



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**Evaluación del efecto del disruptor endocrino (dioxina) sobre  
marcadores celulares y moleculares del sistema reproductor,  
inmune y nervioso.**

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS  
NATURALES

P R E S E N T A :  
M. en C. HEBA YEHIA ANWAR ELSAYED

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, julio de 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**Evaluación del efecto del disruptor endocrino (dioxina) sobre  
marcadores celulares y moleculares del sistema reproductor,  
inmune y nervioso.**

# TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS  
NATURALES**

**P R E S E N T A :**

**M. en C. HEBA YEHIA ANWAR ELSAYED**

**COMITÉ TUTORIAL:**

**DRA. ESVIETA TENORIO BORROTO. Tutor Académico**

**DR. ALBERTO BARBABOSA PLIEGO. Tutor Adjunto**

**DRA. FABIOLA RIVERA RAMÍREZ. Tutor Adjunto**

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, julio de 2019

## **DEDICATORIA**

*A mi familia, mis padres, mis hermanos, mi esposo y mis hijos*

*A mis padres por ser como fueron, porque gracias a ellos yo soy.*

*Te agradezco padre por dejarme ser, por el amor que me tienes y por estar presente en todas las etapas de mi vida, gracias por mostrarme con tu valentía y tus ganas de vivir el gran sentido de la vida.*

*A mi padre y a mi madre que día a día resguarda mi camino, y me guía para seguir adelante en el camino de la vida.*

*Como las ramas de un árbol crecemos en diferentes direcciones, pero nuestra raíz es una sola, así la vida de cada uno siempre será una parte esencial de la vida del otro, gracias Hermanos.*

## RESUMEN

Los químicos disruptores endocrinos (EDC) son compuestos que alteran la estructura y función del sistema endocrino y pueden estar contribuyendo a trastornos de los sistemas reproductivos, metabólicos, neuroendocrinos y otros sistemas complejos. Las dioxinas es una clase de contaminantes ampliamente diseminados en todo el ambiente y causan efectos tóxicos a altas dosis demostrada en varias especies. La exposición de animales de laboratorio causa muchas formas de toxicidad, como hepatotoxicidad, inmunosupresión e infertilidad. Se realizó un ensayo de toxicidad subaguda con el disruptor endocrino 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) en conejos adultos machos de Nueva Zelanda (n = 30) y ratones CD1 machos adultos (n = 30) con tres dosis bajas para simular la realidad de la exposición a este compuesto ( 0.375, 0.75 y 1.5 µg / kg). Los resultados de este trabajo muestra una disminución del peso corporal en ratones y conejos adultos sin afectar significativamente el peso de testículos, hígado y bazo. Las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT) muestran una variación significativa en los grupos tratados con respecto al control. Se evidencia efectos significativos en la motilidad y la malformación de los espermatozoides. Se determinó la citotoxicidad y la apoptosis de los espermatozoides y los linfocitos de bazo e hígado mediante 7AAD y Annexin V usando citometría de flujo. Estas evaluaciones muestran un aumento de la citotoxicidad y una disminución de la apoptosis en las células de hígado y bazo. Eso se corroboró en las alteraciones presentadas en el análisis histopatológicos de testículo, hígado, bazo y sistema nervioso. Concluyendo que la exposición a las dosis bajas de TCDD causa efectos negativos en los órganos analizados en ambas especies.

**Palabras clave:** Dioxinas; TCDD; Hepatotoxicidad; AST; ALT Sistema reproductor; Sistema inmune; Sistema nervioso; Citometría de flujo; Conejos; Ratones.

## **ABSTRACT**

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) are compounds that alter the structure and function of the endocrine system and may be contributing to disorders of the reproductive, metabolic, neuroendocrine and other complex systems. Dioxins are a class of pollutants widely spread throughout the environment and cause toxic effects at high doses demonstrated in several species. Exposure of laboratory animals causes many forms of toxicity, such as hepatotoxicity, immunosuppression and infertility. A sub acute toxicity assay was performed with the endocrine disrupter 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in male New Zealand rabbits (n = 30) and adult male CD1 mice (n = 30) with three low doses to simulate the reality of exposure to this compound (0.375, 0.75 and 1.5 µg / kg). The results of this work show a decrease in body weight in adult mice and rabbits without significantly affecting the weight of testicles, liver and spleen. The enzymes AST and ALT show a significant variation in the treated groups with respect to the control. Significant effects on motility and sperm malformation are evident. Cytotoxicity and apoptosis of spermatozoa and spleen and liver lymphocytes were determined by 7AAD and AnnexinV/IP using flow cytometry. These evaluations show an increase in cytotoxicity and a decrease in apoptosis in liver and spleen cells. This was corroborated in the alterations presented in the histopathological analysis of the testes, liver, spleen and nervous system. Concluding that exposure to low doses of TCDD causes negative effects in the organs analyzed in both species.

**Key Words:** Dioxins; TCDD; Hepatotoxicity; AST; ALT Reproductive system; Immune system; Nervous system; Flow cytometry; Rabbits; Mice.

## **A G R A D E C I M I E N T O S**

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para poder realizar los estudios de Doctorado.*

*Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA)*

*A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Estado de México*

*A la Universidad Tecnológica del Valle de Toluca (UTVT).*

*Al Dra. Esvieta por creer en mí, y ayudar me a completar este trabajo*

*Al Dr. Alberto por sus sabios consejos e importantes aportaciones al desarrollo de este trabajo.*

*Al Dra. Fabiola por su atención, paciencia y gran apoyo.*

*A todas las personas que de alguna u otra manera aportaron su granito de arena en el desarrollo de este trabajo.*

## CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Generalidades del sistema hormonal.....	4
2.2. Disruptores endocrinos. ....	9
2.2.1. Definición y clasificación.....	9
2.2.2 Fuentes de producción.....	10
2.2.3 Mecanismos y modos de acción de EDCs.....	13
2.2.4. Efectos en salud humana y animal de los disruptores endocrinos. ....	16
2.2.4.1 Salud Humana.....	17
2.2.4.2. Fauna silvestre. ....	19
2.3. Las Dioxinas ....	22
2.3.1. Introducción.....	22
2.3.2. Dioxinas y el mundo.....	24
2.3.3 Toxicocinética ....	26
2.3.3.1 Fuentes de producción ....	26
2.3.3.2. Fuente de exposición ....	26
2.3.3.3. Metabolismo ....	27
2.3.3.4. Mecanismo de acción ....	28
2.3.4 Toxicidad por dioxinas ....	31
2.3.4.1 Toxicidad aguda y en corto tiempo por TCDD ....	31
2.3.4.3. Toxicidad crónica por TCDD ....	31
2.3.4.2.1. Efecto de TCDD sobre Hígado.....	32
2.3.4.2.2. Efecto de TCDD sobre sistema inmune ....	32

2.3.4.2.3. Efecto de TCDD sobre sistema reproductor.....	33
2.3.4.2.4. Efecto de TCDD sobre sistema nervioso .....	34
II. JUSTIFICACIÓN .....	35
III. HIPÓTESIS .....	36
IV. OBJETIVOS .....	37
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	37
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	37
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
5.1. Animales .....	38
5.1.1. Conejos.....	38
5.1.2 Ratones .....	38
5.2. Diseño experimental .....	39
5.3. Preparación de TCDD.....	40
5.4. Análisis espermático .....	40
5.4.1. Recuento de esperma.....	40
5.4.2. Vitalidad de la esperma .....	40
5.4.3. Morfología de la esperma.....	41
5.4.4. Movilidad de la esperma .....	41
5.5. Ensayo de citometría de flujo .....	41
5.5.1. Ensayo de Anexin V / PI con fluoresceína (FITC).....	41
5.5.2. Análisis de Inmunofenotipificación y citotoxicidad empleando Citometria de Flujo. 42	
5.6. Niveles séricos de aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT) .....	43
5.7. Análisis histopatológico.....	43



5.8. Análisis estadístico.....	43
VI. RESULTADOS .....	44
VII. DISCUSIÓN GENERAL .....	132
VIII. CONCLUSIONES GENERALES.....	135
IX. SUGERENCIAS.....	136
X. REFERENCIAS .....	137

## INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Comunicación celular .....	4
Fig. 2 Glándulas endocrinas .....	5
<b>Fig. 3 Receptores hormonales de membrana .....</b>	<b>7</b>
Fig. 4 Receptores hormonales intracelulares .....	7
Fig. 5 Fuente de los disruptores endocrinos .....	13
Fig. 6 Estructuras químicas de Dibenzofuranos Policlorados (PCDD), Dibenzodioxinas Policloradas (PCDF) y bifenilos policlorados (BPC) de dioxinas.....	23
Fig. 7 Emisiones de PCDD/F en los continentes .....	25
Fig. 8 Mecanismo de formación de una dioxina.....	26
Fig. 9 Exposición a las dioxinas .....	27
Fig. 10 Funciones del Ahr .....	28
Fig. 11 Mecanismo de acción de las dioxinas .....	30

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Fuentes de toxicidad endócrinade.....	11
Tabla 2 Comparación entre los mecanismo de acción de las hormonas y los disruptores endorricinos.....	15
Tabla 3 Propiedades fisicoquímicas de las dioxinas.....	24
Tabla 4 Efectos agudos de la toxicidad de TCDD.....	31
Tabla 5 Dosis de TCDD para los efectos agudos y crónicos.....	32
Tabla 6 . Comportamiento del peso corporal y el peso de hígado de ratones expuestos a diferentes dosis de TCDD.	97
Table 7. Efectos sobre los parametros bioquímicos de hígado	98
Table 8 . Comportamiento del peso corporal y el peso de higado de conejos expuestos a diferentes dosis de TCDD.	105
Table 9 . Efectos sobre los parametros bioquímicos de hígado (aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT) en conejos admintrados por vía oral con TCDD durante 10 días.	106

## I. INTRODUCCIÓN

Los productos químicos son un componente esencial de nuestra vida cotidiana. Pero algunos químicos, pueden tener efectos dañinos en el sistema endocrino conocidos como disruptores endocrinos (DE) (Monneret, 2017). En 2012 la Endocrine Society, los definió como "un químico exógeno, o una mezcla de químicos, que puede interferir con cualquier aspecto de la acción hormonal"(Schug et al., 2016). Su importancia radica debido a que su efecto se puede producir mucho después de que la exposición haya cesado e incluso puede tener consecuencias para la próxima generación, pues el sistema endocrino desempeña un papel central en todos los vertebrados y regula funciones biológicas críticas como el metabolismo, el desarrollo, la reproducción y el comportamiento(Kuo, Yang, Kuo, & Hung, 2012)

La prevención de los riesgos para la salud y el medio ambiente por la exposición a disruptores endocrinos (DE) representa un desafío importante para la salud pública. Los EDCs, son compuestos químicos que se encuentran en nuestro entorno, la mayoría hechos por el hombre, en diversos materiales como pesticidas, metales, aditivos o contaminantes en los alimentos y productos para el cuidado personal, que imitan, bloquean o interfieren con el sistema endocrino al alterar la síntesis, liberación, transporte, metabolismo o acción de hormonas endógenas, y producen trastornos de inmunidad, reproductivos, metabólicos, neuroendocrinos y otros sistemas complejos (Messerlian, Martinez, Hauser, & Baccarelli, 2017; Monneret, 2017; Patisaul, 2017).

Los métodos tradicionales de evaluación de riesgos de las sustancias químicas incorporados a la normativa vigente no son válidos para proteger a la población y al medio ambiente frente a los DE, debido a sus particulares características toxicológicas. Estas sustancias pueden actuar a dosis muy bajas y existen períodos del desarrollo que son especialmente vulnerables a la disrupción endocrina, provocando importantes efectos sobre la salud a lo largo de toda la vida, su relación dosis-efecto no es lineal, pueden actuar combinadas y producir efectos a varias generaciones, su exposición puede propiciar largos períodos de latencia y eso por ello que no es posible establecer umbrales de exposición seguros a DE.

Esta problemática constituye un nuevo paradigma, es por ello que se deben aplicar principios de prevención, y adoptar medidas urgentes para: eliminar o reducir su exposición en animales y humanos. Para ellos se hace necesario establecer nuevos métodos para identificación y evaluación que incluyan todas las sustancias capaces de interferir con el sistema hormonal, reproductor, inmune y nervioso (Maffini, Rubin, Sonnenschein, & Soto, 2006).

Las dioxinas son una clase de hidrocarburos aromáticos, policlorinados persistentes, que se forman durante la combustión incompleta, la producción de algunos solventes, herbicidas y pesticidas, y al quemarse materia orgánica clorada y combustibles fósiles. Por lo tanto, pueden formarse cantidades muy pequeñas en la incineración industrial, doméstica y municipal. También se liberan pequeñas cantidades en la fundición, el procesamiento y el refinado de metales, y el uso de cloro para blanquear la pulpa en las fábricas de papel y de fertilizantes, (Rathna, Varjani, & Nakkeeran, 2018).

Mediante estudios epidemiológicos se mostró que los altos niveles de exposición a las dioxinas conducen a un mayor riesgo de tumores. Sin embargo las exposiciones reales a estos productos ocurren a bajas dosis lo cual aun no se conoce con claridad sus consecuencias. Otros efectos sobre los seres humanos y los animales (Erthal, Siervo, Silveira, Scarano, & Fernandes, 2018) son la inmunotoxicidad (hipersensibles, desarrollando autoinmunidad y alergias), toxicidad reproductiva y neurotoxicidad (Besteman et al., 2007; Dhanabalan, Mathur, & Latha, 2015; Liu et al., 2014; Simanainen et al., 2004; Şahin & Saçan, 2018). Los datos sobre animales y exposiciones a dioxinas ecológicas han revelado un patrón común de respuesta biológica entre especies de vertebrados, que está mediado por la activación del Receptor de hidrocarburo de Aryl (AhR) (Roy et al., 2018; Watson et al., 2014).

Los efectos mediados por AhR incluyen profundas consecuencias en el individuo vertebrado expuesto en los primeros años de vida con respecto a una miríada de puntos finales del desarrollo incluyendo neurológicos, parámetros inmunológicos y reproductivos. Humano parece ser susceptible a estos efectos de manera similar a las especies de laboratorio y de vida silvestre, que han demostrado tales resultados. Además, los datos

epidemiológicos sugieren que hay es poco o ningún margen de exposición para los humanos con respecto a estos desarrollos (Roy et al., 2018; Watson et al., 2014).

Una preocupación particular es la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), se conoce como disruptor endocrino potencial más potente entre 200 dioxinas, que se forma como un no deseado subproducto en la fabricación de hidrocarburos clorados(Young, 2006). Se ha estimado que las plantas cultivadas en suelos contaminados con TCDD juega un papel importante en la vía de exposición de la cadena alimentaria, representado el 98% de la exposición humana (Maranghi et al., 2013).

Tiene un amplio espectro de efectos tóxicos sobre una variedad de tejidos tales como el hígado, los testículos y el sistema nervioso central en animales (di Domenico & Zapponi, 1986). Entre los eventos tóxicos selectos, se considera que el estrés oxidativo juega un papel importante en el mecanismo tóxico de TCDD, que se caracteriza por aumentos marcados de la peroxidación de lípidos y la formación de especies reactivas de oxígeno.(Chang et al., 2009; Han et al., 2017; Stohs, 1990). Es por ello que el propósito de nuestro trabajo es evaluar los efectos de la dioxina TCDD sobre la calidad espermática, el sistema inmune y el sistema nervioso en dos especies ratón y conejo con el fin de conocer a bajas dosis los efectos adversos de este disruptor.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Generalidades del sistema hormonal.

El sistema hormonal o endocrino es un sistema de comunicaciones. En los organismos pluricelulares la comunicación entre las células es esencial para que funcionen coordinadamente. Esta comunicación, y la integración de la información se producen mediante estímulos químicos. Las células contiguas se comunican por moléculas de superficie y uniones especializadas, mientras que la comunicación entre células que se encuentran alejadas se realiza a través de la secreción de mensajeros químicos, las hormonas, que activan células diana interaccionando con receptores específicos. El sistema utilizado para transportar a los mensajeros químicos hasta las células diana es el circulatorio, concretamente la sangre (fig. 1) (Gore et al., 2015; Romano Pozo, 2012)

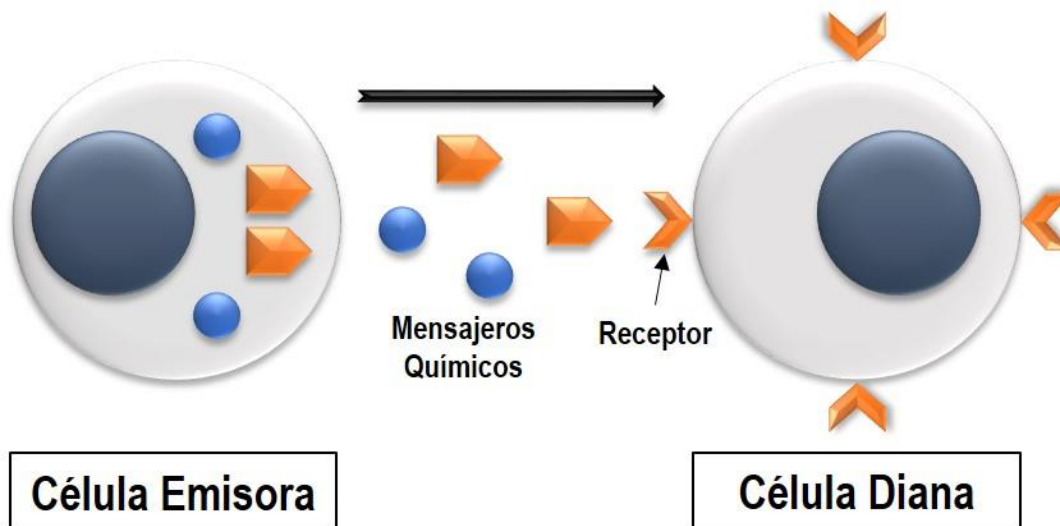


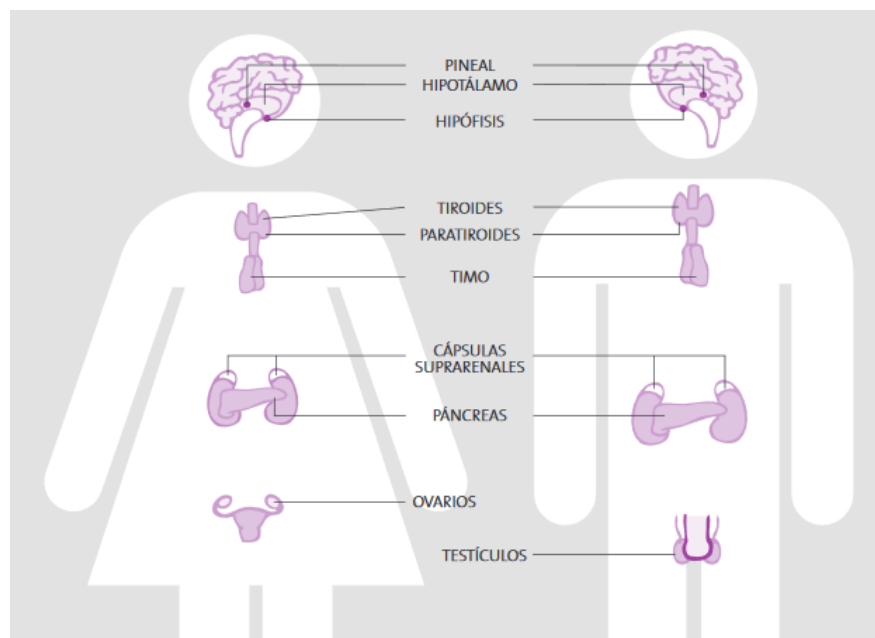
Fig. 1 Comunicación celular

Las hormonas actúan en cantidades muy pequeñas y en momentos precisos en el tiempo para regular el desarrollo, crecimiento, reproducción, metabolismo, inmunidad y comportamiento del cuerpo.(Kuo et al., 2012)

Las células cuya función principal es la de secretar mensajeros químicos (hormonas), se denominan células endocrinas y se pueden encontrar en 3 localizaciones anatómica:

- Células endocrinas agrupadas formando un órgano especializado o glándula endocrina.
- Células endocrinas formando pequeños grupos dentro de otros órganos especializados (ovario, testículo, páncreas).
- Células endocrinas dispersadas individualmente entre otras células de tejidos epiteliales, especialmente del sistema digestivo y respiratorio, denominadas en su conjunto sistema neuroendocrino difuso(Romano Pozo, 2012).

Por lo que el sistema endocrino consiste una serie de glándulas que son distribuidas a través del cuerpo y producen una o mas hormonas. Las hormonas son químicos naturales que se producen dentro de las células y son liberadas hacia el sistema circulatorio hasta un tejido u órgano diana. Entonces se unen a receptores específicos para la producción otra hormona, cambios en el metabolismo. Las glándulas endocrinas incluyen la pituitaria, la tiroides y las glándulas adreanles, y partes del riñón, hígado, corazón y gonadas (fig.2), que en conjunto forman los ejes hipotálamo-pituitaria-gonada, hipotálamo-pituitaria-adrenales e hipotálamo-pituitaria tiroides (Gore et al., 2015; Kortenkamp et al., 2011).



Fuente: Romano Pozo, 2012

**Fig. 2 Glándulas endocrinas**

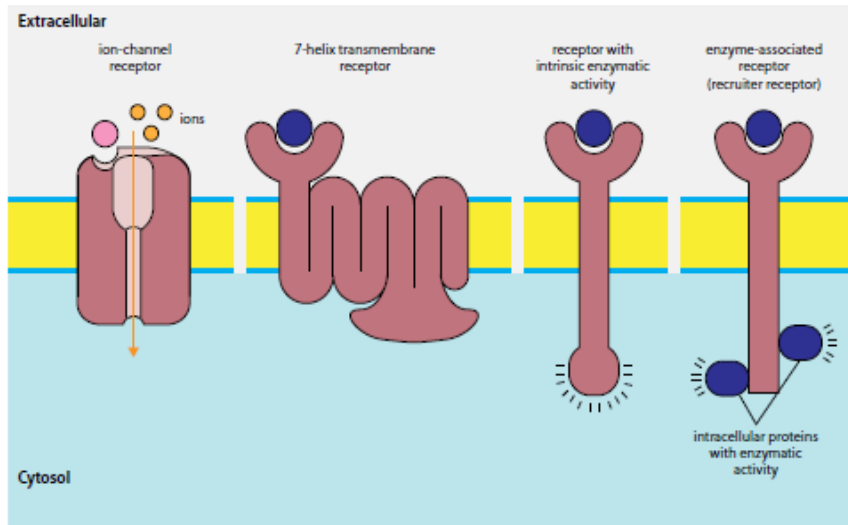


El sistema endocrino interactúa con el sistema nervioso a través del hipotálamo, la hipófisis y los neurotransmisores entre otros, y ambos interactúan a su vez con el sistema inmune, a través de las citoquinas, que también son hormonas. Dada su estrecha interrelación, algunos autores consideran los tres sistemas conjuntamente, como el sistema neuro-inmuno-endocrino (Romano Pozo, 2012).

Las hormonas son importantes para invertebrados y vertebrados, son esenciales para el control de un gran número de procesos en el cuerpo desde procesos tempranos hasta la diferenciación celular. Por lo que el sistema endocrino está diseñado específicamente a responder a las fluctuaciones ambientales (temperatura, balance hidroelectrolítico), con la finalidad de mantener la homeostásis, además de jugar un rol esencial en el crecimiento y desarrollo, y en el metabolismo y la reproducción (Bergman, Heindel, Jobling, Kidd, & Zoeller, 2013a, 2013b; Zoeller et al., 2014).

Los efectos hormonales son mediados por proteínas llamadas receptores, que atraen y se unen a hormonas específicas. Los receptores hormonales proporcionan especificidad a las acciones hormonales, tanto en términos del tiempo como del lugar de acción hormonal. Están limitados en cantidad, ubicación y tiempo, por lo que las hormonas no actúan en todas las células porque sus receptores no se encuentran en todas las células, o se encuentran dentro de la célula, o sólo en determinado tiempo del ciclo de la vida (Bergman et al., 2013b). Por lo que el modo de acción hormonal va a depender del receptor, y estos se puede localizar:

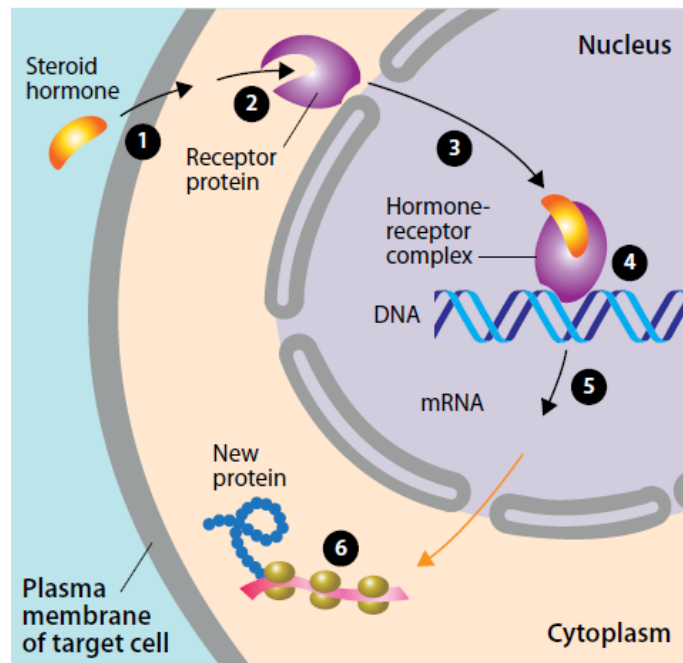
- **Membrana de las células (fig. 3).** La unión del receptor con la membrana puede provocar una alteración de la permeabilidad de la membrana (ej. transmisión del impulso nervioso en las neuronas, la insulina y los glucocorticoides). También pueden modificar a un segundo mensajero intracelular (AMPc o GMPc)



Fuente: Bergman et.al., 2013

**Fig. 3 Receptores hormonales de membrana**

- **Receptores intracelulares (fig. 4)** activan con la hormona y se transportan al interior del núcleo donde dan la orden de sintetizar una nueva proteína **efectora** (Romano Pozo, 2012).



Fuente: Bergman et.al., 2013

**Fig. 4 Receptores hormonales intracelulares**

De manera general las hormonas actúan a muy bajas concentraciones. En parte, porque las hormonas tienen una alta afinidad por sus receptores, que no es necesario altas concentraciones para iniciar los efectos biológicos. Esto es importante porque las concentraciones muy bajas de disruptores endocrinos ambientales, podrían producir una respuesta más grande que la basal (Romano Pozo, 2012).

## **2.2. Disruptores endocrinos.**

### **2.2.1. Definición y clasificación.**

Aunque las investigaciones de sustancias no identificadas como disruptores endocrinos (ED), existen desde mediados del siglo XX, el término fue usado por primera vez en la literatura científica en 1993. En 2002 la Organización de las Naciones Unidas los definió como son sustancias químicas exógenas, que alteran la función del sistema endocrino y, por tanto, causan efectos adversos en la salud en un organismo intacto o su progenie y en 2012 la Endocrinology Society, como un químico exógeno, o mezcla de químicos, que interfiere con algún aspecto de la acción hormonal (Balaguer, Delfosse, Grimaldi, & Bourguet, 2017; Bergman et al., 2013a, 2013b; Zoeller et al., 2014).

De acuerdo a su origen en hormonas naturales y artificiales, medicamentos con efectos hormonales secundarios, productos químicos industriales y doméstico, etc. Sin embargo, de acuerdo con Gore en 2014 se clasifican:

- 1) Pesticidas, generalmente son diseñados para que afectar a los sistemas reproductivos y neurológicos de los organismos, pero la similitud de estos procesos con el sistema fisiológico humanos indican que estos compuestos pueden afectarlo. Ej. El DDT, clorpirifos, organofosforados, etc.

Los pesticidas en general se usan para eliminar malezas, insectos, mohos, roedores. Los de origen sintéticos han sido populares entre los agricultores debido a la simple aplicación, rendimientos altamente efectivos y económicos en términos de alto rendimiento de cultivos saludables (Babina, Dollard, Pilotto, & Edwards, 2012). Difícilmente se degradarán ya que se sintetizan artificialmente. El uso continuo de pesticidas provoca la deposición de sustancias químicas nocivas en el medio ambiente como residuos. La cantidad de residuos que queda depende de la naturaleza del producto químico, la dosis de aplicación y las condiciones climáticas imperantes (Groot & Van't Hooft, 2016; Singh & Nelapati, 2017).

- 2) Productos químicos utilizados en la vida cotidiana, como son los productos para niños, cuidado personal, electrónica, textiles, etc.

3) Materiales de contacto con los alimentos(Kabir, Rahman, & Rahman, 2015).

Los disruptores endocrinos pueden ser:

- **Productos químicos sintéticos** desarrollados y utilizados con diversas finalidades: biocidas, fitosanitarios, cosméticos, aditivos para formulados dentales, componentes de polímeros plásticos, componentes de artículos de consumo como recubrimientos de superficies, pinturas, y detergentes industriales, entre otros.
- **Medicamentos sintéticos** con una alta actividad hormonal intencionada, como los anticonceptivos hormonales y la terapia hormonal sustitutiva en menopausia, cuyos residuos pueden alcanzar el medioambiente
- **Productos químicos naturales** incluyendo toxinas, producidas por algunos hongos y plantas, como es el caso de los llamados “fitoestrógenos” (compuestos químicos no esteroides, pero que desempeñan funciones similares en las plantas) como la genisteína, el cumestrol o las isoflavonas.
- **Hormonas naturales** procedentes de animales o personas liberadas al medio ambiente, producidas por una especie y disruptoras para otras especies.

