin B.R., Randle P.J. (1971). Regulation of adipose tissue pyruvate dehydrogenase by insulin and other hormones. *The Biochemical Journal*. 125(1), 115-27.
- Dalvie M.A., Myers J.E., Thompson M.L., Robins T.G., Dyer S., Riebow J., Molekwa J., Jeebhay M., Millar R., Kruger P. (2004). The long-term effects of DDT exposure on semen, fertility, and sexual function of malaria vector-control workers in Limpopo Province, South Africa. *Environmental research*. 96(1), 1-8.

- de Jager C., Farias P., Barraza-Villarreal A., Avila M.H., Ayotte P., Dewailly E., Dombrowski C., Rousseau F., Sanchez V.D., Bailey J.L. (2006). Reduced seminal parameters associated with environmental DDT exposure and p,p'-DDE concentrations in men in Chiapas, Mexico: a cross-sectional study. *Journal of Andrology*. 27(1), 16-27.
- de Kretser D.M. & Kerr J.B. (1994). *The Physiology of Reproduction – The Cytology of the Testis* (E. Knobil & J. D. Neil, editores). Raven Press. 1177-1290.
- de Martino C., Floridi A., Marcante M.L., Malorni W., Scorza Barcellona P., Belloci M., Silvestrini B. (1979). Morphological, histochemical and biochemical studies on germ cell mitochondria of normal rats. *Cell Tissue Research*. 196, 1–22.
- de Rooij D.G. & Russell L.D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of Andrology*. 21, 776–798.
- Dhooge W., van Larebeke N., Koppen G., Nelen V., Schoeters G., Vlietinck R., Kaufman J.M., Comhaire F.; Flemish Environment and Health Study Group (2006). Serum dioxin-like activity is associated with reproductive parameters in young men from the general Flemish population. *Environmental Health Perspectives*. 114(11), 1670-1676
- el-Sabeawy F., Wang S., Overstreet J., Miller M., Lasley B., Enan E. (1998). Treatment of Rats during Pubertal Development with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin Alters Both Signaling Kinase Activities and Epidermal Growth Factor Receptor Binding in the Testis and the Motility and Acrosomal Reaction of Sperm. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 150, 427-442.
- Ehmcke J., Hübner K., Schöler H.R., Schlatt S. (2006). Spermatogonia: origin, physiology and prospects for conservation and manipulation of the male germ line. *Reproduction, Fertility and Development*. 18, 7-12.
- Estabrook R.E. (1967). Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O ratios. *Methods in Enzymology*. 10, 41-47.

- Faqi A.S., Dalsenter P.R., Merker H.J., Chahoud I. (1998). Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 150, 383-392.
- Fariss M.W., Chan C.B., Patel M., Houten B.V., Orrenius S. (2005). Role of Mitochondria in Toxic Oxidative Stress. *Molecular Interventions*. 5(2), 94-111.
- Fernandez-Salguero P.M., Hilbert D.M., Rudikoff S., Ward J.M., Gonzalez F.J. (1996). Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 140(1), 173-179.
- Ferreira F.M., Madeira V.M., Moreno A.J. (1997). Interactions of 2,2-bis(p-chlorophenil)-1,1-dichloroethylene with Mitochondrial Oxidative Phosphorilation. *Biochemical Pharmacology*. 53, 299-308.
- Ferreira F.M., Palmeira C.M., Seiça R., Moreno A.J., Santos M.S. (2003). Diabetes and mitochondrial bioenergetics: alterations with age. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 17(4), 214-22.
- Fisher H.M. & Aitken R.J. (1997). Comparative Analysis of the Ability of Precursor Germ Cells and Epididymal Spermatozoa to Generate Reactive Oxygen Metabolites. *The Journal of Experimental Zoology*. 277, 390-400.
- Fisher M.T., Nagarkatti M., Nagarkatti P.S. (2005). Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of loss of mitochondrial membrane potential in epididymal spermatozoa by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Toxicology Letters*. 157(2), 99-107.
- Fox S.I. (2003). *Human Physiology – Chapter 20: Reproduction*. Eighth Edition. The McGraw-Hill Companies. 636-649.
- França L.R., Ogawa T., Avarbock M.R., Brinster R.L., Russell L.D. (1998). Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in rat. *Biology of Reproduction*. 59, 1371-1377.