Estos tipos de EDCs están presentes en los distintos compartimentos ambientales ya sea por liberación intencionada o accidental (ej: hormonas humanas reactivadas o medicamentos sintéticos procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales), y en los bienes de consumo. En el caso particular de los productos químicos sintéticos la exposición se inició hace unas décadas, a partir de la 2ª Guerra Mundial(Muñoz, Gullett, Touati, & Font, 2012)

### **2.2.2 Fuentes de producción.**

Las fuentes de exposición a DE son usualmente diversas y ampliamente distribuida en todo el ambiente y la sociedad. Están presentes en el aire que respiramos, el agua que tomamos, e incluso en la tierra en la que se cultiva la comida, constituyendo un peligro para los organismos vivos al afectar negativamente la salud(Hao, Liu, Lu, Huang, & Zhao, 2018; Kabir et al., 2015). Resultado de la presión ejercida en el ambiente de la rápida

urbanización e industrialización, siendo los compuestos orgánicos polihalogenados los contaminantes más perjudiciales y persistentes, como lo son las dioxinas y los furanos.

Hoy en día se producen miles de toneladas de DEs al año que se descargan al medio ambiente por emisión directa o a través de los efluentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales, donde no se eliminan totalmente. Aunque el agua es el compartimento ambiental más afectado, estos contaminantes pueden adsorberse a sedimentos y bioacumularse en organismos (tabla 1) (Kabir et al., 2015; Salgueiro González, 2015).

**Tabla 1 Fuentes de toxicidad endócrina**

<b>Fuentes</b>	<b>Categoría</b>	<b>Sustancias</b>
<b>Incineración, Relleno sanitaria</b>	Compuestos policlorados (de producción industrial o subproductos de en su mayoría prohibidos sustancias)	Dioxinas policloradas, Bifenilos policlorados
<b>Esguerrimiento agrícola Transporte Atmosférico</b>	Pesticidas Organoclorados (Se encuentran en insecticidas, muchos ahora eliminado)	DDT, dieldrina, lindano
<b>Esguerrimiento agrícola</b>	Pesticidas actualmente en uso	Atrazina, trifluralina, permetrina
<b>Puertos</b>	Organotinos (que se encuentran en antiincrustantes utilizados para pintar el lleno de barcos)	Tributil
<b>Efluentes Industriales y municipales</b>	Alquilfenoles (Surfactantes - ciertos tipos de detergentes utilizados para remover aceite y sus metabolitos)	Nonilfenol
<b>Efluentes de plantas de Celulosa</b>	Fitoestrógenos	Isoflavonas, lignanos, cumestanos.
<b>Efluentes industrials</b>	Ftalatos (que se encuentran en los plactificantes)	Ftalato de dibutilo, butilbencilo ftalato
<b>Efluente municipal</b>	Hormonas Naturales (Producidas naturalmente por los animales); esteroides sintéticos (que se encuentran en anticonceptivos)	Estradiol, estrona y testosterona;
<b>Esguerrimiento agrícola</b>		Etinilestradiol

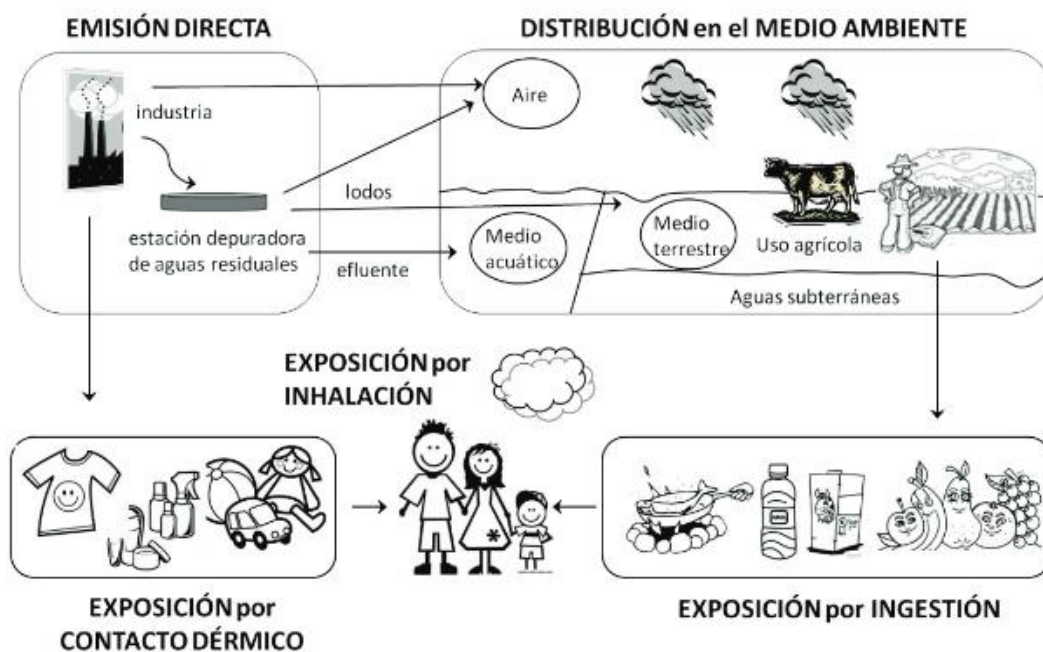
Fuente. Kabir et.al 2015

El agua es una fuente potencial de los disruptores endócrinos, la razón es que son removidos de manera incompleta durante los procesos de tratamiento de aguas residuales, esguerrimiento del suelo o descargas indiscriminadas de ellos en los cursos de agua. El agua

contaminada de las farmacéuticas y otras industrias son la principal fuente de exposición debido a los efectos adversos para el ambiente, pudiendo contener hormonas naturales o sintéticas, detergentes, jabones, plásticos, comida y productos para el cuidado personal, se liberan por ejemplo, a través de la lixiviación en el suelo y el agua. Estos son absorbidos por microorganismos, algas y plantas que luego son absorbidos por animales. Después de esto, los disruptores endocrinos encuentran su camino en la cadena alimenticia desde los animales hasta el ser humano.

Además de las fuentes de agua, el ganado en la agricultura también puede actuar como una fuente muy importante de sustancias químicas de alteración endocrina. Los esteroides sexuales como el estradiol, la progesterona y la testosterona que se identifican como disruptores endocrinos tienen efectos estimulantes del crecimiento en el hombre y el animal. Como resultado, estos productos químicos se han utilizado en la práctica agrícola durante muchos años donde se administran exógenamente para cumplir con los animales productores para mejorar el aumento de peso y la eficiencia de la alimentación. Sin embargo, estos productos químicos tienen un gran impacto en el medio ambiente porque cientos de animales pueden vivir en un área que resulta en una exposición de alta concentración de estos productos químicos al medio ambiente. Estos químicos además de contaminar el suelo, el agua y el aire del medio ambiente de esa área en particular, así como de otras áreas.

Las vías de exposición más frecuentes (fig. 5) en el caso de los seres humanos son la ingestión, inhalación y/o contacto dérmico (Kabir et al., 2015; Salgueiro González, 2015).



Fuente: Salgueiro González, 2015

**Fig. 5 Fuente de los disruptores endocrinos**

### 2.2.3 Mecanismos y modos de acción de EDCs.

Conocer los mecanismos y modos de acción de los diferentes disruptores endocrinos es una de las prioridades de la investigación en este campo. En los últimos años se ha avanzado mucho y se han descrito diferentes formas por las que los disruptores endocrinos pueden alterar el equilibrio hormonal, por lo que se aplican cinco principios de endocrinología a los DE:

1. Las hormonas integran los sistemas del cuerpo y tienen roles desde la concepción hasta el envejecimiento.
2. Actúan a través de interacciones específicas con los receptores.
3. Actúan en dosis bajas.
4. Los efectos de las hormonas dependen de la etapa de la vida.



5. Los efectos de las hormonas no son lineales, ni monotónicos(Vandenberg, 2014).

Estos compuestos químicos tienen mecanismos de disrupción diferentes:

- **Mimetizar la acción de las hormonas**, Pueden mimetizar la actividad biológica de una hormona endógena, uniéndose a un receptor celular (efecto agonista). Por ejemplo, los que actúan como estrógenos se denominan estrógenos ambientales, entre estos se encuentran el DDT, algunos PCBs y muchos fitoestrógenos, compuestos químicos no esteroideos, que se encuentran en los vegetales pero son similares a los estrógenos humano.
- **Antagonizar la acción de las hormonas**, Pueden unirse a un receptor sin activarlo, previniendo o impidiendo que lo hagan las hormonas naturales (efecto antagonista). Por ejemplo los dioxinas, los antiestrógenos como algunos PCBs o PCBS, como el fungicida vinclozina.
- **Alterar su patrón de síntesis y metabolismo**, Pueden alterar los niveles de hormonas presentes en el flujo sanguíneo, interfiriendo con las proteínas de transporte, interferir en los procesos metabólicos del organismo, afectando la síntesis o la lisis de las hormonas, ó modificar la actividad transcripcional de los genes relacionados con hormonas y receptores. Como el PBDE-99 (retardante de llama) que altera la síntesis de la hormona tiroidea (TH)
- **Modular los niveles de los receptores correspondientes**, como el TCDD A que interfiere en el receptor estrogénico (Romano Pozo, 2012).

Una misma sustancia disruptora endocrina puede actuar mediante más de un modo de acción. Los EDC se consideran “sustancias camaleónicas” ya que una misma sustancia EDC tiene diferentes modos de actuación según la concentración a la que se encuentre: Así, altas dosis de dioxinas pueden ocasionar la muerte, pero concentraciones muy bajas, similares a las que la población está expuesta a través de la ingestión de alimentos contaminados, incrementa el riesgo de anomalías en la reproducción en mujeres(Vandenberg et al., 2012). En la tabla 1 se muestra una comparación entre los

mecanismos de acción de las hormonas y los disruptores endocrinos(Bergman et al., 2013b).

**Tabla 2 Comparación entre los mecanismo de acción de las hormonas y los disruptores endocrinos**

<b>Hormonas</b>	<b>Disruptores endocrinos</b>
<b>Actúan vía receptores</b>	Algunos actúan en los receptores hormonales
<b>Tiene múltiples receptores</b>	Podría causar interacciones a isoformas
<b>Clases y subtipos de receptores de tejidos específicos</b>	
<b>Las hormonas normalmente se enlazan de manera similar a todos los receptores</b>	
<b>Actúan en dosis bajas</b>	Actúan en dosis bajas
<b>Los niveles no siempre reflejan la actividad</b>	Los niveles no siempre reflejan la actividad
<b>Se pueden enlazar a proteínas en sangre con un % pequeño libre.</b>	Podrían unirse a proteínas séricas. Efectos en la niveles hormonales en sangre puede no reflejar acción hormonal
<b>No bioacumulación</b>	Posible bioacumulación
<b>Relaciones dosis-respuesta no lineales.</b>	Relaciones dosis-respuesta no lineales.
<b>Siempre saturable con rango dinámico variable</b>	Siempre saturable con rango dinámico variable
<b>Pueden exhibir dosis respuesta no monotónica</b>	Pueden exhibir dosis respuesta no monotónica
<b>Efectos de dosis altas no iguales a dosis bajas</b>	Efectos de dosis altas no iguales a dosis bajas
<b>Efectos específicos del tejido y la etapa vital</b>	Efectos específicos del tejido y la etapa vital
<b>Efectos de desarrollo permanentes</b>	Efectos de desarrollo permanentes
<b>Programas cerebro y sistema endocrino para función de adulto</b>	Interfiere con los procesos de programación.
<b>Diferentes puntos finales varían en sensibilidad</b>	Diferentes puntos finales varían en sensibilidad

Fuente: Bergman et.al., 2013

A diferencia de la mayoría de los compuestos que tienen una relación dosis-efecto directamente proporcional, los DE realizan sus efectos nocivos a muy bajas dosis, lo que en algunas ocasiones dificulta su análisis a los profesionales por lo tanto la unidad de medida utilizada en estos compuestos es de partes por billón (ppb). Sin embargo, la dosis corporal que puede causar efecto es muy relativa, ya que hay sustancias que causan alteraciones a niveles muy bajos, pero también a niveles altos. Por ejemplo, niveles elevados (100-1.000.000 nanoMolar) de hexaclorobenceno (HCB) suprimen la actividad androgénica de células de la próstata, mientras que dosis bajas (1 nanoMolar) incrementan la actividad androgénica. La exposición uterina de ratones a dosis de 100 ppb de dietilbestrol (fármaco estrogénico) provoca que los ratones sean muy delgados una vez adultos, sin embargo, la exposición a 1 ppb da lugar a adultos obesos(Romano Pozo, 2012).

O bien tener diferentes modos de actuación según el momento específico de desarrollo del tejido con el que contacten: Para obtener una respuesta uterotrónica en un ratón adulto es necesario administrarle 100mg/ kg/día de BPA. Sin embargo, la administración de solo 25 ng/kg/día de BPA (4.000.000 veces menos) durante el periodo de gestación es capaz de provocar la respuesta del tejido ductal de las mamas Y el efecto adverso causado puede variar dependiendo del momento de la exposición así como del equilibrio hormonal de la persona expuesta, depende de la edad y sexo entre otros factores(Colborn, 2004).

#### **2.2.4. Efectos en salud humana y animal de los disruptores endocrinos.**

Existen numerosas pruebas científicas que confirman que muchos de los EDC estudiados hasta la fecha tienen una amplia gama de efectos sobre la salud humana y la fauna silvestre. Las pruebas de los efectos de los EDC sobre la salud se basan en: Efectos observados en animales silvestres, Experimentos en animales de laboratorio (in vivo) y en cultivos celulares (in vitro), Efectos observados en personas y Estudios epidemiológicos (Bergman et al., 2013b).

En los seres humanos y animales la disrupción endocrina se asocia a algunos cambios aparentes de carácter perjudicial, que se han producido en los patrones de salud humana, a escala mundial, en las últimas décadas. Estos efectos incluyen el descenso en la cuenta de espermatozoides, ocurridos en los últimos 50 años, incremento en las malformaciones congénitas, cáncer relacionado con disfunciones hormonales (mama y ovario en mujeres y testicular y de próstata en hombres). También se ha detectado un adelanto en la pubertad de adolescentes que viven en áreas contaminadas y trastornos en el desarrollo neurológico y conductivo (Colborn, 2004; Olea Serrano, Fernández, & Martín-Olmedo, 2001).

Estos efectos se han observado sin que se haya podido establecer de forma clara una relación causal entre exposición a EDCs y las patologías descritas. En gran medida porque los estudios epidemiológicos que han intentado probar la asociación entre la exposición a EDCs y el riesgo de padecimiento de enfermedad en humanos son, cuanto menos, insuficientes, si es que hemos de buscar una palabra única para definir la situación actual. Además de escasos, la mayor crítica de estos estudios epidemiológicos es que se han ceñido

a estudiar la exposición humana a uno o unos pocos compuestos químicos, en la mayor parte de los casos pesticidas, sin considerar el efecto combinado de EDCs actuando a través de mecanismos de acción hormonal común. A pesar de ello, la evidencia presentada en desarrollo urogenital en niños, adelanto en desarrollo sexual secundario en niñas, fertilidad, endometriosis y cáncer de mama es sugerente de una asociación causal entre exposición a EDCs y estos efectos (Colborn, 2004).

Una de las mayores dificultades es la correcta evaluación de la exposición. Hay que tener en cuenta que en la detección de actividad disruptora en compuestos químicos, sólo se han desarrollado ensayos para comprobar actividad hormonal androgénica y estrogénica, pero no hay ensayos armonizados para identificar otros efectos disruptores. También es sabido que en el estudio de los efectos adversos sobre la salud o el medio ambiente generados por exposición a compuestos químicos, en general, se realizan ensayos sobre compuestos específicos, pero no se dispone de tests desarrollados para reproducir condiciones de multi exposición a bajas dosis de distintos compuestos químicos de forma simultánea (Vandenberg et al., 2012).

#### **2.2.4.1 Salud Humana.**

Si bien la exposición de las personas a DE está siendo documentada de forma cada vez más prolija, la asociación entre la exposición y el riesgo de desarrollo de patologías asociadas, no está suficientemente estudiada en humanos. No obstante, hay evidencia probada por ejemplo, en casos de exposición a altas dosis de determinados compuestos químicos, como fue la exposición intencionada en los años 50 y 60 a dietilestilbestrol (DES) un estrógeno sintético prescrito a mujeres embarazadas para la prevención del aborto espontáneo, presentaron enfermedades por exposición perinatal, como cáncer vaginal en púberes y trastornos en el desarrollo en la descendencia. La Unión Europea ha evaluado 533 sustancias de una lista original definitiva de sustancias candidatas, en relación a su actividad disruptora, y se han incluido 194 sustancias en la categoría 1 (Evidencia clara de actividad disruptora en al menos un ensayo *in vivo* en una especie intacta) y 125 sustancias

en la categoría 2 (Evidencia *in vitro* o actividad biológica en organismos intactos que indique potencial para la disrupción endocrina)(Olea Serrano et al., 2001).

#### **a) Sistema reproductor masculino**

La exposición a disruptores endocrinos está relacionada con tres efectos que normalmente se consideran de forma conjunta:

1. Reducción de la capacidad reproductora manifestada por una disminución de la calidad del semen e infertilidad;
2. Alteración del desarrollo fetal resultando en malformaciones congénitas del tracto urogenital como criptorquidia (no descenso testicular) e hipospadia (posición anormal de la apertura de la uretra);
3. Aparición de tumores de células germinales de los testículos (Kortenkamp et al., 2011).

#### **b) Sistema reproductor femenino**

La exposición a disruptores endocrinos, especialmente durante el desarrollo uterino, se ha relacionado con pubertad precoz, reducción de la fecundidad, síndrome de ovarios poliquísticos, reducción de la fertilidad(Romano Pozo, 2012).

#### **c) Sistema neurológico**

La alteración del desarrollo neurológico está relacionada con los siguientes trastornos:

- Déficits neurofisiológicos: hitos del desarrollo, función cognitiva y problemas de comportamiento.
- Deterioro motor, pérdida de memoria y cambios sutiles de comportamiento.
- Déficits sensoriales, incluyendo ototoxicidad y defectos de visión.
- Agresividad en los animales.
- Defectos del desarrollo embriológico como defectos del tubo neural.

Los mecanismos endocrinos involucrados en la neurotoxicidad durante el desarrollo embriológico incluyen la interferencia con la función neuroendocrina (hipotálamo-

hipófisis) que es clave en el comportamiento reproductor y sexual y la interferencia con las hormonas en circulación, incluyendo las hormonas tiroideas y los estrógenos y andrógenos que lo regulan. El mecanismo endocrino relacionado más comúnmente con la neurotoxicidad del desarrollo es la alteración tiroidea. Una revisión de la bibliografía científica de 2004 de 48 EDC encontró que el 50% tenía potencial neurotóxico. Entre ellos se encuentran contaminantes organoclorados (PCBs, dioxinas, furanos), retardantes de llama bromados (BFR), perclorato, plaguicidas, bisfenol- A, sustancias perfluoradas (PFOA, PFOS), ftalatos, filtros ultravioletas (4MBC, OMC, BP2 BP3) y metales pesados como plomo, mercurio y arsénico(Nadal, Alonso-Magdalena, Soriano, Quesada, & Roper, 2009).

#### **d) Sistema inmune**

Los sistemas nervioso, inmunológico y endocrino están relacionados entre sí, regulándose unos a otros. Estos desórdenes del sistema neuroinmunológico pueden atribuirse a interacciones adversas entre estos sistemas, y están relacionados con la exposición a contaminantes ambientales, aunque su estudio hasta la fecha no ha recibido la misma atención que otras enfermedades. Entre los EDC relacionados con estos desórdenes neuroinmunológicos se encuentran mezclas de hidrocarburos aromáticos policíclicos, sustancias organocloradas como PCBs, dioxinas y plaguicidas, y metales y compuestos organometálicos(Colborn, 2004).

#### **2.2.4.2. Fauna silvestre.**

Desde mediados del siglo XX biólogos y naturalistas han ido documentando cómo numerosas especies de fauna silvestre, muy diferentes entre sí y localizadas en distintas áreas del planeta, están sufriendo graves problemas debido a la alteración de su sistema endocrino por exposición a EDC.

La evidencia que sugiere un vínculo entre la exposición a determinados productos químicos y la disrupción de funciones endocrinas se ha puesto de manifiesto en el estudio de especies animales en distintos ecosistemas: moluscos, crustáceos, peces, reptiles, pájaros y

mamíferos en distintas partes del mundo (Katole, Kumar, & Patil, 2013), incluyen principalmente enfermedades hormono-dependientes entre las que se encuentran: Disfunciones tiroideas, alteraciones en el crecimiento, aumento en la incidencia de problemas relacionados con el tracto reproductor masculino, disminución de la fertilidad, pérdida en la eficacia del apareamiento, anomalías del comportamiento, alteraciones metabólicas evidentes desde el nacimiento, desmasculinización, feminización y alteraciones del sistema inmune, e incluso incremento en la incidencia de diferentes tipos de tumores (Muñoz et al., 2012)

Los efectos sobre la salud de la fauna silvestre por exposición a EDC incluyen (Colborn, 2004).

- **Para aves y conejos** Los efectos del TCDD, DDT y sus metabolitos sobre las aves fueron uno de los primeros daños ocasionados por la contaminación ambiental sobre la fauna silvestre conocidos por el público tras la publicación del libro “Primavera silenciosa” de Rachel Carson. La exposición a EDC ocasiona trastornos en la reproducción, en el desarrollo de los huevos y cambios del comportamiento reproductor de aves.

Los trastornos de la reproducción por exposición a contaminantes orgánicos persistentes (COP) organoclorados, como DDT, PCBs, hexaclorobenceno (HCB), dioxinas y dieldrin, incluyen malformación de órganos sexuales, alteración de ratios entre sexos y disminución de la fertilidad.

La alteración de hormonas tiroideas relacionados con la exposición a PCBs, DDT, dioxinas y algunos PBDE causa trastornos del desarrollo de los huevos. Los cambios en las conductas reproductoras se han relacionado con la exposición a pesticidas organoclorados, PCBs, TCDD y otros COP.

- **Mamíferos** La exposición a EDC se ha estudiado principalmente en mamíferos marinos, osos polares, ciervos y mustélidos. En áreas contaminadas con COP se ha observado cómo se han reducido drásticamente las poblaciones de cetáceos y osos polares. En estas áreas también se ha documentado la correlación entre la pérdida de capacidad reproductora de cetáceos, pinípedos y mustélidos y las concentraciones

de COP en sangre y tejidos. La exposición a EDC también está relacionada con subfertilidad y malformaciones del tracto reproductor observados en ciervos y panteras de Florida. También se han observado desórdenes de tiroides y lesiones en glándulas suprarrenales en algunas de estas especies(Katole et al., 2013).

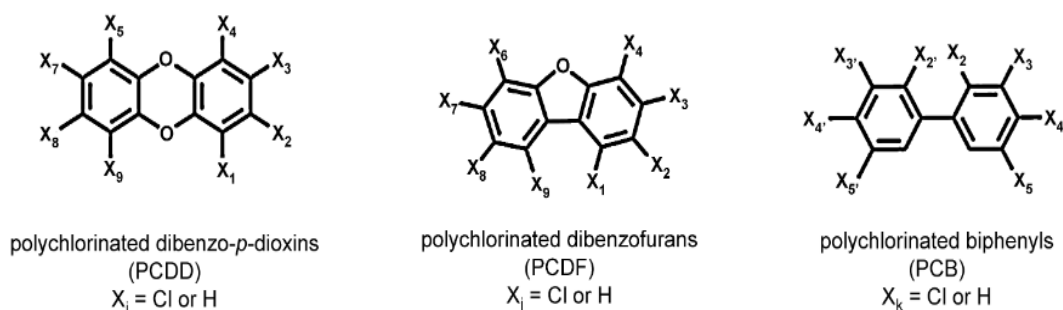


## 2.3. Las Dioxinas

### 2.3.1. Introducción

Los contaminantes orgánicos persistentes (COP) son compuestos orgánicos nocivos resistentes a la degradación biológica, química y fotolítica, por lo que se bioacumulan. Son persistentes en el medio ambiente, especialmente en suelos, sedimentos y aire durante varias décadas. Debido a su toxicidad y persistencia, representan una amenaza importante para la salud animal, humana y del medio ambiente, ya que se acumulan en los tejidos grasos de los seres humanos y animales. Son una preocupación mundial debido a su transporte a largas distancias desde el punto de producción o liberación ya que pueden evaporarse de los suelos y viajar por el aire y condensarse en regiones más frías. Los COP incluyen pesticidas y compuestos orgánicos como el  $\gamma$ -hexaclorociclohexano, 1,1,1-tricloro-2,2-dietano, bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), naftaleno policlorado, dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDDs), dibenzofuranos policlorados (PCDF), así como grupos de fuentes y fuentes de información. retardantes como los bifenilos polibromados (PBB). El tratado de Estocolmo sobre COP se instituyó para controlar los niveles de concentración de COP dentro de la población general, como resultado, “la Doceña sucia” fue creada. En particular, 12 tipos diferentes de COP incluyen aldrina, clordano, dieldrina, endrina, heptacloro, hexaclorobenceno, mirex, toxafeno, diclorodifenil tricloroetano (DDT), para ser eliminado y controlado por 150 países. (Kanan & Samara, 2018; Schuster et al., 2015)

El término de dioxina, es comúnmente usado para referirse a un grupo de compuestos orgánicos llamados bifenilos policlorados (BPC), Dibenzodioxinas Policloradas y Dibenzofuranos Policlorados (PCDD y PCDF, Fig. 6). Son contaminantes orgánicos altamente tóxicos y persistentes, que se distribuyen por todo el medio ambiente y se acumulan en la cadena alimentaria, principalmente en los tejidos grasos del animal (Mohsenzadeh, Zanjani, & Karimi, 2018; Patrizi & Siciliani de Cumis, 2018; Sorg, 2014).



Fuente: Sorg, 2014

**Fig. 6 Estructuras químicas de Dibenzofuranos Policlorados (PCDD), Dibenzodioxinas Policloradas (PCDF) y bifenilos policlorados (BPC) de dioxinas**

Pueden causar cáncer, problemas reproductivos y de desarrollo, daños al sistema inmunológico y pueden interferir profundamente en el sistema endocrino. Las dioxinas se liberan principalmente a la atmósfera como productos no deseados de diversos procesos de combustión e industriales, que se distribuyen en matrices ambientales como el suelo y el agua. A partir de estas matrices, las dioxinas se acumulan en tejidos vegetales y animales hasta que se acumulan en tejidos humanos a través de procesos de biomagnificaciones de la cadena alimentaria. En este marco, es importante enfatizar que la vida media de TCDD en humanos es muy larga; se ha estimado en el rango entre 7.1 y 11.3 años. (Patrizi & Siciliani de Cumis, 2018; Sorg, 2014)

Las propiedades más importantes para comprender el comportamiento ambiental de las dioxinas y compuestos similares a dioxinas parecen ser el coeficiente de partición octanol/agua ( $K_{ow}$ ), el coeficiente de partición octanol/aire ( $K_{oa}$ ), Solubilidad en agua ( $sw$ ), presión de vapor ( $P_v$ ) y coeficiente de partición de carbono orgánico ( $K_{oc}$ ). Son lipófilos y tienen una solubilidad en agua muy baja, por lo que entran fácilmente en la cadena alimentaria y se acumulan en los tejidos grasos, existen como sólidos incoloros o cristales en estado puro (tabla 3). Tienen una baja volatilidad, con afinidad por las partículas en Aire, agua y suelo. Los compuestos más tóxicos parecen ser los compuestos

tetra, penta y hexacloro 2,3,7,8 sustituidos (es decir, 2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD), 1,2,3,4,7,8-HxCDD, 1,2,3,6,7,8-HxCDD, y 1,2,3,7,8,9-HxCDD). Estos son también los congéneres, junto con OCPDD, que tienen la mayor tendencia a bioacumulable. uno de los congéneres más tóxicos en los mamíferos es el 2,3,7,8-TCDD; (Fernández-González, Yebra-Pimentel, Martínez-Carballo, & Simal-Gándara, 2015).

**Tabla 3 Propiedades fisicoquímicas de las dioxinas**

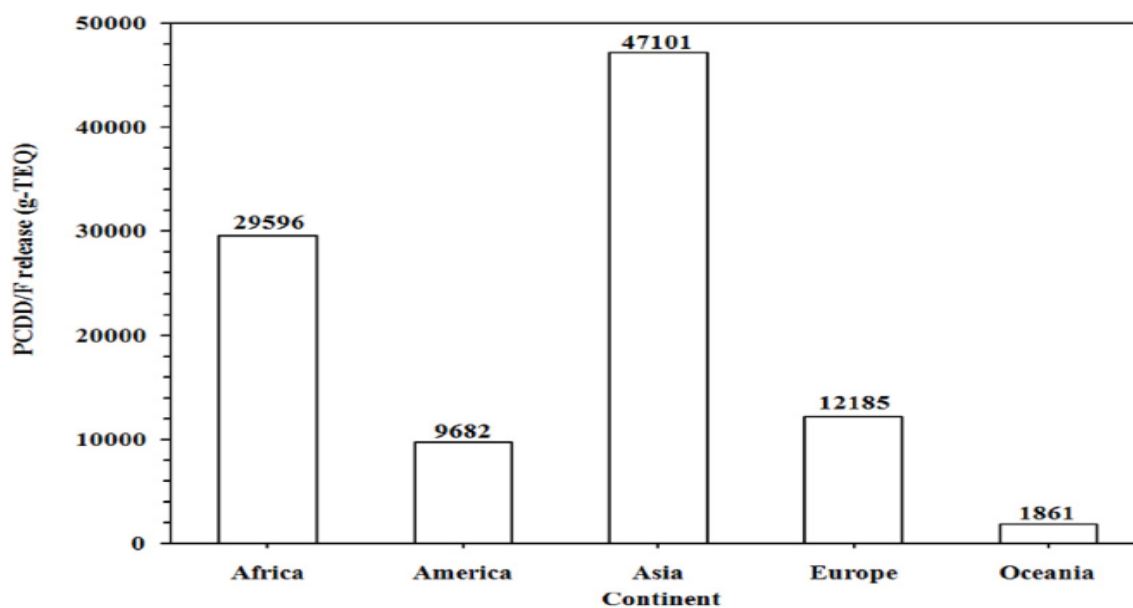
<b>Propiedad</b>	<b>Característica</b>
<b>Número CAS</b>	<b>1746-01-6</b>
<b>Peso Molecular</b>	322
<b>Fórmula empírica</b>	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
<b>Sinónimos</b>	Dioxina; TCDD, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
<b>Estado a temperatura ambiente</b>	De incoloro a blanco, como cristales en forma de aguja.
<b>Volatilidad</b>	Presión de vapor despreciable a 25 ° C
<b>Gravedad específica</b>	1.8 a 20 ° C (agua = 1)
<b>Inflamabilidad</b>	No es inflamable
<b>Límite explosivo inferior</b>	No aplicable
<b>Límite explosivo superior</b>	No aplicable
<b>Solubilidad en agua isolventes orgánicos</b>	No soluble en agua, baja solubilidad en disolventes orgánicos
<b>Reactividad</b>	Se descompone al calentarse y cuando se expone a la luz UV
<b>Reacción o degradación.</b>	Libera humos tóxicos de cloruro de hidrógeno y cloro. Descomposición por calentamiento o exposición a la luz UV.
<b>Olor</b>	Sin olor

Fuente: Bergman, 2013

### **2.3.2. Dioxinas y el mundo.**

Cuantitativamente, la producción global anual de dioxinas es de 17,226 kg, lo que corresponde a aproximadamente 287 kg/TEQ (equivalente tóxico). De la tasa de emisión anual total de dioxinas a la atmósfera, solo 9 kg-TEQ (3%) permanecen en el aire. Para el resto, el 57% está destinado a áreas terrestres (163 kg-TEQ), mientras que el resto (40%) es absorbido por las aguas del océano (115 kg-TEQ o 354 kg/año)(Dopico & Gómez, 2015).

Con referencia a la fracción de PCDD/F que se deposita o absorbe en suelos y aguas, las fuentes principales son la combustión de combustible, la producción de metales, la producción y el uso de pesticidas, la incineración de desechos, la eliminación de aguas residuales, los incendios accidentales, la eliminación en vertederos, los procesos de combustión y escurrimiento de herbicidas en uso agrícola. En estos casos, los niveles de concentración más bajos se encuentran en la Antártida y Oceanía, mientras que Europa presenta las concentraciones más altas en los suelos. Por otro lado, el norte del océano Pacífico, la alta mar y el mar Mediterráneo muestran los niveles más altos de dioxinas en el agua. Las emisiones son mayores en el continente Asiático, seguido del de Africano y menores en Oceanía (fig. 7)(Dopico & Gómez, 2015; Rathna et al., 2018).



Fuente: Rathna, 2018

Fig. 7 Emisiones de PCDD/F en los continentes

### 2.3.3 Toxicocinética

#### 2.3.3.1 Fuentes de producción

La principal fuente de dioxinas y sus productos es antropogénica. Existe evidencia de formación natural, pero las fuentes dominantes proceden de la interacción humana, especialmente las relaciones con los procesos de combustión. La formación de PCDD/Fs es producto de la reacción a altas temperaturas entre compuestos orgánicos y clorados (Mandal, 2005; Wang et al., 2014) (fig. 8). Por lo tanto, las actividades como la incineración de desechos, la fundición de metales, los incendios forestales y la combustión de combustible diesel son el entorno de reproducción perfecto para la formación de los diferentes congéneres similares a las dioxinas, ya que el cloro y los compuestos orgánicos volátiles son inevitables de los materiales de alimentación de estos procesos, mediante un mecanismo conocido como síntesis de Novak (Dopico & Gómez, 2015), en donde una parte permanece en fase sólida y otra parte en gas, por lo que los niveles en la atmósfera han cambiado en las últimas décadas (White & Birnbaum, 2009).

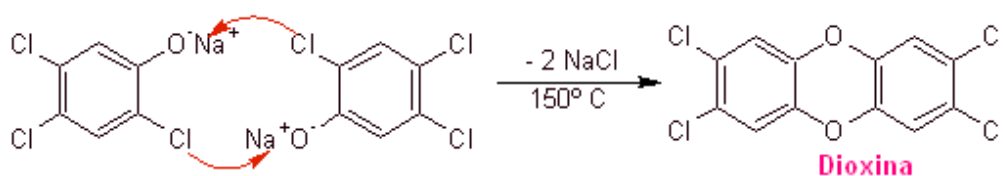


Fig. 8 Mecanismo de formación de una dioxina

#### 2.3.3.2. Fuente de exposición

La exposición humana a las dioxinas, no fue reportada antes de la industrialización. Pero después de está, muchas dioxinas tóxicas son comúnmente encontradas en matrices ambientales en varias escalas espaciales, con altas concentraciones especialmente en trabajadores de la industria química (Kawamoto & Miyata, 2015; Tavakoly Sany et al., 2015).

La principal fuente de dioxinas para animales es la utilización de herbicidas y pesticidas, seguido de la contaminación de los suelos por el depósito de cenizas contaminadas de los procesos de incineración (fig. 9), las que se acumulan en los forrajes con los que son alimentados, debido a que son solubles en grasas, se bioacumula trepando por la cadena alimenticia. Por lo que la exposición de la población humana, en el 90% es a través de los productos de estos: lácteos, leche, pollo, conejo, cerdo, pescado y huevos, etc. (Delistraty & Stone, 2007; Kulkarni, Crespo, & Afonso, 2008; Wang et al., 2014).



**Fig. 9 Exposición a las dioxinas**

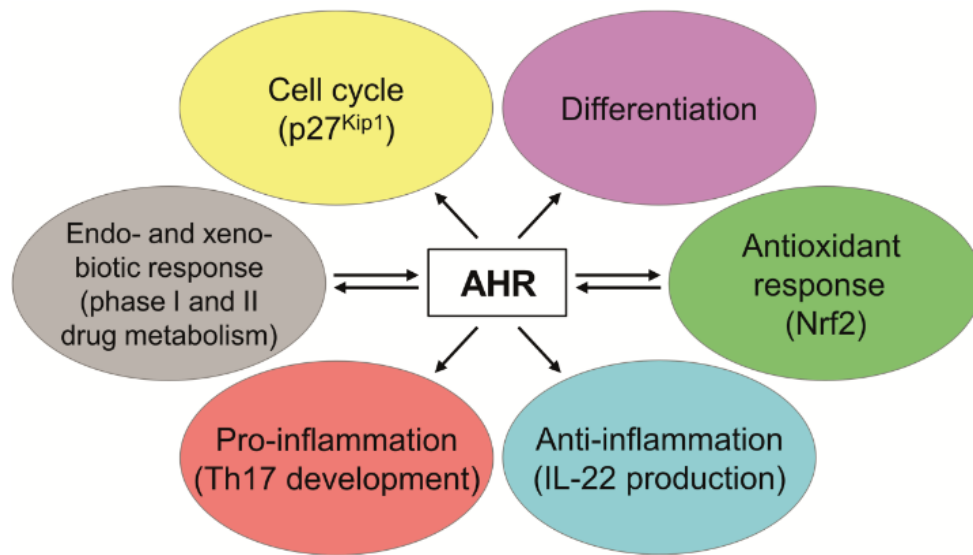
### 2.3.3.3. Metabolismo

La absorción, distribución, metabolismo y eliminación de los PCDD/Fs ha sido ampliamente revisada. La absorción en el tracto gastrointestinal de los mamíferos es efectiva en un 75% de la dosis de los congéneres clorinados inferiores, mientras que con el incremento del peso molecular, la absorción intestinal es grandemente reducida, para hepta-octa clorinados. La absorción depende del vehículo y parece que no hay diferencias entre especies. El hígado y el tejido adiposo es el principal sitio de almacenamiento para

mamíferos y muchas especies de aves. La eliminación de los metabolitos ocurre predominantemente vía biliar y en las heces, con una menor cantidad en la orina (Kodavanti, Valdez, Yang, Curras-Collazo, & Loganathan, 2017)

#### 2.3.3.4. Mecanismo de acción

Las dioxinas son responsables de una amplia variedad de efectos tóxicos y bioquímicos a través de las vías de señalización mediadas por AhR (receptor de hidrocarburo de arilo), que es un factor de transcripción ligado activado involucrado en la regulación de numerosos genes, incluyendo enzimas que juegan un rol en el metabolismo de xenobióticos, así como genes que involucran el crecimiento y diferenciación celular (fig.10) (Bock, 2018; Kodavanti et al., 2017).



Fuente: Bock, 2018

**Fig. 10 Funciones del Ahr**

El mecanismo de acción se realiza de la siguiente manera, se usará la TCDD como ejemplo (Mohsenzadeh et al., 2018; Sorg, 2014):

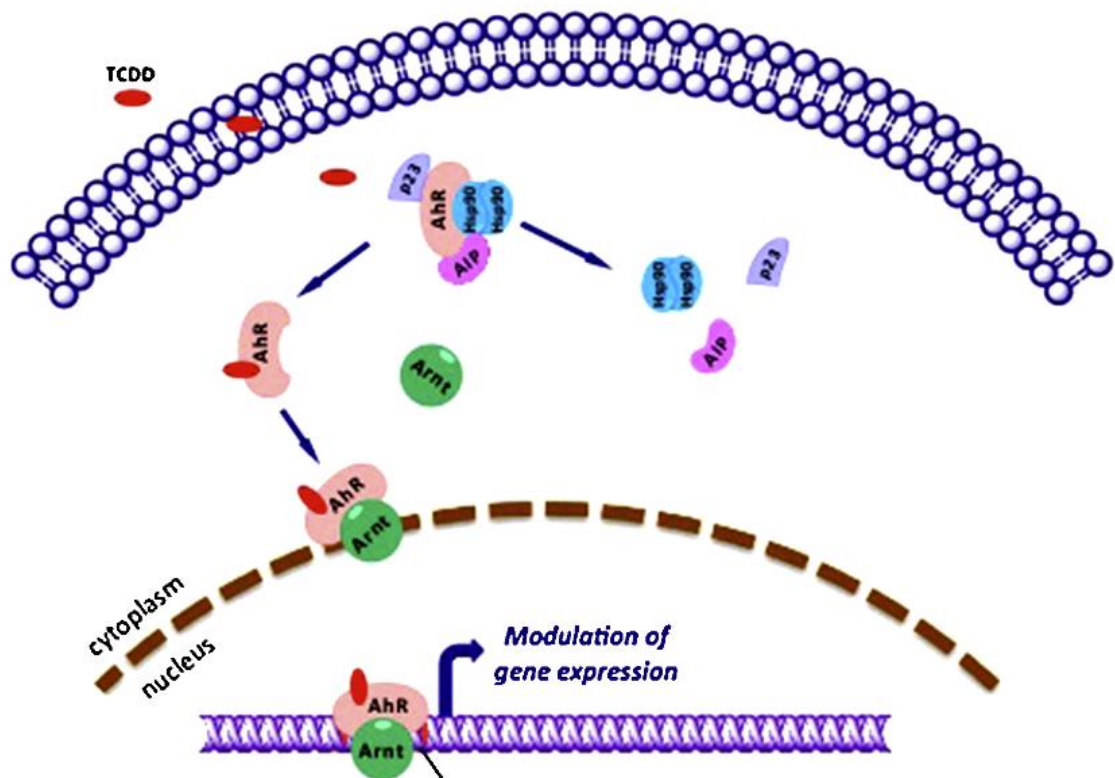
1. La dioxina se une en el citoplasma al AhR mediante la proteína de choque térmico HSP90, esta interacción HSP90/AhR tiene la función de mantener la conformación del receptor para que sea capaz de unirse al TCDD a lo largo del tiempo.

2. Tras la unión del ligando, el AhR experimenta un cambio conformacional en el dominio PASA (Per-Arnt-Sim), lo que facilita su translocación nuclear y su consiguiente dimerización con el translocador nuclear del receptor Ah (Arnt).
3. El cambio conformacional en el dominio PASA es concomitante con la disociación de la proteína HSP90 y permite que la secuencia de localización nuclear conservada en el terminal N (42 aminoácidos) estimule la translocación nuclear del complejo AhR-TCDD, que se facilita aún más con las importinas.
4. Después de la translocación de AhR en el núcleo, existe su dimerización con Arnt y este nuevo factor de transcripción heterodimérico formado se une a Xenobiotic-Responsive Elements (XRE) corriente arriba del promotor del gen CYP1A1 (que codifica el citocromo P-450 1A1) y otros genes sensibles a Ah que regulan la expresión de los genes involucrados en el metabolismo y desintoxicación de hidrocarburos aromáticos policíclicos.
5. Recientemente, estudios transcripcionales de todo el genoma han identificado numerosos genes diana de AhR que carecen del sitio de reconocimiento canónico de XRE en la región de los promotores, como el Inhibidor del Activador de Plasminógeno 1 (PAI1), llevó a los investigadores a descubrir un sitio de reconocimiento de XRE (NC-XRE) no consensual que depende de la interacción con Kruppel-Like Factor 6 (KLF6).
6. Además de las vías descritas anteriormente, se sabe que el AhR inducido por TCDD también puede estar involucrado en la regulación del ciclo celular, en las cascadas de proteína quinasa activadas por mitógeno (MAPK), de manera inmediata y temprana.
7. Inducción génica y en conversaciones cruzadas con otros receptores nucleares. Se ha informado de que el EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), activado por TCDD, desempeña un papel en la toxicidad del desarrollo y la hepatocarcinogenicidad inducida por la dioxina. Además, la señalización citosólica



proto-oncogén tirosina proteína cinasa c-Src puede ser activada por TCDD, como se demuestra en modelos animales experimentales donde su activación contribuye a la toxicidad TCDD.

- Además, el AhR, a través de la interacción con Src, activa 3 de las 15 quinasas de adhesión focal (FAK) promoviendo el agrupamiento de integrinas y la migración celular. Park et al. También informaron que TCDD interactúa con MAPK que activa la vía ERK y p38 en una línea celular de macrófagos de ratón. Además, TCDD es responsable de la promoción de la fisiología (Kanan & Samara, 2018; Kodavanti et al., 2017; Mohsenzadeh et al., 2018; Sorg, 2014; Tavakoly Sany et al., 2015) (fig. 11).



Fuente: Sorg, 2014

**Fig. 11 Mecanismo de acción de las dioxinas**

## 2.3.4 Toxicidad por dioxinas

### 2.3.4.1 Toxicidad aguda y en corto tiempo por TCDD

Los efectos característicos de la toxicidad a corto tiempo en animales son la anorexia y debilidad, el cual conduce a la muerte de 1 a 6 semanas posteriores a la administración del TCDD. Existe variación en la sensibilidad interespecies, con LD50 del conejillo de indias de 0.6 µg/kg, el hámster de 1157 µg/kg, y en los ratones, monos, conejos y ratas varía de 22 a 115 µg/kg. También se ha observado diferentes efectos en los órganos como se muestra en la tabla 4(Kapp, 2014).

**Tabla 4 Efectos agudos de la toxicidad de TCDD**

<b>Organo</b>	<b>Efecto</b>
<b>Timo</b>	Atrofia
<b>Endocrino</b>	Desbalance hormonal, síndrome de debilidad, pérdida de peso, depleción del tejido adiposo, hipoglucemia y aumento de triglicéridos y colesterol en suero.
<b>Cardiovascular</b>	Disminución del peso del corazón y cambios degenerativos
<b>Piel y anexos</b>	Hinchazón y párpados inflamados, pérdida de uñas y pérdida de vello facial con lesiones acneiformes, cloroacné (humanos)
<b>Neurológico</b>	Cambios en la personalidad, depresión, hipocondría, histeria y esquizofrenia,
<b>Gastrointestinales</b>	Náuseas, vómitos
<b>Musculo esquelético</b>	Dolores musculares

Fuente: Kapp, 2014

### 2.3.4.3. Toxicidad crónica por TCDD

Animales expuestos a dosis crónicas de dioxinas, han mostrado alterar el sistema inmune, atrofia del timo, con cambios en el hígado, bazo, nodos linfáticos y la médula ósea. La exposición crónica en la dieta, incrementa la mortalidad y la necrosis del hígado en ratas y ratones. Las exposiciones subletales agudas, intermedias o crónicas en todas las especies estudiadas son la atrofia del timo y la necrosis hepática. En cuanto a la genotoxicidad, los estudios no son conclusivos, y no existe fuerte evidencia de que el TCDD posea esta característica, en la tabla 5 se muestra las dosis para producir efectos agudos, y crónicos(Kapp, 2014).

**Tabla 5 Dosis de TCDD para los efectos agudos y crónicos.**

Vía	Efecto	Dosis ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ )	Tiempo
<b>Inhalación</b>	No efecto	--	--
<b>Oral</b>	Aguda	0.0002	$\leq 14$ s
	Intermedia	0.00002	$\geq 15$ a $\leq 364$
	Crónica	0.000 001	$> 364$

Fuente: Kapp, 2014

#### **2.3.4.2.1. Efecto de TCDD sobre Hígado**

La administración de TCDD a los 30 días en ratas, causó cambios histopatológicos en el hígado, incluido el engrosamiento de la cápsula de Glisson, vacuolización intracitoplasmática en hepatocitos, dilatación sinusoidal, congestión vascular y sinusoidal, e infiltración de células inflamatorias. Además, se aumentó los niveles de malondialdehído (MDA), estado oxidante total (TOS), alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (ALP), disminuye el glutatión reducido (GSH), superóxido dismutasa (SOD) catalasa (CAT) y estado total de antioxidantes (TAS), por lo que aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno y la lipoperoxidación por inactivación de las enzimas antioxidante (Erdemli et al., 2018; Kalaiselvan, Samuthirapandi, Govindaraju, Sheeja Malar, & Kasi, 2016; Turkez, Geyikoglu, & Yousef, 2013).

#### **2.3.4.2.2. Efecto de TCDD sobre sistema inmune**

En estudios dermatológicos en ratón, con dosis de  $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}$  el sistema inmunológico fue sensible, con disminución del peso del timo y corporal, la dosis letal afecto la inmunidad humoral. En animales neonatos y jóvenes, son más sensibles que los adultos. Los estudios epidemiológicos sugieren una asociación entre la exposición a TCDD y los trastornos de las células B, especialmente la disminución de la competencia inmune humoral y el aumento de la incidencia de cánceres derivados de las células B. Además, varios estudios que utilizan modelos in vitro revelan, que suprime la activación de células B humanas y la producción de anticuerpos de inmunoglobulina M (Kapp, 2014; J. Li, Phadnis-Moghe, Crawford, & Kaminski, 2017).

En ratones que fueron inmunizados con ovoalbumina, se observó que al exponerlos con TCDD, se suprimió la estimulación de citocinas, incluyendo IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 e IL-10 (Chen et al., 2013)

#### **2.3.4.2.3. Efecto de TCDD sobre sistema reproductor**

TCDD y los compuestos relacionados disminuyen el peso de los testículos y los órganos accesorios sexuales, disminuye la espermatogénesis y reduce la fertilidad cuando se da en adultos en dosis suficientes para reducir el peso y el apetito. Estos efectos han sido reportados en pollos, monos, ratas, cerdos y ratones. La espermatogénesis se caracteriza por pérdida de las células germinales, degeneración de los espermatoцитos y los espermatozoides maduros dentro del lumen de los túbulos seminíferos. Esto es debido a la deficiencia de andrógenos causada por la disminución de la testosterona plasmática, la dihidroesterona y la hormona luteinizante. Ratas preñadas con 15 días de gestación expuestas a una sola dosis de 0.064  $\mu\text{g}$  de TCDD/kg resulta en un decremento del 36% de la cuenta espermática epididimal, por lo que esta se considera como la prueba más sensible para los efectos del TCDD (Kodavanti et al., 2017; Sanabria et al., 2016)

El primer reporte de asociación entre la exposición crónica de TCDD fue la endometriosis en monos rhesus, además induce a toxicidad ovárica en ratas expuestas a 1  $\mu\text{g}$  de TCDD/kg en el día 8 de gestación con disminución del peso del ovario, pérdida de la fertilidad y persistencia del estrógeno vaginal. Recientes reportes sugieren que la exposición uterina, resulta en hipoxia placentaria, supresión de la proliferación y migración de las venas del cordón umbilical y las células endoteliales de la arteria, y inhibición de la angiogénesis fetoplacentaria. Además de falta de maduración en la glándula mamaria, lo que podría incrementar la susceptibilidad al cáncer mamario (Kodavanti et al., 2017; Y. Li et al., 2013; Melekoglu, Ciftci, Cetin, Basak, & Celik, 2016).

#### **2.3.4.2.4. Efecto de TCDD sobre sistema nervioso**

En humanos así como en la vida silvestre, la exposición a TCDD puede dañar las funciones cognitivas, desarrollo motor y conductas relacionadas con el género (Kodavanti et al., 2017).

Estudios realizados *in vitro* en células endoteliales de rata, astrocitos y pericitos, sugiere que la exposición a TCDD durante la formación de la barrera hematoencefálica interrumpe y altera su función, en parte por la supresión de la acción del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial, que puede contribuir a los efectos adversos de TCDD en el Sistema Nervioso Central fetal

## **II. JUSTIFICACIÓN**

Las dioxinas como el TCDD son disruptores endocrinos que se encuentran en el medio ambiente y se acumulan en la cadena alimentaria, principalmente en el tejido adiposo. Más del 90% de la exposición a estos productos es a través de los alimentos. El TCDD a dosis alta posee elevada toxicidad y pueden ocasionar problemas en la reproducción, en el sistema inmune, y sistema nervioso, además de interferir con el sistema endocrino y causar cáncer. Sin embargo existe poca información acerca de su toxicidad cuando los organismos se expone a bajas dosis de este producto. Es por ello que el propósito del proyecto es evaluar marcadores moleculares y celulares que permitan detectar su exposición a bajas dosis sobre el sistema reproductor, inmune, y nervioso empleando dos modelos biológicos ratones y conejos.

### **III. HIPÓTESIS**

La exposición oral a dosis bajas del disruptor endocrino TCDD, producirá un efecto adverso sobre los marcadores moleculares y celulares del sistema reproductor, inmune y nervioso en ratones y conejos.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de las dosis bajas de la dioxina TCDD sobre los marcadores moleculares y celulares del sistema reproductor, inmune y nervioso.

### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar el efecto de las dosis bajas de la dioxina TCDD sobre el sistema reproductor de ratones y conejos.
- Valorar el efecto de las dosis bajas de la dioxina TCDD sobre el sistema inmune de ratones y conejos.
- Determinar el efecto de las dosis bajas de la dioxina TCDD sobre el sistema nervioso de ratones y conejos.



## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

Este estudio se realizó en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma del Estado de México y los laboratorios de la Universidad Tecnológica del Valle de Toluca (UTVT) en el Estado de México, México, y cumplió con los estándares éticos establecidos por la institución. Los signos clínicos se determinaron con todos los animales.

### **5.1. Animales**

#### **5.1.1. Conejos**

Treinta conejos blancos de Nueva Zelanda adultos y sexualmente maduros de sexo masculino con un peso de  $3008.2 \pm 13.4\text{g}$ . se obtuvieron del laboratorio de Investigación Animal, Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma del Estado de México, El cerillo piedras blancas, Toluca, Estado de México, México. Se alimentaron con dieta estándar de pellets (88% de materia seca, 9% de ceniza, 16% de proteína cruda, 15% de fibra cruda y 2600 kcal / kg de energía metabolizable) y agua del grifo a voluntad, y se alojaron en jaulas individuales estándar con temperatura controlada ( $22^\circ\text{C}$ ), y humedad 50 - 60% y 12 h ciclos luz / oscuridad. Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices del Comité Institucional de Ética Animal.

#### **5.1.2 Ratones**

Treinta ratones adultos de ratón celular modelo CD1 con 16 semanas de edad y un peso corporal de  $35.850 \pm 0.453\text{g}$ . Al llegar al laboratorio, los animales se mantuvieron en camas de plexiglás de 42 cm x 27 cm x 14 cm con una cubierta de metal y aserrín (Scobis 1, Mucedola, Settimio Milanese) como lecho. Se mantuvieron bajo temperatura controlada ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y humedad relativa ( $55 \pm 5\%$ ). Los ratones fueron alimentados con una dieta ordinaria de laboratorio y tuvieron libre acceso a alimentos y agua *ad libitum*. Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz / oscuridad de 12 h. Los animales fueron manejados de acuerdo con las pautas nacionales aprobadas para el cuidado de los animales. El período de

adaptación fue 2 semanas antes de que comience el experimento (Carbone & Austin, 2016; Hawkins et al., 2011).

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (National Research Council, 1996), la base de las pautas de ética animal del Comité de ética institucional de animales (protocolo no: 2011/186) y la base de Canadá Directrices del Consejo de Cuidado de Animales.

## 5.2. Diseño experimental

Los animales fueron asignados aleatoriamente a cinco grupos experimentales de seis animales cada uno para ratones y conejos:

**En el grupo I (CN):** control negativo, se alimentaron seis animales Se proporcionaron dieta y agua en gránulos estándar *ad libitum* (sin aditivos).

**En el grupo II (CV):** control positivo, seis animales fueron administrados con aceite de maíz, se proporcionaron la misma alimentación y agua.

**En el grupo III (T-DB):** dosis baja de TCDD (0.375 µg / kg), con la misma alimentación y agua se administraron.

**En el grupo IV (T-DM):** se proporcionaron dosis medianas de TCDD (0.75 µg / kg), con el mismo alimento y agua .

**En el grupo V (T-DA):** se administró una dosis alta de TCDD (1.5 µg / kg), con la misma alimentación y agua .

Todos los animales se pesaron y se controlaron durante los 10 días de administración oral. Los animales fueron observados todos los días por signos clínicos. Después de 10 días de exposición a TCDD a través de sonda nasogástrica, los animales fueron anestesiados con una combinación de clorhidrato de ketamina (90 mg / kg) y clorhidrato de xilacina (10 mg / kg) administrados por vía intraperitoneal, después de la muerte por frotis de diafragma.

El hígado, cerebro, testículos y el epidídimo pesaron y se registraron. Los espermatozoides de la cauda epidídimo se usaron para el análisis espermático. Además, se recolectaron muestras e tomaron muestras de Hígado, cerebro, testículos y epididimo y se fijaron en solución salina con formal al 10% para el examen histológico. Una parte de las muestras de esperma se disolvió en PBS y se usó para el análisis en citometría de flujo.

### **5.3. Preparación de TCDD**

Dioxina, 2,3,7,8 TCDD (48599) Lote: LC 22998V, en su forma más pura, 10 µg / ml en tolueno, patrón analítico (Supelco), se obtuvo de Sigma Aldrich Chemicals, Toluca, Estado de México. Dioxin, 2,3,7,8 TCDD se disolvió en aceite de maíz y se almacenó en la oscuridad a 4° C hasta su uso.

### **5.4. Análisis espermático**

#### **5.4.1. Recuento de esperma**

Se recogieron espermatozoides de la secreción epididimal del epidídimo derecho de la cola. La secreción del epidídimo cauda se colocó inmediatamente en 50 µl de solución salina de fosfato calentada a 37 ° C y se colocó en placa de Petri. Los espermatozoides se contaron en doble rodillo Neubauer y la concentración total se estimó de acuerdo con la fórmula:

$$A = \text{contar } x * 5$$

Dónde: Recuento x = recuento medio obtenido de los cuadrados laterales Neubauer.

#### **5.4.2. Vitalidad de la esperma**

El frotis de esperma se tiñó mediante el uso de la técnica de tinción eosine-negrosin. Solo se consideraron los espermatozoides con cabeza y cola. Para determinar la vitalidad, se contaron 200 espermatozoides con un microscopio óptico. Los datos se expresaron en porcentaje de espermatozoides vivos (incolores) y espermatozoides muertos (pigmentados) (Björndahl, Söderlund, & Kvist, 2003).

### **5.4.3. Morfología de la esperma**

Evaluación de la morfología espermática. Los epidídimos se aislaron y se limpiaron del tejido adiposo y la sangre circundantes. Al triturar la cola de los epidídimos en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se liberaron células de esperma, la solución se filtró y se añadió eosina al 0,5%. Para cada hombre, se examinó la morfología de 200 células espermáticas. Los criterios de evaluación utilizaron 4 categorías morfológicas para las células espermáticas. Se evaluó la incidencia de anomalías en la cabeza, el cuello, la mitad de la pieza y la cola y, al menos, Se observaron 200 células de esperma con un aumento de 1000x (Wyrobek & Bruce, 1975)

### **5.4.4. Movilidad de la esperma**

Se colocó una gota de la suspensión espermática en un portaobjetos y se observó inmediatamente con un aumento de 10 aumentos del microscopio. Se determinaron tres tipos de espermatozoides con diferentes tipos de motilidad:

- Normal (móvil de esperma de forma lineal y rápida).
- Móvil (in situ) (móvil de esperma en el mismo lugar).
- Inmóvil (sin movilidad)(Chapin et al., 1992).