- Frey T.G. & Mannella C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences*. 25(7), 319-324.
- Gazzotti P., Malmstron K., Crompton M. (1979) Preparation and assay of animal mitochondria and submitochondrial vesicles in: *Membrane Biochemistry: A Laboratory Manual on Transport and Bioenergetics* (Carafoli, E. and Semenza, G., Eds.). Springer-Verlag. New York. 62–69.
- Grassman J.A., Masten S.A., Nigel J. Walker N.J., Lucier G.W. (1998). Animal Models of Human Response to Dioxins. *Environmental Health Perspectives* 106, Supplement 2, 761-775.
- Gray L. E., Kelce W. R., Monosson E., Ostby J. S., Birnbaum L. S. (1995). Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long-Evans rats and hamsters: reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 131,108-118.
- Gray L.E., Ostby J.S., Kelce W.R. (1997). A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male Long Evans hooded rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 146, 11-20.
- Hase Y., Tatsuno M., Nishi T., Kataoka K., Kabe Y., Yamaguchi Y., Ozawa S.N., Natori M., Handa H., Watanabe H. (2008). Atrazine binds to  $F_1F_0$ -ATP synthase and inhibits mitochondrial function in sperm. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 366, 66–72.
- Hassoun E.A., Li F., Abushaban A., Stohs S.J. (2001). Production of superoxide anion, lipid peroxidation and DNA damage in the hepatic and brain tissues of rats after subchronic exposure to mixtures of TCDD and its congeners. *Journal of Applied Toxicology*. 21(3), 211-219.
- Hassoun E.A., Li F., Abushaban A., Stohs S.J. (2000). The relative abilities of TCDD and its congeners to induce oxidative stress in the hepatic and brain tissues of rats after subchronic exposure. *Toxicology*. 145(2-3), 103-113.

- Hassoun E., Bagchi M., Bagchi D., Stohs S.J. (1993). Comparative studies on lipid peroxidation and DNA-single strands break induced by lindane, DDT, chlordane and endrin in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 104, 427–431.
- Hikim A.P.S., Lue Y., Romero M.D., Yen P.H., Wang C., Swerdloff R.S. (2003). Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *Journal of Steroids Biochemistry and Molecular Biology*. 85, 175-182.
- Holstein A.F., Schulze W., Davidoff M. (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1:107, 1-16.
- Hossain A., Tsuchiya S., Minegishi M., Osada M., Ikawa S., Tezuka F.A., Kaji M., Konno T., Watanabe M., Kikuchi H. (1998). The Ah receptor is not involved in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin-mediated apoptosis in human leukemic T cell lines. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(31), 19853-19858.
- Ikeda M., Tamura M., Yamashita J., Suzuki C., Tomita T. (2005). Repeated in utero and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure affects male gonads in offspring, leading to sex ratio changes in F<sub>2</sub> progeny. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 206, 351-355.
- Inagaki N., Gono T., Clement J.P., Wang C.Z., Aguilar-Bryan L., Bryan J., Seino S. (1996). A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Neuron*. 16(5), 1011-1017.
- Johnson L., Dickerson R., Safe S.H., Nyberg C.L., Lewis R.P., Welsh T.H. Jr. (1992). Reduced Leydig cell volume and function in adult rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin without a significant effect on spermatogenesis. *Toxicology*. 76(2), 103-118.
- Junqueira L.C. & Carneiro J. (2003). *Basic Histology – The Male Reproductive System* (Foltin J., Lebowitz H., Boyle P., editores). MacGraw Hill Companies. 431-447.
- Kakkar P. & Singh B.K. (2007). Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 305, 235–253.