## **5.5. Ensayo de citometría de flujo**

### **5.5.1. Ensayo de Annexin V / PI con fluoresceína (FITC)**

La muestra de esperma se centrifugó (500 xg, durante 10 minutos a 25 ° C). El sedimento se resuspendió en 1X tampón de unión a anexina. Se añadieron 5 µL de FITC AnnexinV y 1 µL de la solución de trabajo PI de 100 µg / mL a cada 100 µL de suspensión celular y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después del período de incubación, se añadieron 400 µL de tampón de unión a anexina 1X a los tubos, se mezclaron suavemente y las muestras se guardaron en hielo. Tan pronto como sea posible, las células

teñidas se analizaron mediante citometría de flujo y la emisión de fluorescencia se midió a 530 nm y > 575 nm. La evaluación de citometría de flujo se realizó en 30 min. En este estudio, se evaluó la citotoxicidad mediante la observación de la integridad de la membrana del espermatozoide con 7AAD (7-Aminoactinomicina D). FITC AnnexinV/IP-Kit de apoptosis de células muertas (número de catálogo V13242, Invitrogen) se usó para detectar la translocación de PPS y el tipo de muerte celular en el espermatozoide de ratones tratados con TCDD.

### **5.5.2. Análisis de Inmunofenotipificación y citotoxicidad empleando Citometria de Flujo.**

Los leucocitos hepáticos se aislaron de ratones y se prepararon para el análisis de citometría de flujo de la siguiente manera. Los hígados de ratón se lavaron con PBS sin calcio y magnesio. Los hígados se colocaron en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal al 5% (FBS) y penicilina/estreptomicina al 1% y luego pasaron a través de una malla de nylon, y la suspensión celular resultante se centrifugó a una velocidad de 50 xg durante 5 minutos a 4° DO. Se eliminó el sobrenadante y se descartaron los hepatocitos granulados. El sobrenadante se centrifugó a 450 xg durante 5 minutos para sedimentar leucocitos. El sedimento se incubó luego durante 4 min con tampón de lisis de glóbulos rojos (BioLegend, San Diego, CA) seguido de 2 lavados con PBS que contenía FBS al 5%. Lympholyte-M (Cedar Lane) se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante para purificar aún más los leucocitos. Para los experimentos de estimulación ex vivo, los leucocitos hepáticos se cultivaron en medio RPMI suplementado con FBS al 5% y penicilina / estreptomicina al 1% con o sin 7,5 µg / ml de Con A durante 5 h. En todos los demás casos, los leucocitos hepáticos se tiñeron y se prepararon inmediatamente para el análisis de citometría de flujo.

El porcentaje de formación de células de citotoxicidad y apoptosis se determinó mediante la evaluación de 7-Amino-actinomicina D (7AAD) y preparaciones teñidas con Annexin V/IP de linfocitos tratados con la sustancia química dosificada (2,3,7,8 TCDD) a 1,5, 0,75 y 0,375. µg / ml en 10 días. La dioxina se disolvió en aceite de maíz. Los linfocitos se tiñeron

con CD3PERCEP, CD4FITC, CD8FITC y CD19FITC, anticuerpos monoclonales marcados de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La citometría de flujo se realizó usando el citómetro ACCURI C6 (Becton Dickinson, México). A partir de entonces, los datos de FACS se analizaron con Accuri C6 y el software FSC Express <https://www.denovosoftware.com/site/Flow-RUO-Overview.shtml>.

### **5.6. Niveles séricos de aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT)**

Los niveles séricos de AST y ALT se determinaron usando, espectrofotométrico, Analizador Semiautomático Biosystems BTS-350, de acuerdo con los protocolos del fabricante. Los resultados se expresaron como U / L.y las actividades de los niveles de ALT (GPT), AST (GOT) se evaluaron en suero sanguíneo.

### **5.7. Análisis histopatológico**

Las muestras de tejido hepático, bazo, testículos, epidídimo y cerebro se fijaron en formalina tamponada con fosfato al 10% y se incluyeron en parafina. Luego, se cortaron secciones de 2 mm de los bloques de parafina y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H y E), para el examen con microscopio óptico a ciegas. Se realizó un análisis histopatológico en todos los animales para detectar alteraciones.

### **5.8. Análisis estadístico**

Los parámetros cualitativos se expresaron en frecuencias y porcentajes, los cuantitativos se realizaron comparación de media y desviación estándar. Los resultados fueron analizados con los paquetes estadísticos Statistica 6.0 y Minitab14, inicialmente se realizó la prueba de Kolmo-grov-Smirnov para comprobar la distribución normal y las comparaciones mediante la prueba t de Student y ANOVA. Las diferencias se consideraron significativas si el valor de  $p \leq 0,05$ .

## VI. RESULTADOS

### CAPITULO 1

#### **Sperm quality in mouse after exposure to low doses of TCDD**

**Heba Yehia Anwar Elsayed<sup>1,2</sup>, Esvieta Tenorio Borroto<sup>2\*</sup>, Alberto Barbabosa Pliego<sup>2</sup>, Jorge Acosta Dibarrat<sup>2</sup>, Fabiola Rivera Ramirez<sup>3</sup>, Juan Carlos Vázquez Chagoyán<sup>2</sup>, Nazario Pescador Salas<sup>3</sup>, Hector Diaz-Albiter<sup>4</sup>,**

<sup>1</sup> Poultry production department, Faculty of Agriculture, Ain shams university, Cairo, Egypt. Zip code: 11241

<sup>2</sup> Centro de Investigación y Estudios Avanzados de Salud Animal, Universidad Autónoma del Estado de México.

<sup>3</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México

<sup>4</sup> Center for Molecular Parasitology, University of Glasgow, University Place Glasgow G12 8TA, United Kingdom.

\*Corresponding author: Esvieta Tenorio Borroto, e-mail:esvieta@gmail.com

#### **Abstract**

In the last decade, the harmful use of dioxin has been demonstrated in human health and in the whole environment. It is well known among scientists as 2, 3, 7, 8-tetrachloro dibenzo-p-dioxin (TCDD), is an environmental pollutant that causes endocrine disruption, which causes male reproductive toxicity. The objective of the present study was to evaluate the toxicity effect of low doses of TCDD in male CD1 mice. Three concentrations of TCDD (0.375, 0.75, 1.5 mg / kg) were analyzed and the effects on spermatozoa were evaluated 10 days after oral administration of the product. As bioindicators of TCDD toxicity, an exhaustive analysis of several spermatic parameters including motility, vitality, count, morphology and viability, flow cytometry was used to determine the affected sperm population by cytotoxicity and apoptosis. In addition, a morphometric analysis of testicles was performed. The results show that the body weight of the treated animals was reduced in medium and high doses (0.75, 1.5 mg / kg) with respect to the control groups. In the groups

treated with TCDD, the abnormal sperm of the head increased by 52.5% more than the control group. Significant differences in apoptosis between the negative control and vehicle control, including the median dose (0.75 mg / kg). It is concluded that at these low doses there was an impact on the quality of the mouse sperm. Adding an effect on apoptosis and cytotoxicity of sperm exposed to these doses of TCDD.

**Keywords:** TCDD, Mice, Sperm parameters, Endocrine disruptor, Flow cytometry, Morphometry assay

## 1. Introduction

Organochlorine is ubiquitous in the environment. They have low volatility and a slow rate of biotransformation, are highly lipid soluble and are resistant to degradation (Chang, 2018). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) is a harmful environmental pollutant that belongs to the group of organochlorines and is considered the most persistent compound in the dioxin arm. The TCDD is a persistent environmental contaminant that has been shown to be toxic to sensitive rodent and many animal species (Alsharif e Hassoun, 2004; Hassoun *et al.*, 2006; Tairova *et al.*, 2017) It is formed in the manufacture of chlorinated hydrocarbons, incineration processes, paper and pulp bleaching and emissions from steel foundries and motor vehicles (Latchoumycandane *et al.*, 2003). Recently, it has received much attention worldwide because of its cytotoxic, haematotoxic, immunotoxic and genotoxic properties (Chen *et al.*, 2013; Man *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2018).TCDD is considered an endocrine disruptor. Endocrine disruptors are the synthetic chemicals of our environment that, at certain doses, are capable of interfering hormone system. Exposure to endocrine-disrupting chemicals (EDCs) is reported to associate with developmental, systemic reproductive, neurological, and immune disorders (Cheshenko *et al.*, 2008; Kajta e Wójtowicz, 2013; Schug *et al.*, 2015) The endocrine disruptor 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) has been demonstrated to disrupt hormone signalling,



reduce fertility, interfere with embryo development and cause spontaneous miscarriage in humans (Magre *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2016).

TCDD is a frequent contaminant of widely used herbicides, due to its lipophilic properties, slow metabolism and excretion, TCDD readily accumulates in the body (Enan *et al.*, 1998). TCDD has been found to elicit toxicity by binding to cytosolic aryl hydrocarbon receptor, enforcing the expression of enzymes like cytochrome P4501A1, which is involved in the production of reactive oxygen species (ROS). (Rifkind, 2006; Androutsopoulos *et al.*, 2009). The major source of human exposure to dioxins is through the diet (Porterfield e Tahmassebi, 2009), almost exclusively through the consumption of animal foods including meat, fish and dairy products.

Dioxins are persistent organic pollutants interfering with endocrine systems and can cause reproductive and developmental disorders in rats (Magre *et al.*, 2012). The dysfunction of the reproductive system and infertility are the most important adverse effects of pesticides (Mehrpour *et al.*, 2014; Sengupta e Banerjee, 2014; Zhu *et al.*, 2015). Male reproductive tissues have been found to be very sensitive targets of this dioxin. Exposure to TCDD of rats and/or rabbits, even in trace quantities, has been reported to cause low sperm counts and decreased fertility (Gray *et al.*, 2001). Indeed, strengths of the animal literature are the demonstration of adverse effects on cauda epididymal sperm counts in multiple rodent species.

In vivo studies at doses (0.03, 0.1, 0.3, or 1 mg / kg) indicate that exposure to TCDD causes a variety of adverse effects on the male reproductive system (Hwang *et al.*, 2004; Simanainen *et al.*, 2004; Beytur *et al.*, 2012), that because TCDD causes inhibition of spermatogenesis, alteration in testicular morphology and decreased testicular and accessory sex organ weight (Altintas *et al.*, 2015)

Exposure to TCDD in male mice rats and rabbits, promotes, decreased sperm concentration, alterations in motility, provoked alterations in sperm morphology, vitality, viability, diminution in serum testosterone levels and sperm transit time in the cauda

epididymis (Yin *et al.*, 2012). TCDD exposure decrease mouse sperm quality and fertility in adult male offspring and these effects persist into the next generation (Sanabria *et al.*, 2016).

TCDD caused toxic effects in organs by inducing oxidative stress and it is one of the most important causes of pesticide-induced oxidative stress. Organochlorine insecticides are also capable of inducing programmed cell death (apoptosis) by multifunctional pathways (Sanabria *et al.*, 2016). Oxidative stress affects quite a variety of cell functions. When cells are exposed to oxidative stress, they often die by apoptosis or necrosis (Mor e Ozmen, 2003; Al-Maghrebi *et al.*, 2011). In the last 10 years, increasing attention has turned to environmental chemicals, with either agricultural or industrial food packaging or consumer applications, which have been shown to possess endocrine disrupting properties that pose a potential threat to wildlife and humans (Mckinlay *et al.*, 2008).

In Mexico, 27 million people use wood as an energy source, while 19 million use it as a fuel for indoor cooking; a daily consumption of 2 kg of wood per person has been calculated (Torres-Dosal *et al.*, 2008).

On the other hand numerous studies have been made on contamination of water, food, and soil with TCDD in Mexico and results showed accumulation of TCDD in water samples, soil, air and in a trace amount in drinking water (García-Nieto *et al.*, 2010). Home-heating systems, exhaust from cars and cigarette smoke have been found to contain trace quantities of this dioxin (Kasai *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007; Sarill *et al.*, 2015). Lifestyle in Mexico leads to a high risk of TCDD effects on sperm quality in animals and humans.

The aim of the present study is to investigate the effects of low dose TCDD exposure in the male genital tract, with emphasis on sperm quality in CD1 male mice using cytology, flow cytometry and testis morphometric analyses.

## **2. Material and Method**

This study was realized in the Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) of the

Universidad Autónoma del Estado de Mexico (UAEMex) and the laboratories of Universidad Tecnológica del Valle de Toluca (UTVT) in the Estado of Mexico, Mexico, and complied with the ethical standards set by the institution. The clinical signs were determined with all animals.

## **2.1. Animals**

### **2.1.1 Mouse**

Thirty Adult male mice model CD1 with 16 weeks old and a body weight of  $35.850 \pm 0.453$ g. Upon arrival at the laboratory, animals were maintained in 42cm×27cm×14cm Plexiglas cages with a metal top and sawdust (Scobis 1, Mucedola, Settimio Milanese) as bedding. They were kept under controlled temperature ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and relative humidity ( $55 \pm 5\%$ ). The mice were fed an ordinary laboratory diet and had free access to food and water *ad libitum*. The animals were kept on a 12 h light–dark cycle. The animals were handled according to the approved national guidelines for animal care. The adaptation period was 2 weeks before the experiment starts. All experiments were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Hawkins *et al.*, 2011; Carbone e Austin, 2016), the basis of animal ethics guidelines of the Institutional Animals Ethics Committee (protocol no: 2011/186) and the basis of Canadian Council on Animal Care guidelines.

## **2.2. Experimental design**

The animals were randomly assigned to five experimental groups of six animals each for mice

**In group I:** Negative control (NC), six animals were fed a standard pellet diet and water were provided *ad libitum* (without additives).

**In group II:** Vehicle control (VC), six animals were administrated corn oil, same feed and water were provided *ad libitum*.

**In group III:** Low dose (TLow) of TCDD ( $0.375\mu\text{g}/\text{kg}$ ), same feed and water were provided *ad libitum*.

**In group IV:** a Medial dose (TMedian) of TCDD (0.75µg/ kg), same feed and water were provided *ad libitum*.

**In group V:** High dose (THigh) of TCDD (1.5µg/ kg), same feed and water were provided *ad libitum*.

All animals were weighed and monitored during the 10 days of oral administration. The animals were observed every day for clinical signs. After 10 days of exposure to TCDD through the gavage oral, the animals were anesthetized with a combination of ketamine chlororhydrate (90 mg/kg) and xylazine chlorohydrate (10 mg/kg) administrated intraperitoneally, following by euthanize by cervical dislocation. Testes samples were taken and fixed in 10% formal saline for histological examination and morphometric analysis. A part of the sperm samples was dissolved in PBS and used for the analysis in flow cytometry.

### **2.3. Preparation of TCDD**

The Dioxin, 2,3,7,8 TCDD (48599) Lot: LC 22998V, in its purest form, 10 µg/mL in toluene, analytical standard (Supelco), was obtained from Sigma-Aldrich Chemicals 3050 Spruce Street Saint Louis Mo 63103 USA. The Dioxin, 2,3,7,8 TCDD was dissolved in corn oil and stored in the dark at 4°C until use.

### **2.4. Body weight and weight of some reproductive organs**

Testes and epididymis were weighed. The spermatozoids from cauda epididymis were used for sperm counts, flow cytometry, and testis for morphometric analysis.

### **2.5. Sperm physiological parameters**

Sperm was collected from the epididymal secretion of the right epididymis cauda. The secretion of the epididymis cauda was immediately placed in 50 µl phosphate saline solutions heated at 37 °C and placed in a Petri dish. The sperm was counted in double Neubauer rolling and the total concentration was estimated. The sperm smear was stained by use of eosine-negrosin staining technique (Björndahl *et al.*, 2003). Only sperm with head and tail was considered. To determine the vitality 200 spermatozoids were counted by a light microscope. The data were expressed in percentage of live sperm (colorless) and the

dead sperm (pigmented). The epididymis was isolated and cleaned of the surrounding adipose tissue and blood. By mincing the cauda of the epididymis in phosphate buffered saline (PBS), sperm cells were released, the solution was filtrated, and 0.5% eosine was added. For each male, the morphology of 200 sperm cells was examined. Evaluation criteria used 4 morphological categories for sperm cells according to (Wyrobek e Bruce, 1975).

The incidence of abnormalities in the head, neck/mid-piece and tail were assessed and at least 200 sperm cells were observed under 1000x magnification. A drop of the spermatic suspension was placed on a slide and observed immediately with microscope 10× magnification. Three types of spermatozoids were determinate with different types of motility: (Chapin *et al.*, 1992).

- Normal (sperm mobile in a linear way and fast).
- Mobile (*In-situ*) (sperm mobile in the same place).
- Immobile (without mobility).

## **2.6. Cytotoxicity and Apoptosis Assay**

Sperm sample was centrifuged (500 ×g, for 10 min at 25°C). The pellet was suspended in 1X Annexin-binding buffer. 5 µL of FITC AnnexinV and 1 µL of the 100 µg/mL PI working solution were added to each 100 µL of cell suspension and incubated at room temperature for 15 minutes. After the incubation period, 400 µL of 1X Annexin-binding buffer was added to the tubes, mixed gently. As soon as possible, the stained cells were analyzed by flow cytometry and the fluorescence emission was measured at 530 nm and > 575 nm. Flow cytometry measures cytotoxicity and apoptosis by phosphatidylserine (PPS) through plasma membranes. In this study, cytotoxicity was evaluated by observing the integrity of the sperm membrane with 7AAD ((7-Aminoactinomycin D). FITC AnnexinV / Dead Cell Apoptosis Kit (Catalog No. V13242, Invitrogen) was used to detect the translocation of PPS and type of cell death in the sperm of mice treated with TCDD.

### **2.7. Morphometric analysis of testis**

For quantitative assessment, the mean diameter of seminiferous tubule (DST) and thickness of the epithelium of the seminiferous tubules (EST) (from the basement membrane to lumen) in 10 tubules per testicular section and 30 sections per group were measured at  $\times 10$  magnifications by using the calibrated OLYSIA software (Soft Imaging System, version 3.2, Japan). ST that were round or close to round were randomly selected for measurement. All samples were measured by a histologist in a blind fashion.

### **2.8. Statistical Analysis**

The data were processed with Statistical software package InfoStat (<http://www.infostat.com.ar>). Means (M), standard deviations (SE) were calculated. The significance of differences was assessed according to Student's t test. The difference was regarded as significant at  $p < 0.05$

## **3. Results**

### **3.1. Clinical signs and general effects**

There are differences in body weight of the animals were observed during the experiment between the treated groups after 10 days of oral administration of TCDD (Table 1). Specifically, there is a difference between the Negative Control (NC) group and the low and medium dose

Moreover, neither mortality nor clinical signs of over toxicity were observed in mice. All surviving mice showed no differences in reproductive organ weight. The mean of body weight of the treated animals was transiently reduced on dose (Table 1) with respect to the control groups.

### **3.2. Sperm physiological parameters**

The results showed remarkable differences in sperm count (concentrate), the percentage of dead sperm, normal morphology, sperm abnormality, and sperm motility between control and treated groups (Table 2). The percentages of sperm count decreased significantly ( $p < 0.05$ ) in 20.6% in the THigh group mice treated with TCDD compared to the NC. In

addition, the percentage of normal sperm in the group of mice decreased significantly by 19% between the TMedian and the Negative control.

Sperm malformation was increased in treated groups compared with Negative control (Table 2). Specifically the abnormal head sperm was increased by 50% more than the control group. In addition, abnormal head and abnormal tail was remarkable in treated groups in comparison with Negative control. However you cannot talk about teratospermia cannot exceed 96%.

Furthermore, as far as sperm motility is concerned, three categories were considered, namely, progressive, non-progressive and immotile sperm. TCDD exposure induced significant changes in sperm motility after 10 days of administration (Table 2), with a significant decrease of 55.4 in the percentage of progressive sperm was found in mice exposed to 1.5 µg /kg BW and, simultaneously, an increase in the percentage of immotile sperm in the same group (43.35%). However, the parameter spermatozoa motility, morphology, and vitality were significantly affected by the TCDD doses tested (Table 2). It is concluded that these doses of TCDD administered during 10 days affect the quality of the sperm of the mice.

### **3.3. Cytotoxicity and Apoptosis assays for Flow cytometry.**

The results obtained using flow cytometry are shown in Table 3. The results are shown of the cytotoxicity and apoptosis in spermatozoa of mice caused by the different doses of TCDD administered orally for 10 days. In Table 3 shows the evaluation of different parameters such as damage to the integrity of the sperm membrane (7AAD), apoptosis (Annexin V); complexity (SSC) and size (FSC) of the sperm. In the sperm size (FSC) parameter, were observed significant differences between Medium Fluorescence Intensity (MIF) the negative control and the administered doses (0.375; 0.75; 1.5 mg/Kg), showing greater involvement in the spermatozoa exposed to high doses. On the other hand, the complexity parameter (SSC) is affected by spermatozoa exposed to THigh of TCDD and VC. Figure 1 shows the mouse sperm populations administered with the THigh (1.5

mg/Kg) of TCDD. In Fig. 1A, B and C the size and complexity of the total sperm population are observed with values of 94.5; 96.6 and 98%. In these figures, the diversity in size and complexity of the spermatozoa is significant. Figure 1A shows that 23.3% of sperm apoptotic were marked with Annexin V. Figure 1B shows that 16.8% of sperm dead were marked with 7AAD. Figure 1C shows that 33.9% of sperm dead were marked with 7AAD/Annexin V. This is corroborated in Table 3, where significant differences for  $p \leq 0.05$  are observed between the MIF of the negative control group and the high dose (THigh) group (1.5 mg / Kg). These results show damage in the integrity of the membrane and apoptosis of the sperm population exposed to THigh of TCDD.

### **3.4. Morphometry assays**

Morphometric findings are presented in Figure 3. Our study shows significant differences in the mean diameter of seminiferous tubule (DST) for  $p \leq 0.05$ . Particularly between the high dose (THigh), the medium dose (TMedian) groups and Negative control (NC) groups. On the other hand, significant differences for  $p \leq 0.05$  were found between the epithelium of the seminiferous tubules (EST) of the low dose (TLow) and the NC group. In addition, significant differences were shown for  $p \leq 0.05$  between the EST of the TMedian group and THigh. There were also differences between the epithelium of the seminiferous tubules (EST) of the group TLow and the VC group. In general there is a decrease in the diameter of seminiferous tubule (DST) when there is an increase in the dose administered. The epithelium of the seminiferous tubules (EST) does not show the same behavior where only decrease is observed in the TMedian group. In addition, Figure 4 shows the histopathology of testis. The results show the correspondence with the morphometric analysis. The differences between the negative control and the treatments with TCDD are shown.

## **4. Discussion**

Exposure to toxicants present in the environment, especially the so-called endocrine-disrupting chemicals (EDCs), has been associated with decreased sperm quality and increased anomalies in male reproductive organs over the past decades (Rehman *et al.*,



2018). Both human and animal populations are continuously exposed to ubiquitous synthetic and natural-occurring EDCs through diet, dermal contact and/or inhalation, therefore potentially compromising male reproductive health (Tavares *et al.*, 2016). However, the more common exposures are due to a broad mix of chemicals and contaminants present at low-concentrations (Rather *et al.*, 2017). In this study, the effect of low doses (0.375; 0.75; 1.5 mg/Kg) of TCDD on the quality of sperm was analysed. On the other side, the effect of this endocrine disruptor on apoptosis and the death of spermatozoa in mice was analysed using flow cytometry (FCM). Finally, the morphometric of the seminiferous tubules was performed. These animals were exposed for 10 days to three low dose levels of TCDD. During and at the end of our study, the animals were in general good condition except that the fall in body weight gain in the high-dose-(TCDD)-treated groups was noticed. The loss of body weight has also been reported in mice, rabbits, and dogs (Fisher *et al.*, 2005) and that was associated with the reduction of food intake. This coincides with the chronic studies conducted in Wistar rats administered orally with TCDD in low dose 28, 93, and 530 ng of TCDD / kg in the diet (Bell *et al.*, 2007). The doses of our study were a little higher and administered orally by gavage, therefore the reduction in body weight was much higher than in the study conducted in 2007 where the exposure to TCDD was through breast milk. On the other hand, the test that the weight of the testicles and the epididymis of the groups treated with TCDD does not differ significantly from the weight of the Negative control (NC). Similar to work published in 2004 where TCDD was administered to 3 types of rats susceptible to this product; there was also no decrease in the weight of the testicles and epididymis in the highest dose of 1000 mg / kg (Simanainen *et al.*, 2004). The TCDD-treated animals showed reduced epididymis sperm number and sperm motility similar to the study carried out by to studies by other authors (Mably *et al.*, 1992; Foster *et al.*, 2011). These animals also suffered impaired spermatocytogenesis with a concomitant drop in the rate and efficiency of spermatozoa production and the viability of spermatozoa already in storage, similar observations have been reported (Ateşşahin *et al.*, 2010; Sönmez *et al.*, 2011). These reports coincide with our results since alterations in morphology and sperm motility in mice were observed at low doses 0.375; 0.75; 1.5 mg/Kg

administered for 10 days. In recent years many environmental chemicals have been associated with decreased numbers of sperm stored in the cauda epididymis, with little or no reduction in sperm production. This suggests that the epididymis is the functional target of these toxic substances and that the transit of sperm through the epididymis is accelerated by these exposures (Roy *et al.*, 2015; Ana Paula Binato De Souza, 2017; Cheng *et al.*, 2018). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) is the most toxic environmental pollutant in animal studies and with high potential to activate Ahr (Denison e Nagy, 2003). Of documented reproductive / developmental effects in the literature, spermatogenesis is considered the most sensitive adverse effect of TCDD, this product is considered a dangerous endocrine disruptor (EDCs). EDCs have been defined as “exogenous substances that interfere with the production, releasing, transport, metabolism or elimination of the natural hormones, which are responsible for the maintenance or regulation of development processes” (Zoeller *et al.*, 2012). Examples of the environmental endocrine disruptors that have been targeted for adverse effects on the reproductive systems in humans and animals are pesticides (e.g., methoxychlor), fungicides (e.g., vinclozolin), a range of xenoestrogens, and certain phthalates. In additions most of these chemicals are ubiquitous in the environment, and both humans and animals are exposed to them daily. Many of these compounds and endocrine disruptors can be metabolized into both estrogenic and antiandrogenic activities (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). Environmental chemicals with estrogenic activity are probably the most well studied, however, chemicals with an antiestrogen, androgen, antiandrogen, progesterone, or thyroid-like activity have also been identified (Aneck-Hahn *et al.*, 2018; Liu, J. *et al.*, 2018; Liu, Y. Y. *et al.*, 2018). Despite the establishment of the sources of these critical substances, there is still a need to identify their mechanisms of action and effects of exposure.

Our observation is consistent with that of (Ozmen and Mor, 2012) despite the different routes of administration employed in both studies. The tendency for these parameters to decrease indicates that the androgen-secreting capacity in the TCDD treated animals was affected. It is known that a decrease in sperm count with an associated increase in the percentage of abnormal sperms and that is also associated with infertility in males (Lin *et*

*al.*, 2001). TCDD increased the number of intersex frogs, decreased the number of primary spermatogonial nests, and impaired normal gonadal development (Bruner-Tran *et al.*, 2014; Bruner-Tran *et al.*, 2016). In this study, the concentration of sperm cells was affected by exposure to TCDD in all groups of the experimental period. This effect could be expected since this element in this particular oxidation state could affect spermatogenesis and thus altering spermatozoa production, as has been reported by (Agarwal e Allamaneni, 2011; Agarwal *et al.*, 2014). The results of our study show that even at low doses the TCDD affects the quality of sperm.

In this work for the analysis of the integrity of the membrane and apoptosis of the spermatozoa exposed to TCDD, flow cytometry was used. Numerous protocols have been developed in the last decade allowing the simultaneous assessment of multiple parameters in the spermatozoa (Gillan *et al.*, 2005; Hossain *et al.*, 2011; Ayhan *et al.*, 2016). Developments in flow cytometry have allowed for an enhanced understanding of the biology of spermatozoa, particularly in the fields of clinical spermatology and sperm biotechnology (Barrier Battut *et al.*, 2016). In the present study, the use of the combination of Annexin V/IP and 7AAD to detect dead and apoptotic live spermatozoa in fresh samples obtained from mice exposed for 10 days at doses (0.375;0.75; 1.5 mg/Kg) of TCCD. Other reports in the literature have used markers such as Hoechst-and PI-dye stained testicular cell suspension (Gaysinskaya *et al.*, 2014; Gaysinskaya e Bortvin, 2015). Propidium iodide (PI), which is the most commonly used dye to quantitatively assess DNA content, has been extensively used to identify testicular cell populations. 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) is another intercalating dye that does not cross intact cell membranes. Its stainability increases approximately 6-fold after HCl treatment, which lowers the binding of histone proteins to DNA in tetraploid, diploid, and round spermatid cells, thus augmenting accessibility of the dye to DNA (Zembruski *et al.*, 2012). Consequently, 7-AAD shows differences in chromatin condensation as cells progress through meiosis more clearly than PI staining. 7AAD, like PI, does not penetrate intact cell membranes and therefore, its application is restricted to permeabilized cells, fixed cells or cells with damaged membranes. (Wlodkovic *et al.*, 2011)

The sperm plasma membrane is an important structure that functions to protect sperm against extracellular injuries and to adapt the spermatozoon itself to a variety of physiological and environmental challenges, including capacitation and acrosomal exocytosis at the time of fertilization (Tapia *et al.*, 2012). On the other hand changes in sperm transit through the excurrent duct system or increased removal of damaged sperm from the epididymis could provide reasonable alternative explanations to TCDD effects on spermatogenesis. Several laboratories have examined TCDD treatment on sperm transport through the epididymides with divergent results. Flow cytometry is currently recognized as a robust tool for the evaluation of sperm quality and function. These new techniques in flow cytometry can simultaneously measure damage to different sperm regions and/or changes in functionality. The use of flow cytometry to study its effect on apoptosis and damage in membrane integrity in sperm from mice exposed to low doses of TCDD may generate concern for possible effects in humans especially if we know that dioxins are lipophilic chemicals that resist biological and environmental degradation, making them persistent in the environment. It has been reported that exposure to toxic agents such as phthalate, ethane dimethane sulfonate, zearalenone, and TCDD induces apoptosis in the seminiferous tubules. (Chen *et al.*, 2010; Cheng e Mruk, 2010; Shaha *et al.*, 2010). Germ cell apoptosis also occurs normally during spermatogenesis in mammalian species. Apoptosis is frequently observed during the early testicular development. Moreover, the exact molecular mechanism responsible for the induction of germ cell death has not been identified, except for the involvement of androgen in the prevention of germ cell apoptosis in the adult rat testis. (Henriksén *et al.*, 1995; Kheradmand *et al.*, 2012)

The balance between cell proliferation, differentiation, and apoptosis is critical for normal spermatogenesis under physiological conditions and alterations of its regulation may lead to the development of impaired testicular function (Kimura *et al.*, 2003). Exposure of testis to endocrine-disrupting chemicals could result in different spermatogenesis dysfunctions depending on the development state at which the exposure occurred—during fetal life, puberty, or in adulthood. Consistently, several published literature showed the significant

effects of endocrine disruptors such as TCDD on fertility, the sex ratio at birth, embryonic development, sperm count, sperm functions, sperm morphology, damage to DNA and chromatin remodeling (Toppari *et al.*, 2016; Sidorkiewicz *et al.*, 2017). Specifically, damage to the integrity of human sperm chromatin has been observed (Spanò *et al.*, 2005). In our study we examined the effects of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the membrane integrity of mouse sperm, observing significant differences between the NC group and the group of THigh dose. Figure 3C shows 16.8% of dead sperm. On the other hand, the prevalence of apoptosis in the THigh dose group was 23.3%. Morphometric findings on testes showed TCDD treatment led to the loss of germ cells and decreased spermatogenesis cell lines, reducing epithelium and diameter of the seminiferous tubules Figure 4. The adult testis is a complex organ that is composed of seminiferous tubules, which are enclosed by a surrounding interstitium (Mehraein e Negahdar, 2011). The seminiferous tubules are the site of spermatogenesis, where germ cells develop into spermatozoa in close interaction with Sertoli cells. The Sertoli cells from the seminiferous tubules and the majority of Sertoli secretory products are hormonally regulated (Figueiredo *et al.*, 2016). The interstitial space around the seminiferous tubules contains another somatic cell type, the Leydig cell, which is responsible for testosterone production. Leydig cells have a major influence on spermatogenesis through the actions of testosterone on both the seminiferous tubule and the pituitary. Moreover, chemicals that suppress testosterone production by the Leydig cells will adversely impact the epididymis (Dhanabalan *et al.*, 2011). Testosterone deprivation reduces the number of qualitatively normal sperm entering the epididymis, as well as causing regression of the epididymal epithelium, and reduces the androgen-dependent facets of sperm maturation (Goyal *et al.*, 1994). Lastly, chemicals can disrupt the structure and function of the epididymis directly. Many reports have suggested that environmental endocrine disruptors, which act to mimic estrogens or act as antiestrogens or antiandrogens, are detrimental to reproduction and may promote abnormalities such as a decrease in sperm count, (Mclachlan, 2016) an increase in testicular cancer (Sanchez De Badajoz *et al.*, 2017). Particularly in our study, we show differences in the diameter and epithelium of the

seminiferous tubules of mice exposed to low doses of TCDD (Fig 3). The mice administered with corn oil show alterations in the diameter and the epithelium of the seminiferous tubules, this agrees with work done on obese animals (Mortazavi *et al.*, 2014).

### **Conclusion**

In conclusion, this study revealed the toxic effects of low doses administered TCDD on sperm quality, membrane integrity and apoptosis in sperm cells using flow cytometry; also the damage in the epithelium of the seminiferous tubules (EST) and the general decrease in the diameter of the seminiferous tubules (DST) in mice at different doses. The results of the present study indicate that at these low doses of TCDD cause toxicity in the reproductive system, so we suggest that fertility problems could occur. Infertility is one of the biggest problems, both in humans and in animals, due to the environmental contamination of the numerous chemical components. Because animals and humans can easily have contact with TCDD in many countries, subclinical poisoning with TCDD should be considered in cases of infertility in both.

The possible mechanism of toxicity related to apoptotic activity in sperm cells suggests that additional studies, including genotoxic evaluation, should be carried out to evaluate whether at these doses the TCDD can damage the fertility of the exposed man.

### **Acknowledgments**

The authors acknowledge the financial support from the Universidad Autónoma del Estado de México, which made the present work possible. Mrs. Heba Yehia Anwar Elsayed thanks the National Council for Science and Technology (CONACYT, Mexico) for the scholarship for her Ph.D.

### **References**

AGARWAL, A.; ALLAMANENI, S. S. Free radicals and male reproduction. *J Indian Med Assoc*, v. 109, n. 3, p. 184-7, Mar 2011. ISSN 0019-5847. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22010591> >.

AGARWAL, A. et al. Effect of oxidative stress on male reproduction. **World J Mens Health**, v. 32, n. 1, p. 1-17, Apr 2014. ISSN 2287-4208. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24872947> >.

AL-MAGHREBI, M.; KEHINDE, E. O.; ANIM, J. T. Survivin downregulation is associated with vasectomy-induced spermatogenic damage and apoptosis. **Med Princ Pract**, v. 20, n. 5, p. 449-54, 2011. ISSN 1423-0151. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21757935> >.

ALSHARIF, N. Z.; HASSOUN, E. A. Protective effects of vitamin A and vitamin E succinate against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced body wasting, hepatomegaly, thymic atrophy, production of reactive oxygen species and DNA damage in C57BL/6J mice. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 95, n. 3, p. 131-8, Sep 2004. ISSN 1742-7835. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15447737> >.

ALTINTAS, R. et al. Quercetin prevents docetaxel-induced testicular damage in rats. **Andrologia**, v. 47, n. 3, p. 248-56, Apr 2015. ISSN 1439-0272. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24601972> >.

ANA PAULA BINATO DE SOUZA, Â. M. S.-L., FRANCIELE LUCCA, IVAN CUNHA BUSTAMANTE-FILHO<sup>1</sup>. The epididymis and its role on sperm quality and male fertility. **Anim. Reprod**, v. 14, p. 1234-1244., 2017.

ANDROUTSOPOULOS, V. P.; TSATSAKIS, A. M.; SPANDIDOS, D. A. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. **BMC Cancer**, v. 9, p. 187, Jun 2009. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19531241> >.

ANECK-HAHN, N. H. et al. Estrogenic activity, selected plasticizers and potential health risks associated with bottled water in South Africa. **J Water Health**, v. 16, n. 2, p. 253-262, Apr 2018. ISSN 1477-8920. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29676761> >.

ATEŞŞAHIN, A. et al. Modulatory effects of lycopene and ellagic acid on reproductive dysfunction induced by polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) in male rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 106, n. 6, p. 479-89, Jun 2010. ISSN 1742-7843. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20074268> >.

AYHAN, D. H. et al. Sequence-Specific Targeting of Bacterial Resistance Genes Increases Antibiotic Efficacy. **PLoS Biol**, v. 14, n. 9, p. e1002552, Sep 2016. ISSN 1545-7885. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27631336> >.

BARRIER BATTUT, I. et al. Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 1111-1131, Sep 2016. ISSN 1879-3231. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27207472> >.

BELL et al. Toxicity of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the Developing Male Wistar(Han) Rat. II: Chronic Dosing Causes Developmental Delay. **Toxicol Sci.**, v. 99, n. 1, p. 224, 2007.

BEYTUR, A. et al. Protocatechuic acid prevents reproductive damage caused by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in male rats. **Andrologia**, v. 44 Suppl 1, p. 454-61, May 2012. ISSN 1439-0272. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21806661> >.

BJÖRNDAHL, L.; SÖDERLUND, I.; KVIST, U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. **Hum Reprod**, v. 18, n. 4, p. 813-6, Apr 2003. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12660276> >.

BRUNER-TRAN, K. L. et al. Developmental exposure of mice to dioxin promotes transgenerational testicular inflammation and an increased risk of preterm birth in



unexposed mating partners. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105084, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25127480> >.

\_\_\_\_\_. Developmental Toxicant Exposure Is Associated with Transgenerational Adenomyosis in a Murine Model. **Biol Reprod**, v. 95, n. 4, p. 73, 10 2016. ISSN 1529-7268. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27535957> >.

CARBONE, L.; AUSTIN, J. Pain and Laboratory Animals: Publication Practices for Better Data Reproducibility and Better Animal Welfare. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0155001, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27171143> >.

CHANG, G. R. Persistent organochlorine pesticides in aquatic environments and fishes in Taiwan and their risk assessment. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 25, n. 8, p. 7699-7708, Mar 2018. ISSN 1614-7499. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29288298> >.

CHAPIN, R. E. et al. Methods for assessing rat sperm motility. **Reprod Toxicol**, v. 6, n. 3, p. 267-73, 1992. ISSN 0890-6238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1591485> >.

CHEN, H. M. et al. The immunotoxic effects of dual exposure to PCP and TCDD. **Chem Biol Interact**, v. 206, n. 2, p. 166-74, Nov 2013. ISSN 1872-7786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24051191> >.

CHEN, S. C. et al. Endocrine disruptor, dioxin (TCDD)-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in human trophoblast-like JAR cells. **Mol Hum Reprod**, v. 16, n. 5, p. 361-72, May 2010. ISSN 1460-2407. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20083559> >.

CHENG, C. Y.; MRUK, D. D. The biology of spermatogenesis: the past, present and future. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 365, n. 1546, p. 1459-63, May 2010.

ISSN 1471-2970. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20403863> >.

CHENG, J. M. et al. Role of WNT signaling in epididymal sperm maturation. **J Assist Reprod Genet**, v. 35, n. 2, p. 229-236, Feb 2018. ISSN 1573-7330. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29152689> >.

CHESHENKO, K. et al. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. **Gen Comp Endocrinol**, v. 155, n. 1, p. 31-62, Jan 2008. ISSN 0016-6480. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17459383> >.

DENISON, M. S.; NAGY, S. R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 43, p. 309-34, 2003. ISSN 0362-1642. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12540743> >.

DHANABALAN, S. et al. Effect of restraint stress on 2,3,7,8 tetrachloro dibenzo-p-dioxin induced testicular and epididymal toxicity in rats. **Hum Exp Toxicol**, v. 30, n. 7, p. 567-78, Jul 2011. ISSN 1477-0903. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20610472> >.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E. et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. **Endocr Rev**, v. 30, n. 4, p. 293-342, Jun 2009. ISSN 1945-7189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19502515> >.

ENAN, E. et al. Mechanisms of gender-specific TCDD-induced toxicity in guinea pig adipose tissue. **Reprod Toxicol**, v. 12, n. 3, p. 357-69, 1998 May-Jun 1998. ISSN 0890-6238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9628558> >.

FIGUEIREDO, A. F. et al. Sertoli cells are capable of proliferation into adulthood in the transition region between the seminiferous tubules and the rete testis in

Wistar rats. **Cell Cycle**, v. 15, n. 18, p. 2486-96, Sep 2016. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27420022> >.

FISHER, M. T.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. S. Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of loss of mitochondrial membrane potential in epididymal spermatozoa by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). **Toxicol Lett**, v. 157, n. 2, p. 99-107, Jun 2005. ISSN 0378-4274. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15836997> >.

FOSTER, W. G.; MAHARAJ-BRICEÑO, S.; CYR, D. G. Dioxin-induced changes in epididymal sperm count and spermatogenesis. **Cien Saude Colet**, v. 16, n. 6, p. 2893-905, Jun 2011. ISSN 1678-4561. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21709986> >.

GAO, Z. et al. Effect of TCDD on the fate of epithelial cells isolated from human fetal palatal shelves (hFPECs). **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 305, p. 186-193, 08 2016. ISSN 1096-0333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27312872> >.

GARCÍA-NIETO, E. et al. Assessment of dioxin-like soil contamination in Mexico by enzyme-linked immunosorbent assay. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 58, n. 4, p. 918-26, May 2010. ISSN 1432-0703. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20091164> >.

GAYSINSKAYA, V.; BORTVIN, A. Flow cytometry of murine spermatocytes. **Curr Protoc Cytom**, v. 72, p. 7.44.1-24, Apr 2015. ISSN 1934-9300. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25827485> >.

GAYSINSKAYA, V. et al. Optimized flow cytometry isolation of murine spermatocytes. **Cytometry A**, v. 85, n. 6, p. 556-65, Jun 2014. ISSN 1552-4930. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24664803> >.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 445-57, Jan 2005. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15626410> >.

GOYAL, H. O.; HUTTO, V.; MALONEY, M. A. Effects of androgen deprivation in the goat epididymis. **Acta Anat (Basel)**, v. 150, n. 2, p. 127-35, 1994. ISSN 0001-5180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7976193> >.

GRAY, L. E. et al. Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. **Hum Reprod Update**, v. 7, n. 3, p. 248-64, 2001 May-Jun 2001. ISSN 1355-4786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11392371> >.

HASSOUN, E. A. et al. The effects of ellagic acid and vitamin E succinate on antioxidant enzymes activities and glutathione levels in different brain regions of rats after subchronic exposure to TCDD. **J Toxicol Environ Health A**, v. 69, n. 5, p. 381-93, Mar 2006. ISSN 1528-7394. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16455616> >.

HAWKINS, P. et al. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. **Lab Anim**, v. 45, n. 1, p. 1-13, Jan 2011. ISSN 1758-1117. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21123303> >.

HENRIKSÉN, K.; HAKOVIRTA, H.; PARVINEN, M. Testosterone inhibits and induces apoptosis in rat seminiferous tubules in a stage-specific manner: in situ quantification in squash preparations after administration of ethane dimethane sulfonate. **Endocrinology**, v. 136, n. 8, p. 3285-91, Aug 1995. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7628362> >.

HOSSAIN, M. S. et al. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. **Asian J Androl**, v. 13, n. 3, p. 406-19, May 2011. ISSN 1745-7262. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21478895> >.

HUANG, C. et al. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) activity and DNA-damaging effects of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons (Cl-PAHs). **Chemosphere**, v. 211, p. 640-647, Nov 2018. ISSN 1879-1298. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30098559> >.

HWANG, S. Y. et al. Panax ginseng improves survival and sperm quality in guinea pigs exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin. **BJU Int**, v. 94, n. 4, p. 663-8, Sep 2004. ISSN 1464-4096. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15329132> >.

KAJTA, M.; WÓJTOWICZ, A. K. Impact of endocrine-disrupting chemicals on neural development and the onset of neurological disorders. **Pharmacol Rep**, v. 65, n. 6, p. 1632-9, 2013. ISSN 1734-1140. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24553011> >.

KASAI, A. et al. High levels of dioxin-like potential in cigarette smoke evidenced by in vitro and in vivo biosensing. **Cancer Res**, v. 66, n. 14, p. 7143-50, Jul 2006. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16849560> >.

KHERADMAND, A. et al. Ghrelin modulates testicular germ cells apoptosis and proliferation in adult normal rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 419, n. 2, p. 299-304, Mar 2012. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22360851> >.

KIMURA, M. et al. Balance of apoptosis and proliferation of germ cells related to spermatogenesis in aged men. **J Androl**, v. 24, n. 2, p. 185-91, 2003 Mar-Apr 2003.

ISSN 0196-3635. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12634304> >.

LATCHOUMYCANDANE, C.; CHITRA, K. C.; MATHUR, P. P. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin (TCDD) induces oxidative stress in the epididymis and epididymal sperm of adult rats. **Arch Toxicol**, v. 77, n. 5, p. 280-4, May 2003. ISSN 0340-5761. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12734642> >.

LIN, T. M. et al. Role of the aryl hydrocarbon receptor in the development of control and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-exposed male mice. **J Toxicol Environ Health A**, v. 64, n. 4, p. 327-42, Oct 2001. ISSN 1528-7394. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11693491> >.

LIU, J. et al. Estrogenic activity of cylindrospermopsin and anatoxin-a and their oxidative products by Fe. **Water Res**, v. 132, p. 309-319, 04 2018. ISSN 1879-2448. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29339303> >.

LIU, Y. Y. et al. Identification, contribution, and estrogenic activity of potential EDCs in a river receiving concentrated livestock effluent in Southern Taiwan. **Sci Total Environ**, v. 636, p. 464-476, Sep 2018. ISSN 1879-1026. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29709864> >.

MABLY, T. A.; MOORE, R. W.; PETERSON, R. E. In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 1. Effects on androgenic status. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 114, n. 1, p. 97-107, May 1992. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1585378> >.

MAGRE, S. et al. Gender differences in transcriptional signature of developing rat testes and ovaries following embryonic exposure to 2,3,7,8-TCDD. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e40306, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22808131> >.

MAN, Y. B. et al. Mutagenicity and genotoxicity of Hong Kong soils contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons and dioxins/furans. **Mutat Res**, v. 752, n. 1-2, p. 47-56, Apr 2013. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23391780> >.

MCKINLAY, R. et al. Endocrine disrupting pesticides: implications for risk assessment. **Environ Int**, v. 34, n. 2, p. 168-83, Feb 2008. ISSN 0160-4120. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17881056> >.

MCLACHLAN, J. A. Environmental signaling: from environmental estrogens to endocrine-disrupting chemicals and beyond. **Andrology**, v. 4, n. 4, p. 684-94, 07 2016. ISSN 2047-2927. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27230799> >.

MEHRAEIN, F.; NEGAHDAR, F. Morphometric evaluation of seminiferous tubules in aged mice testes after melatonin administration. **Cell J**, v. 13, n. 1, p. 1-4, 2011. ISSN 2228-5806. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23671820> >.

MEHRPOUR, O. et al. Occupational exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: a review. **Toxicol Lett**, v. 230, n. 2, p. 146-56, Oct 2014. ISSN 1879-3169. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24487096> >.

MOR, F.; OZMEN, O. Acute endosulfan poisoning in cattle. **Vet Hum Toxicol**, v. 45, n. 6, p. 323-4, Dec 2003. ISSN 0145-6296. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14640487> >.

MORTAZAVI, M. et al. Protective Effects of Antioxidants on Sperm Parameters and Seminiferous Tubules Epithelium in High Fat-fed Rats. **J Reprod Infertil**, v. 15, n. 1, p. 22-8, Jan 2014. ISSN 2228-5482. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24696792> >.

PORTERFIELD, W.; TAHMASSEBI, D. C. Synthesis of a fluorescent 2'3'-dideoxycytosine analog, tCdd. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 19, n. 1, p. 111-3, Jan 2009. ISSN 1464-3405. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19026534> >.

RATHER, I. A. et al. The Sources of Chemical Contaminants in Food and Their Health Implications. **Front Pharmacol**, v. 8, p. 830, 2017. ISSN 1663-9812. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29204118> >.

REHMAN, S. et al. Endocrine disrupting chemicals and impact on male reproductive health. **Transl Androl Urol**, v. 7, n. 3, p. 490-503, Jun 2018. ISSN 2223-4691. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30050807> >.

RIFKIND, A. B. CYP1A in TCDD toxicity and in physiology-with particular reference to CYP dependent arachidonic acid metabolism and other endogenous substrates. **Drug Metab Rev**, v. 38, n. 1-2, p. 291-335, 2006. ISSN 0360-2532. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16684662> >.

ROY, D. et al. Role of epididymal anti sticking factor in sperm capacitation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 463, n. 4, p. 948-53, Aug 2015. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26100206> >.

SANABRIA, M. et al. Sperm quality and fertility in rats after prenatal exposure to low doses of TCDD: A three-generation study. **Reprod Toxicol**, v. 65, p. 29-38, 10 2016. ISSN 1873-1708. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27352640> >.

SANCHEZ DE BADAJOZ, E.; LAGE-SÁNCHEZ, J. M.; SÁNCHEZ-GALLEGOS, P. Endocrine disruptors and prostate cancer. **Arch Esp Urol**, v. 70, n. 3, p. 331-335, 04 2017. ISSN 0004-0614. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28422034> >.



SARILL, M. et al. The aryl hydrocarbon receptor suppresses cigarette-smoke-induced oxidative stress in association with dioxin response element (DRE)-independent regulation of sulfiredoxin 1. **Free Radic Biol Med**, v. 89, p. 342-57, Dec 2015. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26408075> >.

SCHUG, T. T. et al. Elucidating the links between endocrine disruptors and neurodevelopment. **Endocrinology**, v. 156, n. 6, p. 1941-51, Jun 2015. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25714811> >.

SENGUPTA, P.; BANERJEE, R. Environmental toxins: alarming impacts of pesticides on male fertility. **Hum Exp Toxicol**, v. 33, n. 10, p. 1017-39, Oct 2014. ISSN 1477-0903. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24347299> >.

SHAHA, C.; TRIPATHI, R.; MISHRA, D. P. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 365, n. 1546, p. 1501-15, May 2010. ISSN 1471-2970. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20403866> >.

SIDORKIEWICZ, I. et al. Endocrine-disrupting chemicals-Mechanisms of action on male reproductive system. **Toxicol Ind Health**, v. 33, n. 7, p. 601-609, Jul 2017. ISSN 1477-0393. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28464759> >.

SIMANAINEN, U. et al. Adult 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposure and effects on male reproductive organs in three differentially TCDD-susceptible rat lines. **Toxicol Sci**, v. 81, n. 2, p. 401-7, Oct 2004. ISSN 1096-6080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15240895> >.

SPANÒ, M. et al. Exposure to PCB and p, p'-DDE in European and Inuit populations: impact on human sperm chromatin integrity. **Hum Reprod**, v. 20, n.

12, p. 3488-99, Dec 2005. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16223788> >.

SÖNMEZ, M. et al. Attenuating effect of lycopene and ellagic acid on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced spermiotoxicity and testicular apoptosis. **Drug Chem Toxicol**, v. 34, n. 4, p. 347-56, Oct 2011. ISSN 1525-6014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21714773> >.

TAIROVA, Z. et al. Persistent organic pollutants and related biological responses measured in coastal fish using chemical and biological screening methods. **J Toxicol Environ Health A**, v. 80, n. 16-18, p. 862-880, 2017. ISSN 1528-7394. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28910589> >.

TAPIA, J. A. et al. The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope. **Reprod Domest Anim**, v. 47 Suppl 3, p. 65-75, Jun 2012. ISSN 1439-0531. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22681300> >.

TAVARES, R. S. et al. The non-genomic effects of endocrine-disrupting chemicals on mammalian sperm. **Reproduction**, v. 151, n. 1, p. R1-R13, Jan 2016. ISSN 1741-7899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26585413> >.

TOPPARI, J.; RODPRASERT, W.; KOSKENNIEMI, J. J. Exposure Variation and Endocrine Disruption of the Male Reproductive System. **Horm Res Paediatr**, v. 86, n. 4, p. 247-252, 2016. ISSN 1663-2826. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27255653> >.

TORRES-DOSAL, A. et al. Indoor air pollution in a Mexican indigenous community: evaluation of risk reduction program using biomarkers of exposure and effect. **Sci Total Environ**, v. 390, n. 2-3, p. 362-8, Feb 2008. ISSN 0048-9697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18036639> >.

WLODKOWIC, D. et al. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. **Methods Cell Biol**, v. 103, p. 55-98, 2011. ISSN 0091-679X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21722800> >.

WYROBEK, A. J.; BRUCE, W. R. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 72, n. 11, p. 4425-9, Nov 1975. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1060122> >.

YIN, H. P. et al. Effects of vitamin E on reproductive hormones and testis structure in chronic dioxin-treated mice. **Toxicol Ind Health**, v. 28, n. 2, p. 152-61, Mar 2012. ISSN 1477-0393. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21632572> >.

ZEMBRUSKI, N. C. et al. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. **Anal Biochem**, v. 429, n. 1, p. 79-81, Oct 2012. ISSN 1096-0309. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22796502> >.

ZHANG, L. et al. Cigarette smoke condensate and dioxin suppress culture shock induced senescence in normal human oral keratinocytes. **Oral Oncol**, v. 43, n. 7, p. 693-700, Aug 2007. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17070097> >.

ZHU, Y. et al. Organochlorine pesticides in follicular fluid of women undergoing assisted reproductive technologies from central China. **Environ Pollut**, v. 207, p. 266-72, Dec 2015. ISSN 1873-6424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26412266> >.

ZOELLER, R. T. et al. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. **Endocrinology**, v. 153, n. 9, p. 4097-110, Sep 2012. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22733974> >.

## TABLES AND FIGURES

Table 1. Body and reproductive organs weight.

Treatment/ mice	BW(final)	Epididymis W	Testes W
Control	40.000 <sup>a</sup>	0.081	0.239
Control (vehicle)	39.900	0.081	0.239
TCDD(0.375µg/kg)	39.33 <sup>b</sup>	0.079	0.236
TCDD(0.75µg/kg)	36.33 <sup>ab</sup>	0.081	0.237
TCDD(1.5µg/kg)	36.75	0.080	0.235
SE	0.870	0.001	0.003

SE is stander error; <sup>a,b</sup> Different superscripts following means in the column indicate differences at p<0.05

Table 2. Effects of TCDD on sperm physiological parameters, 10 days after the exposure.

Treatment	Sperm concentrate (10 <sup>6</sup> /ml)	normal sperm	Malformation			% dead	% motility		
			%abnor- ml head	%abnor- ml tail	%abno- rml mid- piece		%progre ssive	%non progressi ve	% immo- tile
Mice									
NC	16.28 <sup>a</sup>	84.23 <sup>a</sup>	7.50 <sup>a</sup>	8.18 <sup>a</sup>	0.10	15.33 <sup>a</sup>	81.43 <sup>a</sup>	9.48 <sup>a</sup>	9.08 <sup>a</sup>
VC	16.29 <sup>b</sup>	83.63 <sup>b</sup>	7.60 <sup>b</sup>	8.60 <sup>b</sup>	0.12	15.50 <sup>b</sup>	81.33 <sup>b</sup>	9.25 <sup>b</sup>	9.41 <sup>b</sup>
TLow (0.37µg/kg)	13.17 <sup>abc</sup>	78.85 <sup>c</sup>	9.42 <sup>c</sup>	11.60 <sup>b</sup>	0.13	38.83	40.73 <sup>ab</sup>	24.63 <sup>b</sup>	34.66 <sup>abc</sup>
TMedian (0.75µg/kg)	14.47 <sup>abc</sup>	68.35 <sup>ab</sup>	15.78 <sup>abc</sup>	15.72 <sup>ab</sup>	0.14	33.17 <sup>ab</sup>	37.63 <sup>ab</sup>	17.76 <sup>ab</sup>	44.58 <sup>abc</sup>
THigh (1.5µg/kg)	12.92 <sup>ab</sup>	72.95 <sup>abc</sup>	14.28 <sup>abc</sup>	13.98 <sup>ab</sup>	0.13	45.83 <sup>ab</sup>	26.03 <sup>ab</sup>	21.56 <sup>ab</sup>	52.43 <sup>abc</sup>
SE	0.05	0.42	0.28	0.26	0.02	0.85	0.69	0.34	0.43

SE is stander error, <sup>a,b,c</sup>. The differences between the table groups are significant according to Student's test with p<0.05

Table 3 Mortality due to cytotoxicity and apoptosis of mouse spermatozoa exposed to TCDD (0.375;0.75; 1.5 mg/Kg) using flow cytometry