- Kamo N., Muratsugu M., Hongoh R., Kobatake Y. (1979). Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *Journal of Membrane Biology*. 49, 105–121.
- Kelce W.R., Stone C.R., Laws S.C., Gray L.E., Kempainen J.A., Wilson E.M. (1995). Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*. 375, 581-585.
- Kogevinas M. (2001) Human health effects of dioxins: cancer, reproductive and endocrine system effects. *Human Reproduction Update*. 7(3), 331-339.
- Lai K.P., Wong M.H.; Wong C.K.C. (2005a). Effects of TCDD in modulating the expression of Sertoli cell secretory products and markers for cell-cell interaction. *Toxicology*. 206, 111-123.
- Lai K.P., Wong M.H., Wong C.K.C. (2005b). Inhibition of CYP450scc expression in dioxin-exposed rat Leydig cells. *Journal of Endocrinology*. 185, 519-527.
- Latchoumycandane C., Chitra K.C., Mathur P.P. (2003). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces oxidative stress in the epididymis and epididymal sperm of adult rats. *Archives of Toxicology*. 77, 280-284.
- Leavens T.L., Sparrow B.R., Devito M.J. (2002). Lack of antiandrogenic effects in adult male rats following acute exposure to 2,2-bis(4-chlorophenil)-1,1-dichloroethylene (p,p'-DDE). *Toxicology*. 174, 69-78.
- Longnecker M.P., Gladen B.C., Cupul-Uicab L.A., Romano-Riquer S.P., Weber J.P., Chapin R.E., Hernandez-Avila M. (2007). In utero exposure to the antiandrogen 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (DDE) in relation to anogenital distance in male newborns from Chiapas, Mexico. *American Journal of Epidemiology*. 165 (9),1015-1022.
- Longnecker M.P., Klebanoff M.A., Brock J.W., Zhou H., Gray K.A., Needham L.L., Wilcox A.J. (2002). Maternal serum level of 1,1-dichloro-2,2-bis(p-

- chlorophenyl)ethylene and risk of cryptorchidism, hypospadias, and polythelia among male offspring. *American Journal of Epidemiology*. 155(4), 313-22.
- Makita Y., Matsuura T., Ogata R., Romero Y., Omura M., Tanaka A., Hirata M., Inoue N. (2003a). Systemic effects of orally administered p,p'-DDE on immature male Wistar rats during pubertal period. *Journal of Occupational Health*. 45(4), 223-227.
- Makita Y., Matsuura T., Ogata R., Romero Y., Omura M., Tanaka A., Hirata M., Inoue N. (2003b). Systemic toxicity of p,p'-DDE in aged Wistar rats following oral administration. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 94(4), 59-65.
- Mandal P.K. (2005). Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *Journal of Comparative Physiology B*. 175(4), 221-30.
- Mays-Hoopers L.L. Bolen J., Riggs A.D., Singer-Sam J. (1995). Preparation of Spermatogonia, Spermatocytes, and Round Spermatids for Analysis of Gene Expression Using Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Biology of Reproduction*. 53, 1003-1011.
- McLaren, A (2003). Primordial germ cells in the mouse. *Developmental Biology*. 262, 1-15.
- Meinhardt A., Wilhelm B., Seitz J. (1999). Expression of mitochondrial marker proteins during spermatogenesis. *Human Reproduction*. 5(2), 108-119.
- Mocarelli P., Gerthoux P.M., Ferrari E., Patterson Jr D.G., Kieszak S.M., Brambilla P., Vincoli N., Signorini S., Tramacere P., Carreri V., Sampson E.J., Turner W.E., Needham L.L. (2000). Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offspring. *The Lancet*. 355, 1858-1863.
- Mocarelli P., Gerthoux P.M., Patterson D.G. Jr., Milani S., Limonta G., Bertona M., Signorini S., Tramacere P., Colombo L., Crespi C., Brambilla P., Sarto C., Carreri V., Sampson E.J., Turner W.E., Needham L.L. (2008). Dioxin exposure, from