P	N.C	V.C	NIC	VIC	ITLow	ITMedian	ITHigh	TLow	TMedian	THigh
P≤0.05										
<b>FSC</b>	0.0001 <sup>a</sup>	0.0001 <sup>acdf</sup>	ND	0.0001 <sup>ai</sup>	0.0001 <sup>cdi</sup> f	0.0001 <sup>a</sup>	0.0001 <sup>a</sup>	0.0001 <sup>a</sup>	ND	0.0001 <sup>ac</sup>
<b>SSC</b>	ND	0.0001 <sup>c</sup>	ND	0.0001 <sup>c</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	0.0001 <sup>c</sup>
<b>AnexinV-</b>	0.0001 <sup>b</sup>	0.0001 <sup>b</sup>	0.0001 <sup>acbj</sup>	0.0001 <sup>b</sup>	0.0001 <sup>j</sup>	0.0001 <sup>j</sup>	ND	0.0001 <sup>a</sup>	0.0001 <sup>b</sup>	0.0001 <sup>c</sup>
<b>SSC+</b>	ND	0.0001 <sup>acbe</sup>	ND	0.0001 <sup>aifb</sup>	0.0001 <sup>ie</sup>	0.0001 <sup>e</sup>	ND	0.0001 <sup>a</sup>	0.0001 <sup>b</sup>	0.0001 <sup>c</sup>
<b>AnexinV+</b>	<b>0.0001<sup>b</sup></b>	0.0001 <sup>ceb</sup>	0.0001 <sup>b</sup>	0.0001 <sup>ci</sup> b	0.0001 <sup>ibe</sup>	SD	ND	ND	0.0001 <sup>b</sup>	<b>0.0001<sup>bc</sup></b>
<b>SSC+</b>	ND	0.0001 <sup>acbe</sup>	ND	0.0001 <sup>ab</sup> i	0.0001 <sup>ie</sup>	0.0001 <sup>e</sup>	ND	0.0001 <sup>a</sup>	0.0001 <sup>b</sup>	0.0001 <sup>c</sup>
<b>AnexinV-</b>	0.0001 <sup>b</sup>	0.0001 <sup>ce</sup>	ND	ND	ND	0.0001 <sup>e</sup>	ND	ND	0.0001 <sup>b</sup>	0.0001 <sup>c</sup>
<b>FSC+</b>	0.0001 <sup>e</sup>	0.0001 <sup>ae</sup>	0.0001 <sup>e</sup>	ND	0.0001 <sup>ce</sup>	ND	ND	0.0001 <sup>a</sup>	ND	0.0001 <sup>ac</sup>
<b>AnexinV+</b>	ND	ND	0.0001 <sup>i</sup>	0.0001 <sup>i</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>FSC+</b>	0.0001 <sup>je</sup>	0.0001 <sup>aej</sup>	0.0001 <sup>ij</sup>	0.0001 <sup>aie</sup>	0.0001 <sup>e</sup>	ND	0.0001 <sup>i</sup>	0.0001 <sup>a</sup>	ND	ND
<b>FSC</b>	0.0001 <sup>d</sup>	0.0001 <sup>afde</sup>	0.0001 <sup>deh</sup>	0.0001 <sup>afde</sup> h	0.0001 <sup>cf</sup>	ND	ND	0.0001 <sup>a</sup>	ND	0.0001 <sup>ac</sup>
<b>SSC</b>	0.0001 <sup>lid</sup>	0.0001 <sup>bidac</sup> g	0.0001 <sup>lid</sup>	0.0001 <sup>i</sup>	0.0001	0.0001 <sup>g</sup>	0.0001 <sup>b</sup>	0.0001 <sup>a</sup>	0.0001 <sup>b</sup>	0.0001 <sup>c</sup>
<b>7AAD-</b>	0.0001 <sup>bd</sup>	0.0001 <sup>de</sup>	0.0001 <sup>bgej</sup>	0.0001 <sup>bd</sup> j	ND	0.0001 <sup>g</sup>	ND	ND	0.0001 <sup>b</sup>	ND
<b>SSC+</b>	0.0001 <sup>d</sup>	0.0001 <sup>bacg</sup> hde	0.0001 <sup>fdelj</sup>	0.0001 <sup>de</sup> j	0.0001 <sup>f</sup>	0.0001 <sup>g</sup>	0.0001 <sup>h</sup>	0.0001 <sup>a</sup>	0.0001 <sup>b</sup>	0.0001 <sup>c</sup>
<b>7AAD+</b>	<b>0.0001<sup>bd</sup></b>	0.0001 <sup>bfde</sup>	0.0001 <sup>ej</sup>	0.0001 <sup>bf</sup> dej	0.0001 <sup>f</sup>	ND	ND	ND	0.0001 <sup>b</sup>	<b>0.0001<sup>b</sup></b>
<b>SSC+</b>	0.0001 <sup>d</sup>	0.0001 <sup>bacgf</sup> de	0.0001 <sup>ej</sup>	0.0001 <sup>cf</sup> dej	0.0001 <sup>f</sup>	0.0001 <sup>g</sup>	ND	0.0001 <sup>a</sup>	0.0001 <sup>b</sup>	0.0001 <sup>c</sup>
<b>7AAD-</b>	0.0001 <sup>d</sup>	0.0001 <sup>bgfde</sup>	0.0001 <sup>bgdej</sup>	0.0001 <sup>de</sup> j	0.0001 <sup>gf</sup>	0.0001 <sup>g</sup>	ND	ND	0.0001 <sup>b</sup>	ND
<b>FSC+</b>	0.0001 <sup>ad</sup>	0.0001 <sup>afe</sup>	0.0001 <sup>e</sup>	0.0001 <sup>d</sup>	0.0001 <sup>cf</sup>	SD	0.0001 <sup>af</sup>	0.0001 <sup>a</sup>	ND	0.0001 <sup>ac</sup>
<b>7AAD+</b>	ND	0.0001 <sup>b</sup>	0.0001 <sup>g</sup>	0.0001 <sup>g</sup>	ND	ND	ND	ND	0.0001 <sup>b</sup>	ND
<b>FSC+</b>	0.0001 <sup>d</sup>	ND	0.0001 <sup>d</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>FSC</b>	0.0001 <sup>d</sup>	0.0001 <sup>afde</sup>	0.0001 <sup>ej</sup>	0.0001 <sup>afj</sup> d	0.0001 <sup>cf</sup>	ND	ND	0.0001 <sup>a</sup>	ND	0.0001 <sup>ac</sup>
<b>SSC</b>	0.0001 <sup>d</sup>	0.0001	0.0001 <sup>j</sup>	0.0001 <sup>bd</sup> j	ND	ND	ND	ND	0.0001 <sup>b</sup>	ND
<b>AnexinV-</b>	0.0001 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.0001 <sup>b</sup>	ND
<b>7AAD+</b>	0.0001 <sup>f</sup>	ND	0.0001 <sup>f</sup>	SD	0.0001 <sup>f</sup>	ND	ND	ND	ND	ND
<b>AnexinV+</b>	<b>0.0001<sup>bd</sup></b>	0.0001 <sup>de</sup>	0.0001 <sup>ej</sup>	0.0001 <sup>bd</sup> ej	ND	ND	ND	ND	ND	<b>0.0001<sup>b</sup></b>
<b>7AAD+</b>	<b>0.0001<sup>bd</sup></b>	0.0001	0.0001 <sup>j</sup>	0.0001 <sup>bd</sup> j	ND	ND	ND	ND	0.0001 <sup>b</sup>	<b>0.0001<sup>b</sup></b>

\* P:Parameters; N.C: Negative Control; V.C : Positive control; NIC: Negative internal control; VIC:Vehicle internal control; ITLow: Internal low dose, ITMedian: Internal median dose; ITHigh: High internal dose; TLow: Lowe dose; TMedian: Median dose; THigh: High Dose; ND: Not Differences. <sup>a,b,c</sup>. The differences between the table groups are significant according to Student's test with p<0.05

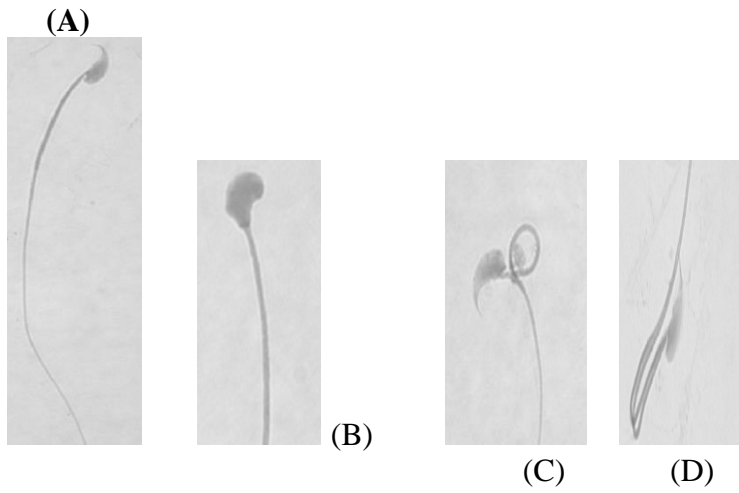


Figure 1. Morphological classification of epididymal sperm cells from control and TCDD exposed mice. A) A normal sperm cell, B) Abnormal head, C) Abnormal midpiece, D) Abnormal tail.

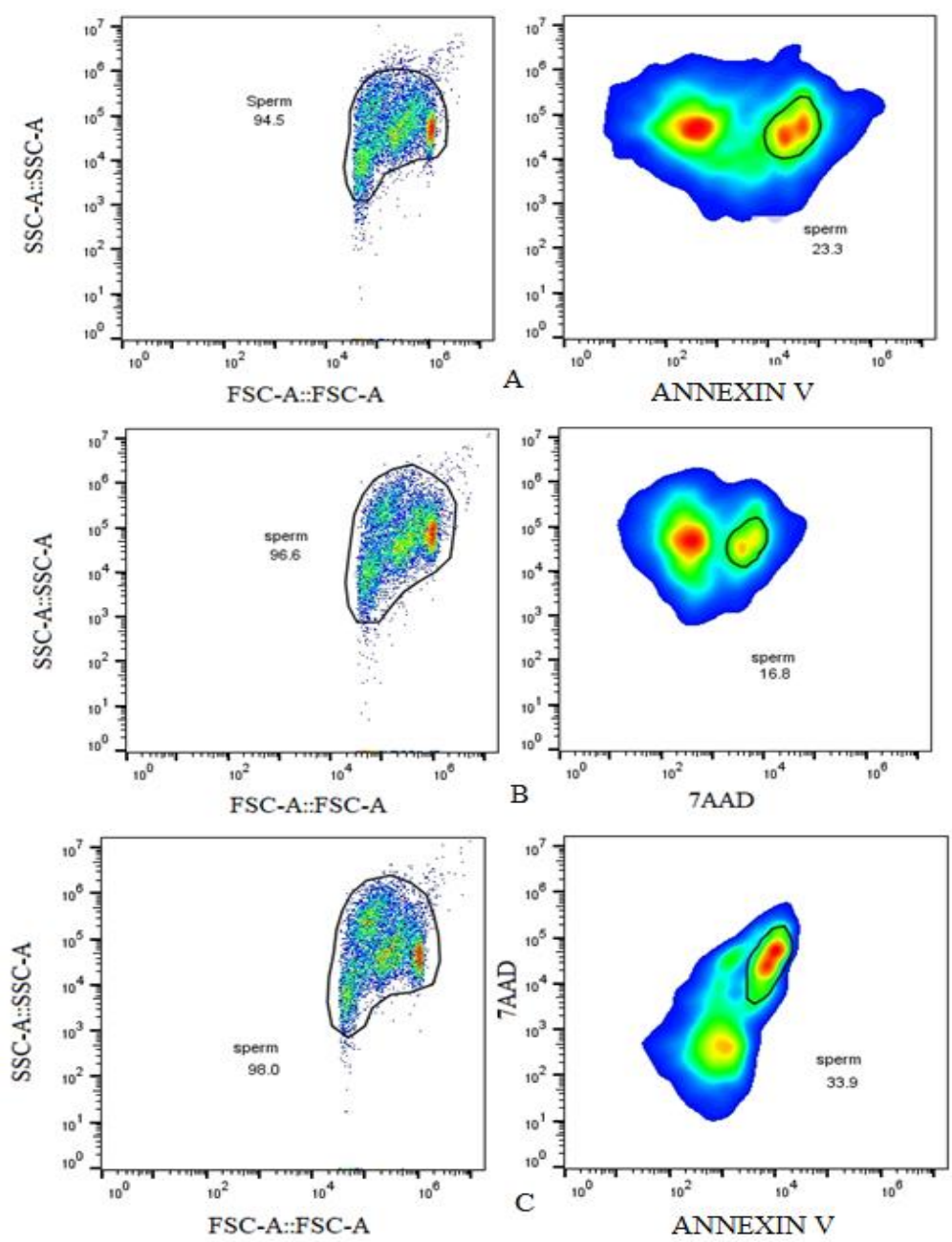


Figure 2. Populations of mouse spermatozoa labeled with 7AAD and AnnexinV exposed to TCDD (THigh 1.5 mg/Kg)

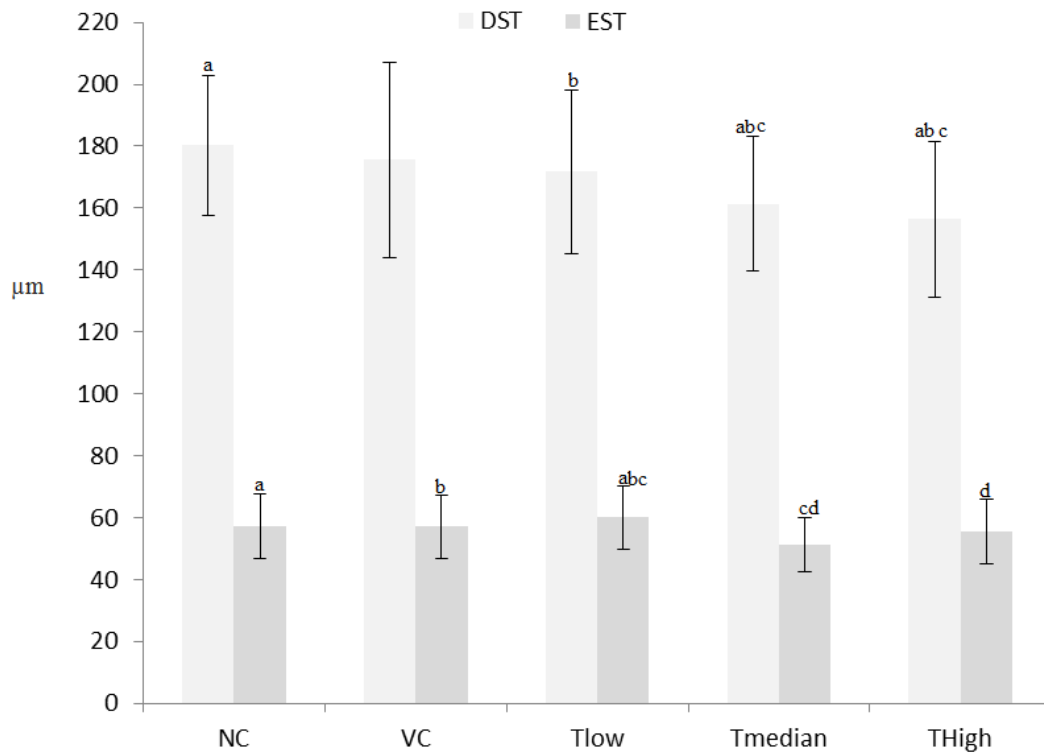


Figure 3 Morphometric analyses of diameter of seminiferous tubule (DST) and epithelium of the seminiferous tubules (EST) of mice administered orally at doses 0.375; 0.75; 1.5 mg/Kg of TCDD. \* N.C: Negative Control; V.C : Vehicle control; TLow: Low dose; TMedian: Median dose; THigh: High Dose; .<sup>a,b,c</sup>. The differences between the table groups are significant according to Student's test with  $p < 0.05$



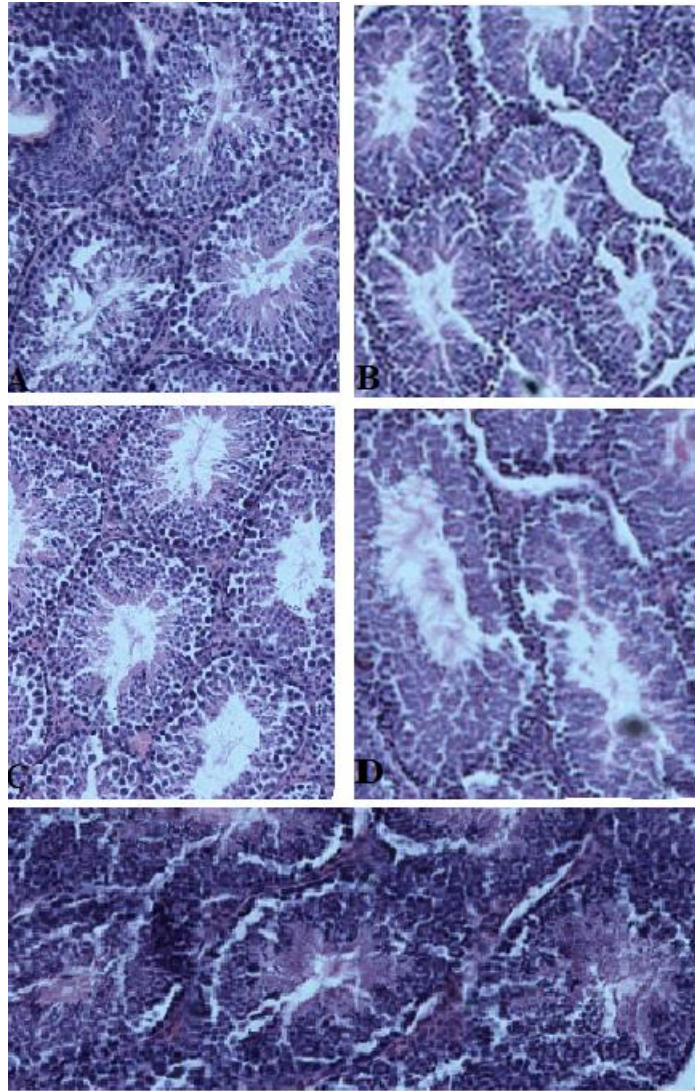


Figure 3 Histopathology of seminiferous tubule of mice administered orally at doses 0.375; 0.75; 1.5 mg/Kg of TCDD. \* A: Negative Control; B: Low dose; C: Median dose; D:THigh: High Dose; E: Vehicle control.



esvieta tenorio &lt;esvieta@gmail.com&gt;

**Manuscript Acceptance letter | BMS-CTMC-2019-HT52-712-4**

1 message

**Current Topics in Medicinal Chemistry** <admin@bentham.manuscriptpoint.com>

Wed, May 15, 2019 at 9:25 PM

Reply-To: Current Topics in Medicinal Chemistry &lt;ctmc@benthamscience.net&gt;

To: esvieta@gmail.com

Cc: ctmc@benthamscience.net, qasit@benthamscience.net, mariakhan@benthamscience.net

**Reference#:** BMS-CTMC-2019-HT52-712-4**Submission Title:** Sperm quality in mouse after exposure to low doses of TCDD

Dear Dr. Esvieta Tenorio Borroto,

I am pleased to inform you that your article entitled "**Sperm quality in mouse after exposure to low doses of TCDD**" has been accepted for publication in "**Current Topics in Medicinal Chemistry**" after independent peer review.

We recommend you to publish your **Animated Abstract**, along with the article abstract, to extend the coverage of your article. Bentham Science has collaborated with Focus Medica, one of the world's largest publishers of expert animated atlases and videos in medicine and science, to create an **Animated Abstract** of your article. **Animated Abstract** will be published as open access (free-to-view) and help summarise the essential discoveries/key findings of your research, highlight the importance of the article for further research and utilization in the relevant industry. Each professionally produced, full-coloured animated abstract, in video format (length 3 – 5 minutes) is accompanied by an english or foreign language commentary. You can avail this service against a fee to get the **Animated Abstract** published with your textual / graphical abstract on the Journal's homepage (for reference, please visit: <http://www.eurekaselect.com/video.html>).

It will serve to define and gain attention for the article. For more information, please view the 'Instructions for Authors'.

Please note the figures provided in color will be published against payment. For further details, please refer to the Instruction for Authors.

You may wish to request your Librarian to subscribe to the journal so that your work gets maximum exposure among your colleagues, researchers and readers in the field. Bentham also has a special limited time offer in this connection: If your Librarian decides to subscribe to this journal, you will be eligible to an optional offer which will allow free Open Access to this article.

We are eager to share with you all the research articles published in Bentham Science journals that are relevant to your field of interest. For future article alerts, we request you to provide keywords and fields of your choice. Please e-mail your selections for future article alerts to Mr. F. Haq, Manager Marketing: [faizan@benthamscience.net](mailto:faizan@benthamscience.net).

Bentham Science strives to promote your article to a huge audience relevant to your research, using a variety of Marketing tools and platforms. For a detailed view of all the promotional activities please visit the author's benefits section on our website.

**We shall be most grateful if you could kindly distribute the journal flyer at the next few conferences that you attend. Please download the flyer at**

We wish to thank you for submission of the manuscript to Current Topics in Medicinal Chemistry and look forward to continued collaboration in future.

<https://mail.google.com/mail/u/0?ik=7815633585&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1633653667938581421&simpl=msg-f%3A16336536679...> 1/2

## CAPITULO 2

### **Effects of low doses of TCDD as an endocrine disruptor in feedstuff on the reproductive system in rabbits**

**Heba Yehia Anwar Elsayed<sup>1,2</sup>, Esvieta Tenorio Borroto<sup>2\*</sup>, Alberto Barbabosa Pliego<sup>2</sup>, Jorge Acosta Dibarrat<sup>2</sup>, Fabiola Rivera Ramirez<sup>3</sup>, Juan Carlos Vázquez Chagoyán<sup>2</sup>, Nazario Pescador Salas<sup>3</sup>, Raafat Mahmoud Mohamed Gomaa<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Poultry Production Department, Faculty of Agriculture, Ain Shams University, Cairo, Egypt. Zip code: 11241

<sup>2</sup> Centro de Investigación y Estudios Avanzados de Salud Animal, Universidad Autónoma del Estado de México.

<sup>3</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México

<sup>4</sup> Animal Production Department, Faculty of Agriculture, Ain Shams University, Cairo, Egypt.

\*Corresponding author: Esvieta Tenorio Borroto, e-mail:esvieta@gmail.com

#### **Abstract**

The TCDD is a type of dioxin that affects the reproductive system. Feedstuff is its main entryway into rabbits for productive purposes. The effects of low doses of TCDD can affect on semen quality causing economic losses. The objective of the present study was to evaluate the reproductive toxicity effect of low doses of TCDD in rabbit's males. Three concentrations of TCDD (0.375, 0.75, 1.5 mg/kg) were tested and their effects on spermatozoa were evaluated 10 days after oral administration of the product. Semen quality was assessed in fresh. These parameters were total motility (TM) (progressive motility (PM), non-progressive motility (NPM), immotile (IM), Malformation abnormal head (AH), abnormal tail (AT), and abnormal mid-piece (AMP), and Sperm concentration (SC). Flow cytometry was used to determine the affected sperm population by cytotoxicity and apoptosis. In addition, a morphometric analysis of testicles was performed. The results showed that the body weight of the treated animals was significantly reduced in both medium and high doses (0.75, 1.5 mg/kg) with respect to the control groups. In the groups treated with TCDD, dead sperm increased by 50% in the T-High dose more than the control group. Regarding malformations had increased in the head and tail by 11 and 6% respectively. Significant differences cytotoxicity and apoptosis between the negative control (NC) and T-High dose. In addition, the morphometric analysis of the testicles was

performed. Significant differences ( $p \leq 0.05$ ) were found in the mean diameter of the seminiferous tubules (DST), and the average epithelium of the seminiferous tubules (EST) among all treated groups versus the control. It can be concluded that at these low doses of TCDD there was an impact on the quality, apoptosis, and cytotoxicity of the rabbit sperm and that affects the rabbit production in farms.

**Keywords:** TCDD, Rabbit production, Sperm parameters, Endocrine disruptor, Flow cytometry, Morphometry assay

## 1. Introduction

Dioxins are suspected of interfering with the endocrine systems of humans and wildlife causing a broad spectrum of adverse effects including developmental and reproductive toxicity in the offspring of laboratory and production animals, and perhaps in humans (Rebourcet et al., 2010). Problems in reproduction are surely the most obvious effects in animals and, in this sense, the recent studies had shown that a large part of the biological effects of dioxins are associated to its ability to alter the function of sex hormones, which is why they are considered as a true endocrine disruptors (Wang *et al.*, 2006). Some laboratory studies have shown that dioxins and their metabolites can interfere with the metabolism of the hormone T4 thyroid, causing a decrease in hormone levels and, therefore, problems of developing. Dioxins can cause other actions on the endocrine system, modulating receptors endocrine factors such as those of estrogen, progesterone, and prolactin (Hattori et al., 2015; Su et al., 2015). The major source of human exposure to dioxins is through the diet, almost exclusively through consumption of foods from animal origin including meat, fish and dairy products (Fernández-González et al., 2015; Pizarro-Aránguiz et al., 2015). The routes of exposure of animals are similar to those of people, although they are a minor step in the trophic chain. Although dioxins can be extremely toxic in very low doses, each species exhibit varying levels of sensibility to them. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) is a lipophilic and ubiquitous environmental contaminant that is a high-affinity aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand (Chen e Chan, 2018). The functional characteristics of AhRs are broadly conserved among vertebrate species, even though large species and strain differences in sensitivity to TCDD and other

AhR ligands have been observed (Bock, 2018). Studies on the affinity of TCDD with AhR showed that the functional characteristics of AhR are widely conserved among vertebrate species, although large differences between species and strains have been observed in sensitivity to TCDD and other AhR ligands (Pandini et al., 2009; Ehrlich et al., 2018). Several incidents related to the presence of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans (PCDD/Fs) and polychlorinated biphenyls (PCB) in food products have been strengthened and have been studied in several species including the rabbit. In Mexico there have been few studies of PCDD concentrations in monitoring conducted from 2011 to 2013 in Sonora reported high concentrations of PCDD with values of 1610 fg / m<sup>3</sup>. On the other hands in Yucatan are 546 fg / m<sup>3</sup> (Schuster et al., 2015). Agricultural soils constitute deposits of PCDD / PCDF in Mexico (Haro-García et al., 2012). In Mexico, poor socioeconomic and environmental conditions tend to favor the population's exposure to high levels of bioaccumulative substances such as dioxins. In 2011, the three countries approved the North American Strategy to catalyze the cooperation on dioxins, furans, and hexachlorobenzene. The Mexican Network for the Monitoring of Dioxins and Furans in the Environment was designed and put into operation. Likewise, the reference environmental concentrations for said monitoring were defined. Although the manufacture and the use of PCBs were banned in several countries, exposure to PCBs is a constant concern due to the widespread distribution of these compounds in the environment and their persistence (Dai et al., 2016; Goel et al., 2016). Considering that the main source of feedstuff for rabbits is from vegetables and the TCDD compounds are fat-soluble which can be consumed and stored in the rabbit's fatty tissue and cause effects on the reproductive system. The aim of the present study is to investigate the effects of low doses of TCDD exposure in the buck genital tract, with emphasis on sperm quality in male rabbits using cytology, flow cytometry, and testes morphometric analysis.

## **2. Material and Method**

This study was realized in the Center of Research and Advanced Studies in Animal Health (CIESA), of the Faculty of veterinary medicine and zootechnics (FMVZ) of the Autonomous Mexico State University (UAEMex) and the laboratories of the Technological

University of the valley of Toluca (UTVT) in the State of Mexico, Mexico, and complied with the ethical standards set by the institution. The clinical signs were determined with all animals.

## **2.1. Animals**

### **2.1.1 Rabbits**

The study was performed following approval by the Veterinary Ethics Committee of the Faculty of veterinary medicine and zootechnics of the Autonomous Mexico State University. All experiments were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Hawkins *et al.*, 2011; Carbone e Austin, 2016), the basis of animal ethics guidelines of the Institutional Animals Ethics Committee (protocol no: 2011/186) and the basis of Canadian Council on Animal Care guidelines and **NOM-062-ZOO-1999**. The animals were maintained under perfect veterinary supervision in accordance with the guidelines of the regulation of scientific experiments on animals. The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Ethics Committee (IAEC) Thirty Adult male Rabbits model race New Zealand with 16 weeks old and a body weight of  $3585 \pm 0.453$ g. The adaptation period was 2 weeks before the experiment starts. Each animal was housed in a single cage ( $85 \times 40 \times 30$  cm) equipped with plastic footrests, a feeder and nipple drinker. Feedstuff and fresh water were always available to animals. Rabbits were kept under a controlled photoperiod of 16 h of light and 8 h of darkness, and a range of temperature between 15–20 °C and 55-60% relative humidity.

## **2.2. Experimental design**

The animals were randomly assigned to five experimental groups (N=6)

**Group I:** Negative control (NC), were fed a standard pellet diet, and water was provided *ad libitum* (without additives).

**Group II:** Vehicle control (VC), the same diet as NC, and corn oil was administrated.

**Group III:** Low dose (T-Low) of TCDD ( $0.375\mu\text{g}/\text{kg}$ ), with the same diet as NC.

**Group IV:** a Medial dose (T-Median) of TCDD ( $0.75\mu\text{g}/\text{kg}$ ), with the same diet as NC.

**Group V:** High dose (T-High) of TCDD (1.5µg/ kg), with the same diet as NC.

All animals were weighed and monitored during the 10 days of oral administration. The animals were observed daily for clinical signs. After 10 days of exposure to TCDD through the oral gavage, the animals were anesthetized with a combination of ketamine chlorohydrate (90 mg/kg) and xylazine chlorohydrate (10 mg/kg) administered intraperitoneally. A part of the sperm samples was dissolved in PBS and used for the flow cytometry analysis. Testes samples were taken and fixed in 10% formal saline for histological examination and morphometric analysis.

### **2.3. Preparation of TCDD**

The Dioxin, 2,3,7,8 TCDD (48599) Lot: LC 22998V, in its purest form, 10 µg/mL in toluene, analytical standard (Supelco), was obtained from Sigma-Aldrich Chemicals 3050 Spruce Street Saint Louis Mo 63103 USA. The Dioxin, 2,3,7,8 TCDD was dissolved in corn oil and stored in the dark at 4°C until use.

### **2.4. Body weight and weight of some reproductive organs**

Testes and epididymis were weighed. The spermatozoids from cauda epididymis were used for sperm counts, flow cytometry, and testes for morphometric analysis.

### **2.5. Analysis of semen parameters**

Semen quality was assessed in fresh. The following sperm quality parameters were measured: total motility (TM) (progressive motility (PM), non-progressive motility (NPM), immotile (IM). Malformation abnormal head (AH), abnormal tail (AT), and abnormal mid-piece (AMP) and Sperm concentrate (SC).

Sperm was collected from the epididymal secretion of the epididymis cauda. The secretion of the epididymis cauda was immediately placed in 50 µl phosphate saline solutions temperature was 37 °C and placed in a Petri dish. The sperm was counted in double Neubauer rolling and the total concentration was estimated. The sperm smear was stained by use of eosin-nigrosin staining technique (Björndahl *et al.*, 2003). Only sperm with head and tail was considered. To determine the vitality 200 spermatozoids were counted by a light microscope. The data were expressed in percentage of live sperm (colorless) and the

dead sperm (pigmented). The epididymis was isolated and cleaned of the surrounding adipose tissue and blood. By mincing the cauda of the epididymis in phosphate buffered saline (PBS), sperm cells were released, the solution was filtrated, and 0.5% eosin was added. For each male, the morphology of 200 sperm cells was examined. Evaluation criteria used 4 morphological categories for sperm cells according to (Wyrobek e Bruce, 1975).

The incidence of abnormalities in the head, neck/mid-piece and tail were assessed and at least 200 sperm cells were observed under 1000x magnification. A drop of the spermatic suspension was placed on a slide and observed immediately with microscope 10× magnification. Three types of spermatozoids were determinate with different types of motility: (Chapin *et al.*, 1992).

- Normal (sperm mobile in a linear way and fast).
- Mobile (*In-situ*) (sperm mobile in the same place).
- Immobile (without mobility).

## **2.6. Cytotoxicity and Apoptosis Assay**

Briefly, cauda epididymal sperms were washed twice in PBS, centrifuged at 1200 rpm for 5 min and resuspended in 1 ml of 1x assay buffer. Samples were redistributed in 100 µL aliquots, stained with 5 µL annexin V FITC conjugate and propidium iodide (PI), and incubated at room temperature for 15 minutes. After the incubation period, 400 µL of 1X Annexin-binding buffer was added to the tubes, mixed gently. As soon as possible, the stained cells were analyzed by flow cytometry and the fluorescence emission was measured at 530 nm. In this study, cytotoxicity was evaluated by observing the integrity of the sperm membrane with 7AAD ((7-Aminoactinomycin D). FITC AnnexinV / Dead Cell Apoptosis Kit (Catalog No. V13242, Invitrogen) was used to detect the translocation of PPS and type of cell death in the sperm of mice treated with TCDD.

## **2.7. Morphometric analysis of testes**



For quantitative assessment, the mean diameter of seminiferous tubule (DST) and thickness of the epithelium of the seminiferous tubules (EST) (from the basement membrane to lumen) in 10 tubules per testicular section and 30 sections per group were measured at  $\times 10$  magnifications by using the calibrated OLYSIA software (Soft Imaging System, version 3.2, Japan). Seminiferous tubule (ST) that were round or close to round were randomly selected for measurement. All samples were measured by a histologist in a blind fashion.

### **2.8. Statistical Analysis**

The data were processed with Statistical software package Info Stat (<http://www.infostat.com.ar>). Means (M), standard error (SE) were calculated. The intensity means fluorescence (IMF) was compared according to Student's t-test. The difference was regarded as significant at  $p < 0.05$  for all data. Anova and a Tuckey were applied for the other parameters.

## **3. Results**

### **3.1. Clinical signs and general effects**

Table 1 shows differences in the body weight of the animals during the experiment, for all groups, the control group and the treated groups with (0.75 $\mu$ g/kg) as a medium dose and (1.5 $\mu$ g/kg) as a high doses, after 10 days of the oral administration of TCDD. On the other hand, no mortality or clinical signs of toxicity were observed in rabbits. The rabbits showed differences in the weight of the reproductive organs testis and epididymis. In the weight of epididymis, it has been shown differences between the negative control group and the group treated with the medium dose (T-Median). The weight of testes had shown differences between the positive control group and the T-Median. The body weight means of the treated animals was transiently reduced on treated groups (Table 1) with respect to the control group.

### **3.2. Sperm physiological parameters**

The results showed notable differences in the concentration of sperms, a reduction is observed in the treated groups compared to the control group; the reduction in the T-High dose (226.67  $\times 10^6$  /ml) was more evident (Table 2). The percentages of dead sperms had been increased significantly ( $p < 0.05$ ) in 28.34% in the T-High treated group compared to

the NC. On the other hand, differences were observed between the negative control group and with the group of rabbits treated with high dose in head, and tail malformations of the sperm with values of 23.95% and 18.05% respectively ( $p < 0.05$ ).

Furthermore, regarding sperm motility, three categories were considered, progressive, non-progressive and immotile sperms. TCDD exposure induced significant changes in sperm motility after 10 days of administration (Table 2), with a significant decrease of 23.17 in the percentage of progressive sperm was found in rabbits exposed to 1.5  $\mu\text{g} / \text{kg}$  (T-High) and, simultaneously, an increase in the percentage of immotile sperm in the same group by (16.83%). It can be concluded that these doses of TCDD administered during 10 days had affected the quality of the sperm in rabbits.

### **3.3. Cytotoxicity and Apoptosis assays for Flow cytometry.**

The cytotoxicity and apoptosis in spermatozoa, that caused by the expose to different doses of TCDD which administered orally to the rabbits for 10 days had been shown in the results. Figure 1 shows the evaluation of different parameters, such as damage to the integrity of the sperm membrane FL3-7AAD (Fig 1 C-D), apoptosis FL1-Annexin V (Fig1 A-B); of the sperm population of the T-High group & NC group. In addition, Fig 1-E shows the percentage of dead spermatozoa killed by cytotoxicity with TCDD, marked with 7AAD and killed by Apoptosis marked with Annexin V from a rabbit exposed to 1.5  $\mu\text{g} / \text{kg}$  of TCDD. The death by apoptosis of the spermatozoa of the NC group was 1.09% in comparison with 8.09% of deaths due to apoptosis of the spermatozoa marked with Annexin V of the group of high doses. On the other hand, the death of sperm from the NC Group was 2.04% in comparison with the 36.5% of death caused by cytotoxicity of the TCDD (T-High). Figure 1-E shows the percentage of spermatozoa dead by apoptosis and cytotoxicity were 28.17%.

On the other hand, Figure 2 shows the multiple histograms of cytotoxicity (C-NC and F-T-High) and apoptosis (B-NC and E-T-High) by TCDD in sperm cells, where it was observed that all the animals of the high dose group which exposed to TCDD shown death in the experimental population due to apoptosis and cytotoxicity. This is corroborated in Figure 3 and 4, where significant differences for  $p \leq 0.05$  are observed between the MIF of the

negative control group and the high dose (T-High) group (1.5 µg / Kg). These results show the damage in the integrity of the membrane and apoptosis of the sperm population exposed to T-High of TCDD. There were also found differences among the Negative control group and the T-Median, T-Low and VC groups.

### **3.4. Morphometry assays**

Our study had been shown significant differences ( $p \leq 0.05$ ) among the epithelium of the seminiferous tubules (EST) of the Vehicle Control (VC), T-Median, T-High, and the NC group. On the other hand, significant differences ( $p \leq 0.05$ ) were found in the diameter of seminiferous tubule (DST). Particularly among the high dose (T-High), the medium dose (T-Median), the vehicle Control (VC) groups and Negative control (NC) groups (Figure 5). In addition, significant differences were found in the DST among the VC group and T-Low and T-High. In general, there was a reduction in the epithelium of the seminiferous tubules (EST) when there was an increase in the administered dose. In addition, Figure 6 shows the histopathology of the testes. The results also showed the correspondence with the morphometric analysis.

## **4. Discussion**

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) comprise a group of chemical compounds that have been examined extensively due to the potentially harmful effects on the humans' health. During the past decades, particular focus has been given to the harmful effects of EDCs on the reproductive system. In human populations, the majority of the studies pointed towards an association between exposure to EDCs for male and/or female reproductive system disorders, such as infertility, endometriosis, breast cancer, testicular cancer, poor sperm quality and/or function (Sifakis *et al.*, 2017). Both human and animal populations are continuously exposed to ubiquitous synthetic and naturally-occurring EDCs through diet, dermal contact and/or inhalation, therefore potentially compromising male reproductive health (Tavares *et al.*, 2016). Interest in the public health effects of the endocrine disrupting chemicals with regard to the effects of long-term low-dose exposures is increasing (Veerasingam e Ali Mohd, 2013). In this study, the effect of low doses (0.375; 0.75; 1.5 µg /Kg) of TCDD on the quality of sperm was analyzed. These animals were

exposed for 10 days to three low dose levels of TCDD. On the other hand, the effect of this endocrine disruptor on apoptosis and the death of spermatozoa in rabbits was analyzed using flow cytometry (FCM). Finally, the morphometric of the seminiferous tubules was performed. During and at the end of our study, the animals were in general good condition except that the fall in body weight gain in the high dose-(TCDD)-treated groups was noticed.

Reproductive physiology involves complex biological processes that can be disrupted by exposure to environmental contaminants. This exposure may be partially responsible for the increase in male reproductive pathologies classified as testicular dysgenesis syndromes, including hypospadias, cryptorchidism, testicular cancer, and low sperm production in adulthood (Lucas *et al.*, 2009). The loss of body weight has also been reported in mice, rabbits, and dogs (Fisher *et al.*, 2005) and that was associated with the reduction of feed intake. Several studies have identified plausible endocrine disruptors with the potential to disrupt weight regulation. Evidence from studies in animals has suggested that endocrine disruptors may be involved in the alteration of energy metabolism and homeostasis of thyroid hormone (Kirkley e Sargis, 2014). This coincides with the chronic studies conducted in five different rabbit pens, each with 20 females and one male were established on low TCDD contaminated soils in low dose 0.8 to 23.2 pg/m<sup>3</sup> during 5 months (Strik e De Wit, 1980). The doses of our study were a little higher and administered orally by gavage, therefore the reduction in body weight was much higher than in this study. In another study a similar decrease in body weight was performed with different rat lines. The first two A and B are TCDD-resistant Han / Wistar and the other of line C was TCDD-sensitive Long-Evans [Turku / AB; L-E] rats. The resistance was linked to a mutated H / W-type aryl hydrocarbon receptor allele in line A and to an H / W-type unknown " B " allele in line B. Line C. rats do not have resistance alleles. These animals were administered for 17 days with TCDD in doses of 0.1, 10, 100, 100 and 100 µg / kg. A reduction in body weight was observed as the dose was increased (Simanainen *et al.*, 2004). On the other hand, in our study it was observed that the weight of the testes of the T-Low and T-High treated groups with TCDD differ significantly from the weight of the negative control

(NC). The epididymis of the treated rabbits showed a significant increase in weight, significant differences were observed  $p \leq 0.05$  between the T-Median group and the NC and VC groups. On the contrary, another study was conducted in 2008 in mice where the effects of exposure to TCDD in lactation were investigated. TCDD ( $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ ) was administered to a C57BL / 6 Mothers mouse for 4 days from the day of delivery. And the weight of epididymis were analyzed at 30 and 60 days postnatal, a reduction was observed in the weight of this organ (Jin *et al.*, 2010). The TCDD treated animals showed a reduction in epididymis sperm number and sperm motility similar to the other studies carried out by other authors (Sanabria *et al.*, 2016). In this study, the exposure to tetra chlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in male rats was shown, a reduction in sperm has been shown, and there were alterations in the motility and in the transit time of the spermatozoa. The trans-generational effect of intrauterine exposure at low doses of TCDD on sperm quality was evaluated. In recent years, many environmental chemicals have been associated with decreased numbers of sperm stored in the cauda epididymis, with little or no reduction in sperm production. These rabbits also suffered impaired spermatogenesis with a concomitant drop in the rate and efficiency of spermatozoa production and the viability of spermatozoa already stored, similar observations have been reported in male rats. (Ateşşahin *et al.*, 2010; Sönmez *et al.*, 2011). These reports coincide with our results since alterations in morphology and sperm motility in rabbits was observed at low doses 0.375; 0.75;  $1.5 \mu\text{g} / \text{Kg}$  which administered for 10 days.

The epididymis is the organ in which sperm mature by developing the capacity for progressive motion and fertilizing ability. There is evidence that sperm quality in humans and other animals has diminished, in parallel with increased adverse trends in male reproductive health such as testicular cancer, cryptorchidism, and hypospadias (De Grava Kempinas e Klinefelter, 2014). This suggests that the epididymis is the functional target of these toxic substances and that the transit of sperm through the epididymis is accelerated by these exposures. Interestingly, epididymis and vas deferens are less sensitive to TCDD than prostate or testis. Aryl hydrocarbon receptor (AhR) plays multiple

important functions in adaptive responses. The down regulation of AhR expression after TCDD treatment was revealed in the spermatogenic cells at different stages and the epididymal epithelial cells, but not in the Sertoli and Leydig cells (Wajda *et al.*, 2017). Of documented reproductive developmental effects in the literature, spermatogenesis is considered the most sensitive adverse effect of TCDD; this product is considered a dangerous endocrine disruptor (EDCs). Spermatogenesis depends on the action of testosterone and this hormone can be affected by EDCs that represent a wide class of exogenous substances that cause adverse effects in the endocrine system mainly when interacting with the nuclear system of hormone receptors (NRs) (Balaguer *et al.*, 2017). EDCs are not hormones but are called as such since some of the environmental chemicals use part of their pathways: hormone receptors, and/or modulation of enzymes activated or inhibited by natural hormones (Bouchard, 2017). The results of our study showed that even at low doses the TCDD affects the quality of sperm. Recently, the effects of the environment on man's fertility have been reported, along with the description of a decrease in sperm counts, as well as an increase in Hypospadias and testicular cancers. This effect could be expected since this element in this particular oxidation state could affect spermatogenesis and thus altering spermatozoa production, as has been reported by (Agarwal e Allamaneni, 2011; Agarwal *et al.*, 2014). In this work for the analysis of the integrity of the membrane and apoptosis of the spermatozoa exposed to TCDD, flow cytometry was used. The plasma membrane is not only the border of the sperm cell, but it appears to be a very dynamic structure. The sperm plasma membrane is an important structure that functions to protect sperm against extracellular injuries and to adapt the spermatozoon itself, to a variety of physiological and environmental challenges, including capacitation and acrosomal exocytosis at the time of fertilization (Flesch e Gadella, 2000; Tapia *et al.*, 2012). In our study we examined the effects of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the membrane integrity of rabbits sperms, observing significant differences between the NC group and the group of T-High dose. Figure 1D shows 36.8% of dead sperm. In the previous study referred to, it was shown that even in the recent ejaculate a proportion of 7 and 15% of the cells have deteriorated plasma

membranes. In the present study, the use of the combination of Annexin V/IP and 7ADD to detect dead and apoptotic live spermatozoa in fresh samples obtained from rabbits which exposed for 10 days at doses (0.375; 0.75; 1.5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) to TCDD. Therefore, Annexin V labeling can be used as a marker of early-stage apoptosis prior to morphological changes occur. Annexin V, by the binding to phosphatidylserine, reveals the cells with early membrane alterations and the cells die due to apoptosis (Wlodkowic *et al.*, 2011). Although a motile spermatozoon could be defined as viable, the term ‘viable spermatozoon’ is often linked to an intact plasma membrane, since the plasmalemma is pivotal for sperm interactions with other cells and their environment. Flow cytometry is currently recognized as a robust tool for the evaluation of sperm quality and function. These new techniques in flow cytometry can simultaneously measure damage to different sperm regions and/or changes in functionality (Zembruski *et al.*, 2012). The use of flow cytometry to study the effects on apoptosis and damage in membrane integrity in sperm from rabbits exposed to low doses of TCDD may generate concern for possible effects in humans especially if we know that dioxins are lipophilic chemicals that resist biological and environmental degradation, making them persistent in the environment (Chrenek *et al.*, 2012). The subpopulation of live cells using new triple staining concurs with the subpopulation of live cells using the well-validated Annexin V/PI assay. Also, the percentage of early damaged spermatozoa was higher with the Annexin V/PI assay (Hossain *et al.*, 2011). This might reflect an increase in membrane permeability, preceding the transposition of phosphatidylserine during an evolving TCDD damage. On the other hand, the prevalence of apoptosis in the T-High dose group was 8.62%. (Figure 1B). Apoptosis is a directed series of cellular, morphological, and biochemical alterations that result in cell death without eliciting an inflammatory response. This includes critical events of the signaling cascade, such as the activation of caspases, the interruption of mitochondrial transmembrane potential, the externalization of phosphatidylserine and the fragmentation of DNA. Activation of apoptosis signaling has a major impact on the fertilization potential of sperm (Grünwald *et al.*, 2017). Apoptosis has been implicated in sperm chromatin damage; it is unclear whether apoptosis occurs through cytoplasmic or mitochondrial pathways (Kim *et*

*al.*, 2013). Apoptosis is frequently observed during the early testicular development. Moreover, the exact molecular mechanism responsible for the induction of germ cell death has not been identified, except for the involvement of androgen in the prevention of germ cell apoptosis in the adult rat testis (Henriksén *et al.*, 1995; Kheradmand *et al.*, 2012). The possible explanations for TCDD-induced male reproductive toxicity are that TCDD exposure activates the aryl hydrocarbon receptor (Fisher *et al.*, 2005) and leads to oxidative stress (Latchoumycandane e Mathur, 2002). Oxidative damage to testicular cells induced by various xenobiotics, products of abnormal metabolism or reactive oxygen species (ROS) can result in testicular dysfunction leading to male infertility (Shrilatha e Muralidhara, 2007). Consistently, several published literature showed the significant effects of endocrine disruptors such as TCDD may be taken up by living organisms and accumulate via the food chain, and are exposed to humans via inhalation and the ingestion of food; therefore, they pose potential threats to the ecosystem and human health. TCDD has shown about fertility, sex ratio at birth, embryonic development, sperm count, sperm functions, sperm morphology, DNA damage and chromatin remodeling (Toppari *et al.*, 2016; Sidorkiewicz *et al.*, 2017). In our study, we showed a greater percentage of sperm cells marked by 7AAD than by AnnexinV / IP (Figure 2). In additions, morphometric findings on testes showed TCDD treatment led to the loss of germ cells and decreased spermatogenesis cell lines, reducing epithelium and diameter of the seminiferous tubules Figure 5 and 6. The adult testis is a complex organ that is composed of seminiferous tubules, which are enclosed by a surrounding interstitium (Mehraein e Negahdar, 2011). Numerous studies have shown that this organ is not only a place for sperm storage and transit but also plays an active role in sperm remodeling (Gervasi e Visconti, 2017).

The seminiferous tubules are the site of spermatogenesis, where germ cells develop into spermatozoa in close interaction with Sertoli cells (Figueiredo *et al.*, 2016). The major cell types in seminiferous tubule include spermatogenic cells (spermatogonia, spermatocytes, spermatids, and spermatozoa) and Sertoli cells (supporting/ nursing cells) (Tripathi *et al.*, 2015). The interstitial space around the seminiferous tubules contains another somatic cell type, the Leydig cell, which is responsible for testosterone production. FSH and



testosterone are essential hormones for spermatogenesis during puberty and in adulthood. FSH receptor is localized in Sertoli cells, whereas androgen receptor is localized in Sertoli cells, Leydig cells, and peritubular cells, but not in germ cells. FSH alone can support spermatogonial proliferation, whereas meiotic and post meiotic differentiation requires testosterone action synergistic with FSH. (Oliveira Filho *et al.*, 2010). Moreover, chemicals that suppress testosterone production by the Leydig cells will adversely impact the epididymis (Dhanabalan *et al.*, 2011). Leydig cells have a major influence on spermatogenesis through the actions of testosterone on both the seminiferous tubule and the pituitary. Testosterone deprivation reduces the number of qualitatively normal sperm entering the epididymis, as well as causing regression of the epididymal epithelium, and reduces the androgen-dependent facets of sperm maturation (Goyal *et al.*, 1994). Many reports have suggested that environmental endocrine disruptors, which act to mimic estrogens or act as anti-estrogens or anti-androgens, are detrimental to reproduction and may promote abnormalities such as a decrease in sperm count (Mclachlan, 2016). The toxic effects of TCDD in male reproductive systems include a reduction in the size of the testes, prostate gland, and seminal vesicle, as well as a decrease in sperm count. Particularly in our study, the results had been shown differences in the diameter and epithelium of the seminiferous tubules of rabbits exposed to low doses of TCDD (Fig 5). In contrast to the studies carried out in rodents that were exposed to the p-nonylphenol (p-NP) endocrine disruptor that belongs to a group of alkylphenols polyethoxylated and that is used in detergents, paints, herbicides, pesticides, and cosmetics. It was reported that p-NP have estrogenic properties and nevertheless evidenced in studies of reproductive toxicology that exerts negative effects on the testes and epididymis of rodents (De Jager *et al.*, 1999). On the other hand, assays conducted by Kilian *et al.*, 2007 provide evidence that rat exposure to a relevant environmental mixture of known endocrine disrupting substances during pregnancy, lactation and direct exposure up to 14 weeks has a profoundly damaging effect on the male reproductive parameters in rats (Kilian *et al.*, 2007). There are many differences between the studies conducted on a single endocrine disruptor with respect to

the mixture of it, but the pure TCDD in our study it had negative effects on the reproductive system at the administered doses.

### **Conclusion**

In conclusion, the results of the present study indicate that even at these low doses of TCDD cause toxicity in the rabbit reproductive system, so it can be suggested that fertility problems could occur. This study revealed the toxic effects of low doses administered of TCDD on sperm quality, membrane integrity and apoptosis in sperm cells using flow cytometry also, the damage in the epithelium of the seminiferous tubules (EST) and the general reduction in the diameter of the seminiferous tubules (DST) in rabbits at all doses. It is imperative to investigate the effects of these EDCs at different concentrations on male reproductive health in animals and in humans.

### **Acknowledgments**

The authors acknowledge the financial support from the Autonomous Mexico State University, which made the present work possible. Mrs. Heba Yehia Anwar Elsayed thanks the National Council for Science and Technology (CONACYT, Mexico) for the scholarship for her Ph.D.

### **References**

AGARWAL, A.; ALLAMANENI, S. S. Free radicals and male reproduction. **J Indian Med Assoc**, v. 109, n. 3, p. 184-7, Mar 2011. ISSN 0019-5847. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22010591>>.

AGARWAL, A. et al. Effect of oxidative stress on male reproduction. **World J Mens Health**, v. 32, n. 1, p. 1-17, Apr 2014. ISSN 2287-4208. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24872947>>.

ATEŞŞAHİN, A. et al. Modulatory effects of lycopene and ellagic acid on reproductive dysfunction induced by polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) in male rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 106, n. 6, p. 479-89, Jun 2010. ISSN 1742-7843. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20074268>>.

BALAGUER, P. et al. Structural and functional evidences for the interactions between nuclear hormone receptors and endocrine disruptors at low doses. **C R Biol**, v. 340, n. 9-10, p. 414-420, 2017 Sep - Oct 2017. ISSN 1768-3238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29126514> >.

BJÖRNDAHL, L.; SÖDERLUND, I.; KVIST, U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. **Hum Reprod**, v. 18, n. 4, p. 813-6, Apr 2003. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12660276> >.

BOCK, K. W. From TCDD-mediated toxicity to searches of physiologic AHR functions. **Biochem Pharmacol**, v. 155, p. 419-424, Sep 2018. ISSN 1873-2968. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30055148> >.

BOUCHARD, P. Endocrine-disrupting chemicals, a multifaceted danger. **C R Biol**, v. 340, n. 9-10, p. 401-402, 2017 Sep - Oct 2017. ISSN 1768-3238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29126511> >.

CARBONE, L.; AUSTIN, J. Pain and Laboratory Animals: Publication Practices for Better Data Reproducibility and Better Animal Welfare. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0155001, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27171143> >.

CHAPIN, R. E. et al. Methods for assessing rat sperm motility. **Reprod Toxicol**, v. 6, n. 3, p. 267-73, 1992. ISSN 0890-6238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1591485> >.

CHEN, Y. Y.; CHAN, K. M. Modulations of TCDD-mediated induction of zebrafish *cyp1a1* and the AHR pathway by administering Cd. **Chemosphere**, v. 210, p. 577-587, Nov 2018. ISSN 1879-1298. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30029150> >.

CHRENEK, P.; MAKAREVICH, A. V.; SIMON, M. Viability and apoptosis in spermatozoa of transgenic rabbits. **Zygote**, v. 20, n. 1, p. 33-7, Feb 2012. ISSN 1469-8730. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21144118> >.

DAI, Q.; MIN, X.; WENG, M. A review of polychlorinated biphenyls (PCBs) pollution in indoor air environment. **J Air Waste Manag Assoc**, v. 66, n. 10, p. 941-50, 10 2016. ISSN 2162-2906. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27191511> >.

DE GRAVA KEMPINAS, W.; KLINEFELTER, G. R. Interpreting histopathology in the epididymis. **Spermatogenesis**, v. 4, n. 2, p. e979114, 2014 May-Aug 2014. ISSN 2156-5554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26413396> >.

DE JAGER, C.; BORNMAN, M. S.; OOSTHUIZEN, J. M. The effect of p-nonylphenol on the fertility potential of male rats after gestational, lactational and direct exposure. **Andrologia**, v. 31, n. 2, p. 107-13, Mar 1999. ISSN 0303-4569. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10097800> >.

DHANABALAN, S. et al. Effect of restraint stress on 2,3,7,8 tetrachloro dibenzo-p-dioxin induced testicular and epididymal toxicity in rats. **Hum Exp Toxicol**, v. 30, n. 7, p. 567-78, Jul 2011. ISSN 1477-0903. Disponível em: < [https://www.japsonline.com/admin/php/uploads/1421\\_pdf.pdf](https://www.japsonline.com/admin/php/uploads/1421_pdf.pdf) >.

EHRlich, A. K. et al. TCDD, FICZ, and Other High Affinity AhR Ligands Dose-Dependently Determine the Fate of CD4+ T Cell Differentiation. **Toxicol Sci**, v. 161, n. 2, p. 310-320, Feb 2018. ISSN 1096-0929. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29040756> >.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, R. et al. A Critical Review about Human Exposure to Polychlorinated Dibenzop-Dioxins (PCDDs), Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs) and Polychlorinated Biphenyls (PCBs) through Foods. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 55, n. 11, p. 1590-617, 2015. ISSN 1549-7852. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24279584> >.

FIGUEIREDO, A. F. et al. Sertoli cells are capable of proliferation into adulthood in the transition region between the seminiferous tubules and the rete testis in Wistar rats. **Cell Cycle**, v. 15, n. 18, p. 2486-96, Sep 2016. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27420022> >.

FISHER, M. T.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. S. Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of loss of mitochondrial membrane potential in epididymal spermatozoa by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). **Toxicol Lett**, v. 157, n. 2, p. 99-107, Jun 2005. ISSN 0378-4274. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15836997> >.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochim Biophys Acta**, v. 1469, n. 3, p. 197-235, Nov 2000. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11063883> >.

GERVASI, M. G.; VISCONTI, P. E. Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. **Andrology**, v. 5, n. 2, p. 204-218, 03 2017. ISSN 2047-2927. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28297559> >.

GOEL, A.; UPADHYAY, K.; CHAKRABORTY, M. Investigation of levels in ambient air near sources of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in Kanpur, India, and risk assessment due to inhalation. **Environ Monit Assess**, v. 188, n. 5, p. 278, May 2016. ISSN 1573-2959. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27061805> >.

GOYAL, H. O.; HUTTO, V.; MALONEY, M. A. Effects of androgen deprivation in the goat epididymis. **Acta Anat (Basel)**, v. 150, n. 2, p. 127-35, 1994. ISSN 0001-5180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7976193> >.

GRUNEWALD, S.; FITZL, G.; SPRINGSGUTH, C. Induction of ultra-morphological features of apoptosis in mature and immature sperm. **Asian J Androl**, v. 19, n. 5, p. 533-537, 2017 Sep-Oct 2017. ISSN 1745-7262. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27270340> >.

HARO-GARCÍA, L. et al. Are Mexican agricultural farmlands PCDD/F soil reservoirs? **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 88, n. 6, p. 813-5, Jun 2012. ISSN 1432-0800. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22437565> >.

HATTORI, Y. et al. [The Effect of Maternal Exposure to Dioxins on the Level of Thyroid Hormone in Developing Pups]. **Fukuoka Igaku Zasshi**, v. 106, n. 5, p. 127-34, May 2015. ISSN 0016-254X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26226673> >.

HAWKINS, P. et al. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. **Lab Anim**, v. 45, n. 1, p. 1-13, Jan 2011. ISSN 1758-1117. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21123303> >.

HENRIKSÉN, K.; HAKOVIRTA, H.; PARVINEN, M. Testosterone inhibits and induces apoptosis in rat seminiferous tubules in a stage-specific manner: in situ quantification in squash preparations after administration of ethane dimethane sulfonate. **Endocrinology**, v. 136, n. 8, p. 3285-91, Aug 1995. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7628362> >.

HOSSAIN, M. S. et al. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. **Asian J Androl**, v. 13, n. 3, p. 406-19, May 2011. ISSN 1745-7262. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21478895> >.

JIN, M. H. et al. Toxic effects of lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on development of male reproductive system: involvement of antioxidants, oxidants, and p53 protein. **Environ Toxicol**, v. 25, n. 1, p. 1-8, Feb 2010. ISSN 1522-7278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19085997> >.

KHERADMAND, A. et al. Ghrelin modulates testicular germ cells apoptosis and proliferation in adult normal rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 419, n. 2, p. 299-304, Mar 2012. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22360851> >.

KILIAN, E. et al. Simultaneous exposure to low concentrations of dichlorodiphenyltrichloroethane, deltamethrin, nonylphenol and phytoestrogens has negative effects on the reproductive parameters in male Sprague-Dawley rats. **Andrologia**, v. 39, n. 4, p. 128-35, Aug 2007. ISSN 0303-4569. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17683461> >.

KIM, H. H. et al. Flow cytometric characterization of apoptosis and chromatin damage in spermatozoa. **Reprod Biomed Online**, v. 26, n. 4, p. 393-5, Apr 2013. ISSN 1472-6491. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23415994> >.

KIRKLEY, A. G.; SARGIS, R. M. Environmental endocrine disruption of energy metabolism and cardiovascular risk. **Curr Diab Rep**, v. 14, n. 6, p. 494, Jun 2014. ISSN 1539-0829. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24756343> >.

LATCHOUMYCANDANE, C.; MATHUR, P. P. Effects of vitamin E on reactive oxygen species-mediated 2,3,7,8-tetrachlorodi-benzo-p-dioxin toxicity in rat testis. **J Appl Toxicol**, v. 22, n. 5, p. 345-51, 2002 Sep-Oct 2002. ISSN 0260-437X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12355564> >.

LUCAS, B.; FIELDS, C.; HOFMANN, M. C. Signaling pathways in spermatogonial stem cells and their disruption by toxicants. **Birth Defects Res C Embryo Today**, v. 87, n. 1, p. 35-42, Mar 2009. ISSN 1542-9768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19306349> >.