- infancy through puberty, produces endocrine disruption and affects human semen quality. *Environmental Health Perspectives*. 116 (1): 70-77.
- Moreno A.J., Madeira V.M. (1991). Mitochondrial bioenergetics as affected by DDT. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1060 (2), 166-174.
- Moreno A.J.; Oliveira P.J., Nova C.D., Álvaro A.R., Moreira R.A., Santos S.M., Macedo T. (2007). Unaltered Hepatic Oxidative Phosphorylation and Mitochondrial Permeability Transition in Wistar Rats Treated with Nimesulide: Relevance for Nimesulide Toxicity Characterization. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 21, 53-61.
- Mota P., Amaral S., Martins L., de Lourdes Pereira M., Oliveira P.J., Ramalho-Santos J. (2009). Mitochondrial bioenergetics of testicular cells from the domestic cat (*Felis catus*) – A model for endangered species. *Reproductive Toxicology*. 27(2), 111-116.
- Mruk D.D. & Cheng C.Y. (2004). Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine Reviews*. 25 (5), 747-806.
- Nakamura M., Okinaga S., Arai K. (1984). Metabolism of pachytene primary spermatocytes from rat testes: pyruvate maintenance of adenosine triphosphate level. *Biology of Reproduction*. 30 (5), 1187-1197.
- Oliveira P.J., Santos D.J., Moreno A.J. (2000). Carvedilol Inhibits the Exogenous NADH Dehydrogenase in Rat Heart Mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 374 (2), 279-285.
- Oliveira P.J., Wallace K.B. (2006). Depletion of adenine nucleotide translocator protein in heart mitochondria from doxorubicin-treated rats--relevance for mitochondrial dysfunction. *Toxicology*. 220(2-3),160-168
- Orrenius S, Gogvadze V., Zhivotovsky B. (2007). Mitochondrial Oxidative Stress: Implications for Cell Death. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 47, 143–183.

- Ott M., Gogvadze V., Orrenius S. Zhivotovsky B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 12, 913–922.
- Pedersen P.L. (1999). Mitochondrial events in the life and death of animal cells: a brief overview. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 31 (4), 291–304.
- Pereira C.V., Moreira A.C., Pereira S.P., Machado N. G., Carvalho F.S., Sardão V.A., Oliveira P.J. (2009) Investigating Drug-induced Mitochondrial Toxicity: A Biosensor to Increase Drug Safety?. *Current Drug Safety*. 4(1), 34-54.
- Pereira G.C., Branco A.F., Matos J.A., Pereira S.L., Parke D., Perkins E.L., Serafim T.L., Sardão V.A., Santos M.S., Moreno A.J., Holy J., Oliveira P.J. (2007). Mitochondrially targeted effects of berberine [Natural Yellow 18, 5,6-dihydro-9,10-dimethoxybenzo(g)-1,3-benzodioxolo(5,6-a) quinolizinium] on K1735-M2 mouse melanoma cells: comparison with direct effects on isolated mitochondrial fractions. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 323(2), 636-649.
- Perez-Maldonado I.N., Daz-Barriga F., De la Fuente H., González- Amaro R., Calderón J., Yanez L. (2004). DDT induces apoptosis in human mononuclear cells in vitro and is associated with increased apoptosis in exposed children. *Environmental Research*. 94, 38–46.
- Peterson C. & Söder O. (2006). The Sertoli cell – A hormonal target and “super” nurse for germ cells that determines testicular size. *Hormone Research*. 66, 153-161.
- Pocar P., Fischer B., Klonisch T., Hombach-Klonisch S. (2005). Molecular interactions of the aryl hydrocarbon receptor and its biological and toxicological relevance for reproduction. *Reproduction*. 129(4), 379-389.
- Ramalho-Santos J., Varum S., Amaral S., Mota P.C., Sousa A.P., Amaral A. (2009). Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. 15(5), 553-572.
- Ramón Piñón Jr. (2002). *Biology of Human Reproduction – Chapter 2: Sex, Reproduction and Mutation*. University Science Books. 146.

- Ray S., Swanson H.I. (2009). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by TCDD inhibits senescence: a tumor promoting event? *Biochemical Pharmacology*. 77(4), 681-688.
- Rignell-Hydbom A., Rylander L., Giwercman A., Jonsson B.A., Lindh C., Eleuteri P., Rescia M., Leter G., Cordelli E., Spano M., Hagmar L. (2005) Exposure to PCBs and p, p'-DDE and human sperm chromatin integrity. *Environmental Health Perspectives*. 113, 175-179.
- Rignell-Hydbom A., Rylander L., Giwercman A., Jonsson B.A., Nilsson-Ehle P., Hagmar L. (2004). Exposure to CB-153 and p,p'-DDE and male reproductive function. *Human Reproduction*. 19(9), 2066-75.
- Robaire B. & Viger R.S. (1995). Regulation of Epididymal Epithelial Cell Functions. *Biology of Reproduction*. 52, 226-236.
- Robison R. & Fritz I.B. (1981). Metabolism of glucose by Sertoli cells in culture. *Biology of Reproduction*. 24(5), 1032-1041.
- Romero Y.E. (1998). Effects of p,p'-DDE on male reproductive organs in peripubertal Wistar rats following a single intraperitoneal injection. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 89(2), 64-77.
- Rosselli M., Reinhart K., Imthurn B., Keller P.J., Dubey R.K. (2000). Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function. *Human Reproduction Update*. 6 (4), 332-350.
- Rune G.M., de Souza P., Krowke R., Merker H.J., Neubert D. (1991). Morphological and histochemical pattern of response in rat testes after administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Histology and Histopathology*. 6, 459-467.
- Saradha B., Mathur P.P. (2006). Effect of environmental contaminants on male reproduction. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 21, 34-41.
- Sardão V.A., Oliveira P.J., Holy J., Oliveira C.R., Wallace K.B. (2009). Morphological alterations induced by doxorubicin on H9c2 myoblasts: nuclear, mitochondrial, and cytoskeletal targets. *Cell Biology and Toxicology*. 25(3), 227-243.

- Saunders P.T.K. (2003). Germ cell-somatic cell interactions during spermatogenesis. *Reproduction Supplement* 61, 91-101.
- Schauf C., Moffett D., Moffett S. (1990). *Human Physiology Foundation and Frontiers – Chapter 25: Reproduction and Its Endocrine Control*. Times Mirror/Mosby College Publishing. USA. 646-650.
- Schultz R., Suominen J., Värre T., Hakovirta H., Parvinen M., Toppari J., Pelto-Huikko M. (2003). Expression of aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator messenger ribonucleic acids and proteins in rat and human testis. *Endocrinology*. 144(3), 767-76.
- Senft A., Dalton T.P., Nebert D.W., Genter M.B., Hutchinson R.J., Shertzer H.G. (2002a). Dioxin increases reactive oxygen production in mouse liver mitochondria. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 178, 15-21.
- Senft A.P., Dalton T.P., Nebert D.W., Genter M.B., Puga A., Hutchinson R.J., Kerzee J.K., Uno S., Shertzer H.G. (2002b). Mitochondrial reactive oxygen production is dependent on the aromatic hydrocarbon receptor. *Free Radical Biology and Medicine*. 33 (9), 1268-1278.
- Shertzer H.G., Genter M.B., Shen D., Nebert D.W., Chen Y., Dalton T.P. (2006). TCDD decreases ATP levels and increases reactive oxygen production through changes in mitochondrial F(0)F(1)-ATP synthase and ubiquinone. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 217, 363-74.
- Shi Y., Song Y., Wang Y., Liang X., Hu Y., Guan X. (2009). p,p'-DDE Induces Apoptosis of Rat Sertoli Cells via a FasL-Dependent Pathway. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009:181282. Epub 2009 Jul 22, 11 pages.
- Simanainen U., Adamsson A., Tuomisto J. T., Miettinen H.M., Toppari J., Tuomisto J., Viluksela M. (2004). Adult 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) Exposure and Effects on Male Reproductive Organs in Three Differentially TCDD-Susceptible Rat Lines *Toxicological Sciences*. 81, 401–407.

- Skakkebaek N.E., Rajpert-De M.E., Main K.M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reproduction*. 16, 972–978.
- Skulachev V.P. (2001). Mitochondrial filaments and clusters as intracellular powertransmitting cables. *Trends in Biochemical Sciences*. 26(1), 23-29.
- Song Y., Liang X., Hu Y., Wang Y., Yu H., Yang K. (2008). p,p'-DDE induces mitochondria-mediated apoptosis of cultured rat Sertoli cells. *Toxicology*. 253, 53-61.
- Stocchi V., Cucchiaroni L., Magnani M., Chiarantini L., Palma P., Crescentini G. (1985). Simultaneous extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatographic determination of adenine and pyridine nucleotides in human red blood cells. *Analytical Biochemistry*. 146(1), 118-24.
- Tahara E.B., Navarete F.D., Kowaltowski A.J. (2009). Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radical Biology and Medicine*. 46(9), 1283-1297.
- Tavares R.S., Martins F.C., Oliveira P.J., Ramalho-Santos J., Peixoto F.P. (2009) Parabens in male infertility – Is there a mitochondrial connection? *Reproductive Toxicology*. 27(1), 1-7.
- Tebourbi O., Driss M.R., Sakly M., Rhouma K.B. (2006). Metabolism of DDT in different tissues of young rats. *Journal of Environmental Science and Health Part B*. 41, 167-176.
- Tebourbi O., Rhouma K.B., Sakli M. (1998). DDT induces apoptosis in rat thymocytes. *Bulletion of Environmental Contamination and Toxicology*. 61, 216–223.
- Tiido T., Rignell-Hydbom A., Jonsson B., Giwercman Y.L., Rylander L., Hagmar L., Giwercman A. (2005). Exposure to persistent organochlorine pollutants associates with human sperm Y:X chromosome ratio. *Human Reproduction*. 20, 1903-1909.

- Tiido T., Rignell-Hydbom A., Jönsson B.A., Giwercman Y.L., Pedersen H.S., Wojtyniak B., Ludwicki J.K., Lesovoy V., Zvezday V., Spano M., Manicardi G.C., Bizzaro D., Bonfeld-Jørgensen E.C., Toft G., Bonde J.P., Rylander L., Hagmar L., Giwercman A.; INUENDO. (2006). Impact of PCB and p,p'-DDE contaminants on human sperm Y:X chromosome ratio: studies in three European populations and the Inuit population in Greenland. *Environmental Health Perspectives*. 114(5), 718-24.
- Toppari J., Larsen J.C., Christiansen P., Giwercman A., Grandjean P., Guillette LJ Jr, Jégou B., Jensen T.K., Jouannet P., Keiding N., Leffers H., McLachlan J.A., Meyer O., Müller J., Rajpert-De Meyts E., Scheike T., Sharpe R., Sumpter J., Skakkebaek N.E. (1996). Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives*. 104 Supplement 4, 741–803.
- Turusov V., Rakitsky V., Tomatis L. (2002) Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): Ubiquity, Persistence, and Risks. *Environmental Health Perspectives*. 110: 125–128.
- Vázquez-Memije M.E., Izquierdo-Reyes V., Delhumeau-Ongay G. (1988) The insensitivity to uncouplers of testis mitochondrial ATPase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 260(1), 67-74.
- Walker W.H. & Cheng J. (2005). FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*. 130, 15-28.
- Wallace K.B. & Starkov A.A. (2000). Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 40, 353–388.
- Wenger R.H., Katschinski D.M. (2005). The hypoxic testis and post-meiotic expression of PAS domain proteins. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 16(4-5), 547-553.
- WHO (World Health Organization) (2004). DDT and its Derivatives in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. World Health Organization. 1-7.

- Xiong X., Wang A., Liu G., Liu H., Wang C., Xia T., Chen X., Yang K. (2006). Effects of p,p-dichlorodiphenyldichloroethylene on the expressions of transferrin and androgen-binding protein in rat Sertoli cells. *Environmental Research*. 101, 334-339.
- You L., Casanova M., Archibeque-Engle S., Sar M., Fan L.Q., Heck H.A. (1998). Impaired male sexual development in perinatal Sprague-Dawley and Long-Evans hooded rats exposed in utero and lactationally to p,p'-DDE. *Toxicological Sciencies*. 45(2), 162-73.