MCLACHLAN, J. A. Environmental signaling: from environmental estrogens to endocrine-disrupting chemicals and beyond. **Andrology**, v. 4, n. 4, p. 684-94, 07 2016. ISSN 2047-2927. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27230799> >.

MEHRAEIN, F.; NEGAHDAR, F. Morphometric evaluation of seminiferous tubules in aged mice testes after melatonin administration. **Cell J**, v. 13, n. 1, p. 1-4, 2011. ISSN 2228-5806. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23671820> >.

OLIVEIRA FILHO, A. B. et al. Microdissection testicular sperm extraction causes spermatogenic alterations in the contralateral testis. **Genet Mol Res**, v. 9, n. 3, p. 1405-13, 2010. ISSN 1676-5680. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20662155> >.

PANDINI, A. et al. Detection of the TCDD binding-fingerprint within the Ah receptor ligand binding domain by structurally driven mutagenesis and functional analysis. **Biochemistry**, v. 48, n. 25, p. 5972-83, Jun 2009. ISSN 1520-4995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19456125> >.

PIZARRO-ARÁNGUIZ, N. et al. Occurrence, variability and human exposure to Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins (PCDDs), Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs) and Dioxin-Like Polychlorinated Biphenyls (DL-PCBs) in dairy products from Chile during the 2011-2013 survey. **Chemosphere**, v. 126, p. 78-87, May 2015. ISSN 1879-1298. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25592463> >.

REBOURCET, D. et al. The effects of an in utero exposure to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin on male reproductive function: identification of Ccl5 as a potential marker. **Int J Androl**, v. 33, n. 2, p. 413-24, Apr 2010. ISSN 1365-2605. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20059583> >.

RODRÍGUEZ-DOZAL, S. et al. Persistent organic pollutant concentrations in first birth mothers across Mexico. **J Expo Sci Environ Epidemiol**, v. 22, n. 1, p. 60-9, 2012 Jan-Feb 2012. ISSN 1559-064X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21971379> >.

SANABRIA, M. et al. Sperm quality and fertility in rats after prenatal exposure to low doses of TCDD: A three-generation study. **Reprod Toxicol**, v. 65, p. 29-38, 10 2016. ISSN 1873-1708. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27352640> >.

SCHUSTER, J. K. et al. Assessing polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans in air across Latin American countries using polyurethane foam disk passive air samplers. **Environ Sci Technol**, v. 49, n. 6, p. 3680-6, Mar 2015. ISSN 1520-5851. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25686404> >.

SHRILATHA, B.; MURALIDHARA. Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: its progression and genotoxic consequences. **Reprod Toxicol**, v. 23, n. 4, p. 578-87, Jun 2007. ISSN 0890-6238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360155> >.

SIDORKIEWICZ, I. et al. Endocrine-disrupting chemicals-Mechanisms of action on male reproductive system. **Toxicol Ind Health**, v. 33, n. 7, p. 601-609, Jul 2017. ISSN 1477-0393. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28464759> >.

SIFAKIS, S. et al. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 51, p. 56-70, Apr 2017. ISSN 1872-7077. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28292651> >.

SIMANAINEN, U. et al. Adult 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposure and effects on male reproductive organs in three differentially TCDD-susceptible rat lines. **Toxicol Sci**, v. 81, n. 2, p. 401-7, Oct 2004. ISSN 1096-6080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15240895> >.

STRIK, J. J.; DE WIT, J. M. Health aspects of rabbits in a low-TCDD contaminated area. **Int J Biochem**, v. 12, n. 5-6, p. 999-1001, 1980. ISSN 0020-711X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7450162> >.

SU, P. H. et al. Thyroid and growth hormone concentrations in 8-year-old children exposed in utero to dioxins and polychlorinated biphenyls. **J Toxicol Sci**, v. 40, n. 3, p. 309-19, Jun 2015. ISSN 1880-3989. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25972192> >.

SÖNMEZ, M. et al. Attenuating effect of lycopene and ellagic acid on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced spermiotoxicity and testicular apoptosis. **Drug Chem Toxicol**, v. 34, n. 4, p. 347-56, Oct 2011. ISSN 1525-6014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21714773> >.

TAPIA, J. A. et al. The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope. **Reprod Domest Anim**, v. 47 Suppl 3, p. 65-75, Jun 2012. ISSN 1439-0531. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22681300> >.

TAVARES, R. S. et al. The non-genomic effects of endocrine-disrupting chemicals on mammalian sperm. **Reproduction**, v. 151, n. 1, p. R1-R13, Jan 2016. ISSN 1741-7899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26585413> >.

TOPPARI, J.; RODPRASERT, W.; KOSKENNIEMI, J. J. Exposure Variation and Endocrine Disruption of the Male Reproductive System. **Horm Res Paediatr**, v. 86, n. 4, p. 247-252, 2016. ISSN 1663-2826. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27255653> >.

TRIPATHI, U. K. et al. Morphometric evaluation of seminiferous tubule and proportionate numerical analysis of Sertoli and spermatogenic cells indicate differences between crossbred and purebred bulls. **Vet World**, v. 8, n. 5, p. 645-50, May 2015. ISSN 0972-8988. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27047150> >.

VEERASINGAM, S. A.; ALI MOHD, M. Assessment of endocrine disruptors - DDTs and DEHP (plasticizer) in source water: a case study from Selangor, Malaysia. **J Water Health**, v. 11, n. 2, p. 311-23, Jun 2013. ISSN 1477-8920. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23708578> >.

WAJDA, A. et al. Cell and region specificity of Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) system in the testis and the epididymis. **Reprod Toxicol**, v. 69, p. 286-296, Apr 2017. ISSN 1873-1708. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28341572> >.



WANG, S. L. et al. Body burdens of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls and their relations to estrogen metabolism in pregnant women. **Environ Health Perspect**, v. 114, n. 5, p. 740-5, May 2006. ISSN 0091-6765. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16675430>>.

WLODKOWIC, D. et al. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. **Methods Cell Biol**, v. 103, p. 55-98, 2011. ISSN 0091-679X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21722800>>.

WYROBEK, A. J.; BRUCE, W. R. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 72, n. 11, p. 4425-9, Nov 1975. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1060122>>.

ZEMBRUSKI, N. C. et al. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. **Anal Biochem**, v. 429, n. 1, p. 79-81, Oct 2012. ISSN 1096-0309. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22796502>>.

## TABLES AND FIGURES

Table 1. Body and reproductive organs weight

Treatment/ Rabbits	BW(final)	Epididymis W	Testes W
Control	3157.5 <sup>a</sup>	0.92 <sup>a</sup>	2.95 <sup>a</sup>
Control (vehicle)	3166.7	0.93 <sup>b</sup>	2.84
TCDD(0.375µg/kg)	2862.3	0.97	2.83 <sup>a</sup>
TCDD(0.75µg/kg)	2742.8 <sup>a</sup>	0.98 <sup>ab</sup>	2.80 <sup>a</sup>
TCDD(1.5µg/kg)	2704.8 <sup>a</sup>	0.96	2.82 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Different superscripts following means in the column indicate differences at p<0.05

Table 2. Effects of TCDD on the physiological parameters of rabbits' sperm after 10 days of exposure

Treatment	Sperm concentrate (10 <sup>6</sup> /ml)	normal sperm	Malformation			% dead	% motility		
			% abnormal head	% abnormal tail	% abnormal mid-piece		% progressive	% non progressive	% immotile
Rabbits									
NC	276.5 <sup>a</sup>	77.16 <sup>a</sup>	12.70 <sup>a</sup>	11.80 <sup>a</sup>	-	25.66 <sup>a</sup>	73.50 <sup>a</sup>	14.56 <sup>a</sup>	12.00 <sup>a</sup>
VC	278.83 <sup>b</sup>	77.33 <sup>b</sup>	12.72 <sup>b</sup>	9.95 <sup>b</sup>	-	25.66 <sup>b</sup>	72.66 <sup>b</sup>	14.41 <sup>b</sup>	13.00 <sup>b</sup>
T-Low (0.37µg/kg)	243.33 <sup>abc</sup>	61.66 <sup>abc</sup>	20.75 <sup>abc</sup>	17.38 <sup>abc</sup>	-	46.50 <sup>abc</sup>	60.33 <sup>abc</sup>	23.33 <sup>ab</sup>	16.33 <sup>ac</sup>
T-Median (0.75µg/kg)	251.17 <sup>ab</sup>	70.33 <sup>abcd</sup>	18.97 <sup>abcd</sup>	10.70 <sup>cd</sup>	-	37.33 <sup>abcd</sup>	54.00 <sup>abc</sup>	22.67 <sup>ab</sup>	23.33 <sup>abc</sup>
T-High (1.5µg/kg)	226.67 <sup>abcd</sup>	58.00 <sup>abcd</sup>	23.95 <sup>abcd</sup>	18.05 <sup>abd</sup>	-	54.00 <sup>abcd</sup>	50.33 <sup>abc</sup>	20.83 <sup>ab</sup>	28.83 <sup>abc</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> The differences among the treated groups are significant according to Student's test with p<0.05

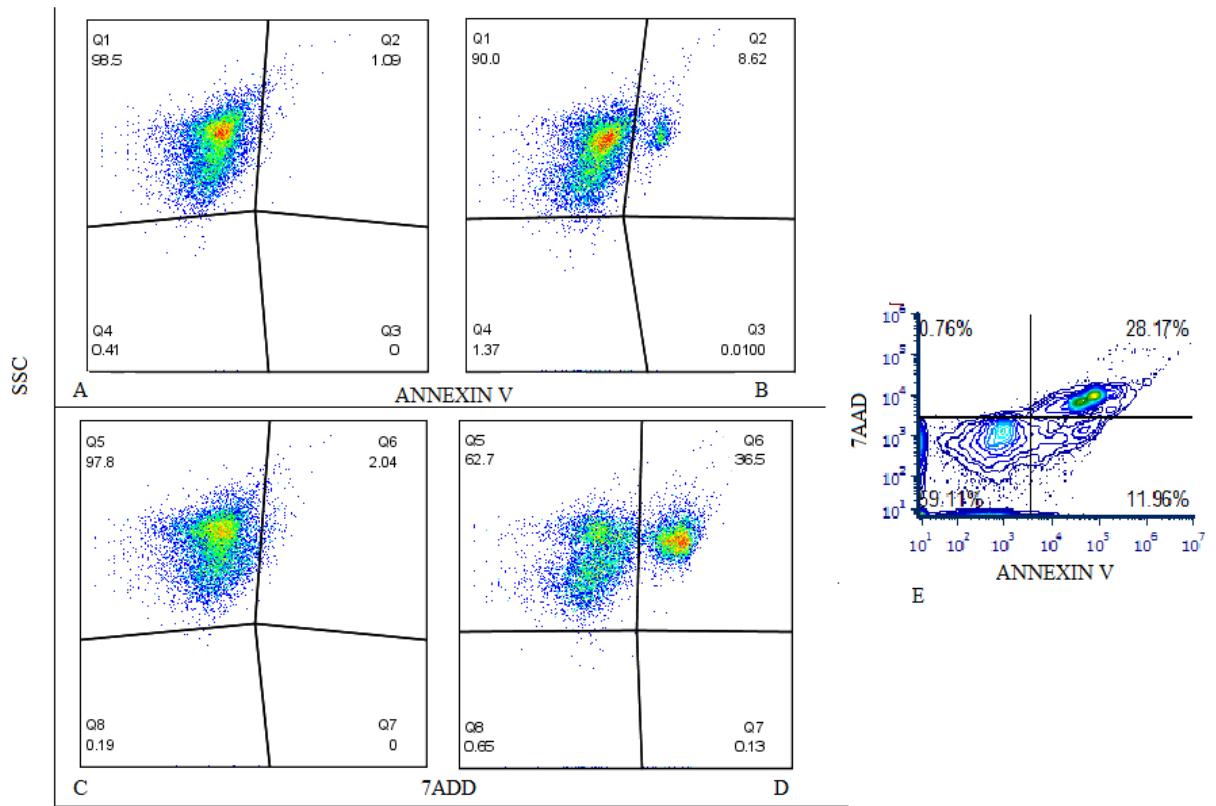


Figure 1. Populations of rabbits spermatozoa labeled with 7AAD and AnnexinV exposed to TCDD (T-High 1.5 mg/Kg) (FL1:Annexin V/SSC: Complexity; FL3:7AAD/SSC:Complexity)

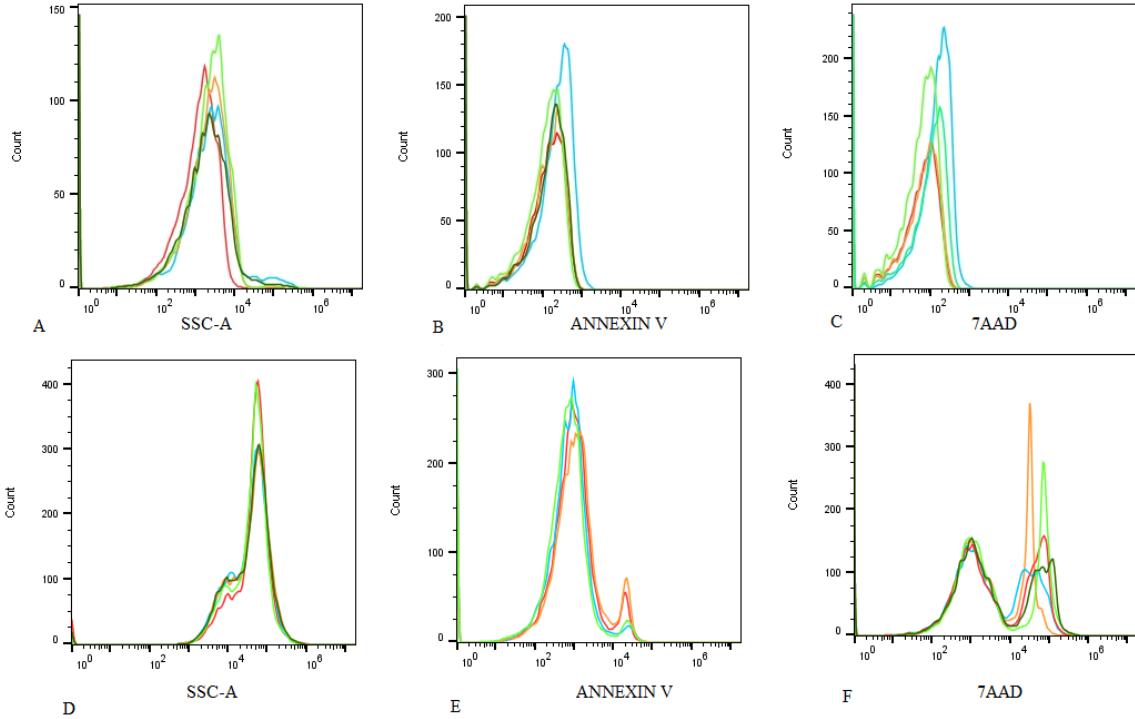


Figure 2. Multiple histograms of TCDD cytotoxicity (C-NC and F-T-High) and apoptosis (B-NC and E-T-High) in spermatic cells of the Negative control (NC) group and Treatment High dose (T-High)

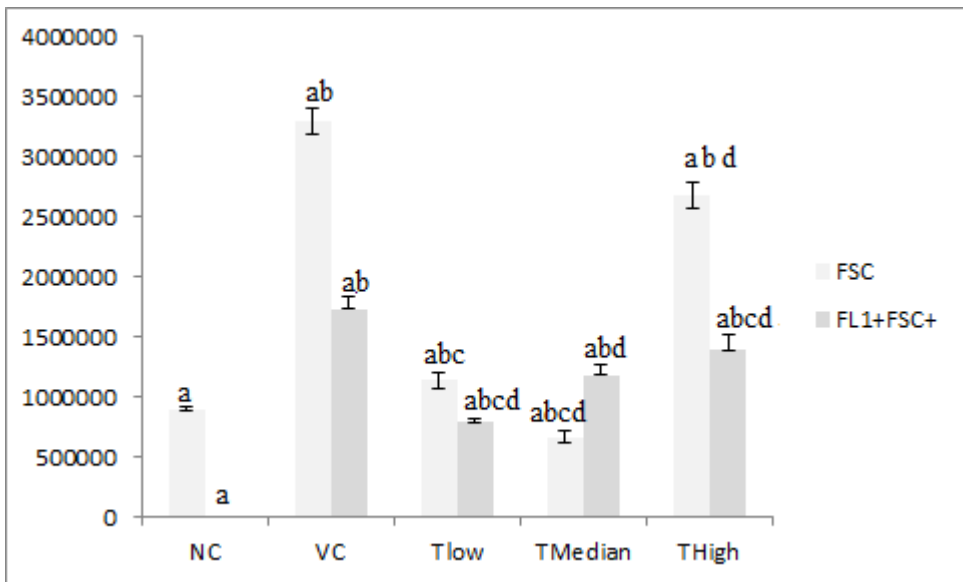


Figure 3. Apoptosis of rabbits spermatozoa exposed to TCDD (0.375; 0.75; 1.5 mg/Kg) using flow cytometry (\*N.C: Negative Control; V.C : Vehicle control; T-Low: Low dose; T-Median: Median dose; T-High: High Dose; and FL1: AnexinV/FSC:Size. <sup>a,b,c,d</sup>The differences among the treated groups are significant according to Student's test with  $p < 0.05$ )

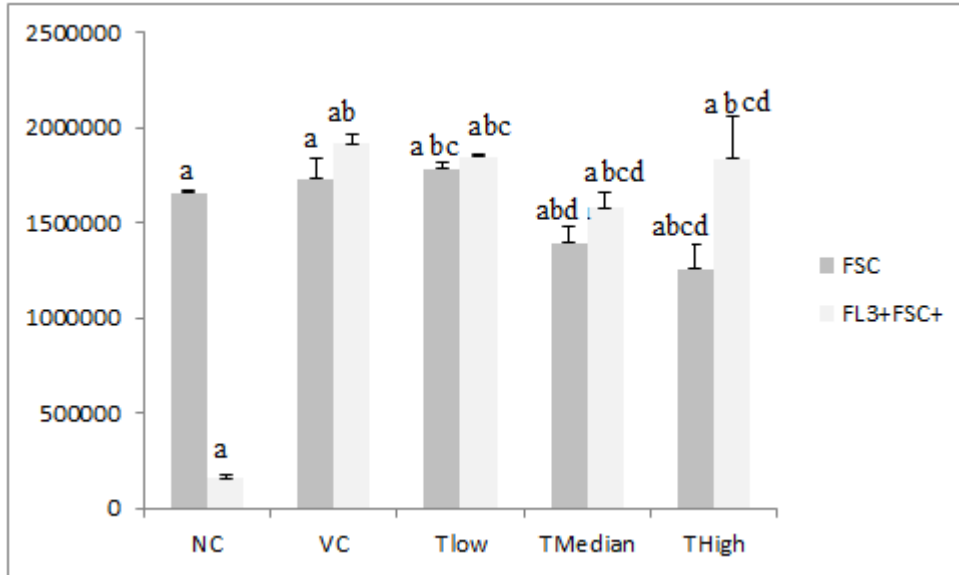


Figure 4. Cytotoxicity of rabbits spermatozoa exposed to TCDD (0.375;0.75; 1.5 mg/Kg) using flow cytometry (\*N.C: Negative Control; V.C : Vehicle control; T-Low: Low dose; T-Median: Median dose; T-High: High Dose; and FL2: 7AAD/FSC:Size. <sup>a,b,c,d</sup>The differences among the treated groups are significant according to Student's test with  $p < 0.05$ )

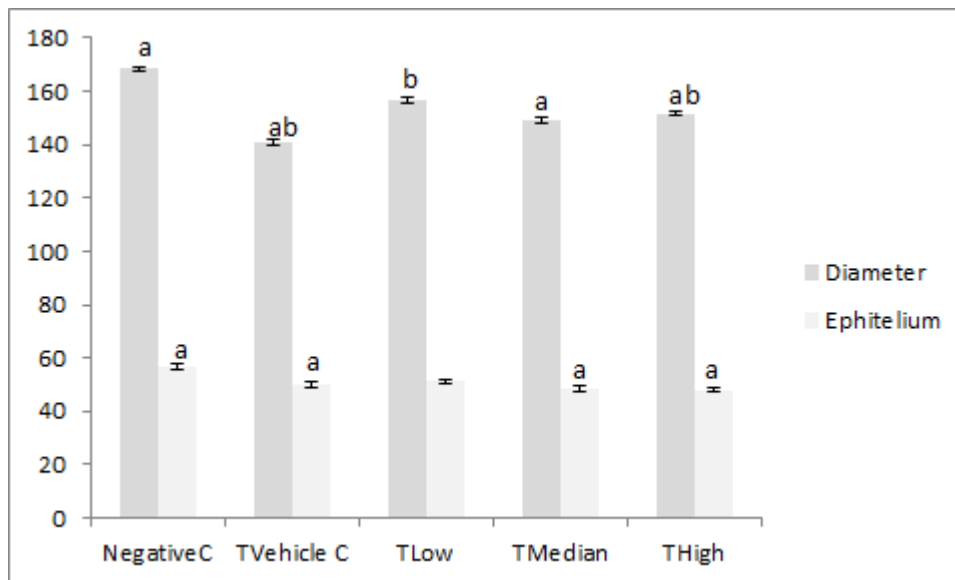


Figure 5. Morphometric analyses of diameter of seminiferous tubule (DST) and epithelium of the seminiferous tubules (EST) of rabbits which administered orally with doses 0.375;

0.75; 1.5 mg/Kg of TCDD (\* Negative.C: Negative Control; TVehicle.C : Treatment Vehicle control; T-Low: Low dose; T-Median: Median dose; T-High: High Dose; ND: Not Differences. <sup>a,b,c</sup>. The differences among the treated groups are significant according to Student's test with  $p < 0.05$ )

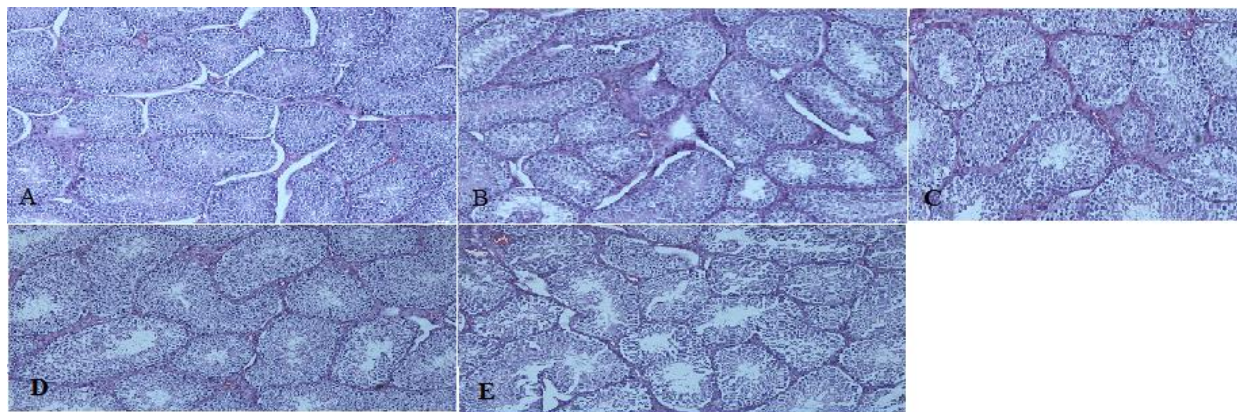


Figure 6. Histopathology of seminiferous tubules of rabbits which administered orally with doses 0.375; 0.75; 1.5 mg/Kg of TCDD. (Negative.C(A); T-Low (B) T-Median (D); T-High (E); TVehicle.(C))

\* A: Negative Control; B: Low dose; C: Median dose; D: T-High: High Dose; E: Vehicle control.

## Veterinary Research

### Effects of low doses of TCDD as an endocrine disruptor in feedstuff on the reproductive system in rabbits

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>		
<b>Full Title:</b>	Effects of low doses of TCDD as an endocrine disruptor in feedstuff on the reproductive system in rabbits	
<b>Article Type:</b>	Research article	
<b>Funding Information:</b>	Universidad Autónoma del Estado de México (10804)	Not applicable
<b>Abstract:</b>	<p>The TCDD is a type of dioxin that affects the reproductive system. Feedstuff is its main entryway into rabbits for productive purposes. The effects of low doses of TCDD can affect on semen quality causing economic losses. The objective of the present study was to evaluate the reproductive toxicity effect of low doses of TCDD in rabbit's males.</p> <p>Three concentrations of TCDD (0.375, 0.75, 1.5 mg/kg) were tested and their effects on spermatozoa were evaluated 10 days after oral administration of the product.</p> <p>Semen quality was assessed in fresh. These parameters were total motility (TM) (progressive motility (PM), non-progressive motility (NPM), immotile (IM), Malformation abnormal head (AH), abnormal tail (AT), and abnormal mid-piece (AMP), and Sperm</p>	

	<p>concentration (SC). Flow cytometry was used to determine the affected sperm population by cytotoxicity and apoptosis. In addition, a morphometric analysis of testicles was performed. The results showed that the body weight of the treated animals was significantly reduced in both medium and high doses (0.75, 1.5 mg/kg) with respect to the control groups. In the groups treated with TCDD, dead sperm increased by 50% in the T-High dose more than the control group. Regarding malformations had increased in the head and tail by 11 and 6% respectively. Significant differences cytotoxicity and apoptosis between the negative control (NC) and T-High dose. In addition, the morphometric analysis of the testicles was performed. Significant differences (<math>p \leq 0.05</math>) were found in the mean diameter of the seminiferous tubules (DST), and the average epithelium of the seminiferous tubules (EST) among all treated groups versus the control. It can be concluded that at these low doses of TCDD there was an impact on the quality, apoptosis, and cytotoxicity of the rabbit sperm and that affects the rabbit production in farms.</p>
<b>Corresponding Author:</b>	<p>ESVIETA TENORIO  Universidad Autónoma del Estado de México  SAN ANTONIO, Not Applicable  MEXICO</p>
<b>Corresponding Author E-Mail:</b>	<p>esvieta@gmail.com</p>
<b>Corresponding Author Secondary</b>	



<b>Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidad Autónoma del Estado de México
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Esvieta Tenorio-Borroto
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Esvieta Tenorio-Borroto
	Heba Yehia Anwar Elsayed
	Alberto Barbabosa Pliego
	Jorge Acosta Dibarrat
	Fabiola Rivera Ramirez
	Juan Carlos Vázquez Chagoyán

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	Nazario Pescador Salas
	Raafat Mahmoud Mohamed Gomaa
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Suggested Reviewers:</b>	<p>Humberto Gonzalez Diaz, PH.D  Profesor, Universidad del Pais Vasco - Campus Bizkaia  gonzalezdiazh@yahoo.es  excellent expert in analysis of toxicological effects prediction from the structure of the  compounds</p> <p>Yovanni Marreo Ponce, D en C  Profesor, Universidad San Francisco de Quito  ymarrero77@yahoo.es  excellent expert in analysis of toxicological effects</p> <p>linda Bautista, D en C  Profesor, Universidad Autonoma del Estado de Mexico Sistema de informacion  Cientifica Redalyc  lin_bag@yahoo.com.mx  excellent expert in laboratory animals</p>
<b>Additional Information:</b>	
<b>Question</b>	<b>Response</b>
<p><b>Is this study a clinical trial?</b></p> <p>A clinical trial is defined by the World Health Organisation as 'any research study that prospectively assigns</p>	No

human participants or groups of humans

to one or more health-related

interventions to evaluate the effects on

health outcomes'.</i>

*Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corpo*

## CAPITULO 3 OTROS RESULTADOS SIN PUBLICAR

### 3.1 Efectos de la Dioxina (TCDD) sobre el Sistema Inmune en ratones

Entre los parámetros evaluados para observar los efectos del TCDD a bajas dosis sobre el sistema inmune se registro el peso de hígado y el peso corporal, en la Tabla 6 se muestra un decrecimiento del peso corporal en los ratones administrados con TCDD, después de 10 días de administración por vía oral. En la misma se muestran diferencias significativas entre el peso corporal de grupo control y el grupo tratado con 0.75 y 1.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Por otra parte no se muestra diferencias en el peso de hígado de los grupos tratados con respecto al control.

Table 6. Comportamiento del peso corporal y el peso de hígado de ratones expuestos a diferentes dosis de TCDD.

<b>Tratamiento/ raton</b>	<b>Peso Corporal (final)</b>	<b>Peso Hígado</b>
Control	40.000 <sup>a</sup>	1.888
Control (vehiculo)	39.900	1.898
TCDD(0.375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	39.33 <sup>b</sup>	1.887
TCDD(0.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	36.33 <sup>ab</sup>	1.878
TCDD(1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	36.75 <sup>ab</sup>	1.858

<sup>a, b</sup>. Los diferentes superíndices que siguen en la columna indican diferencias en  $p < 0.05$

En la Tabla 7 se muestra el comportamiento de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT) que evidencian el daño en la función del hígado, se observan diferencias significativas para  $p < 0.05$  entre el grupo control y los tratados para ambas enzimas. La concentración de la AST y ALT se eleva en cualquier situación que exista daño hepático y daño pulmonar. La ALT se encuentra principalmente en las células del hígado. El nivel en sangre de alanino aminotransferasa es un parámetro

muy útil en medicina, pues la elevación de las cifras normales puede indicar lesión hepática por destrucción de hepatocitos (citólisis).

Table 7. Efectos sobre los parametros bioquímicos de hígado (aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT) en ratones admintrados por vía oral con TCDD durante 10 días.

Tratamiento/ raton	AST/GOT (UL)	ALT/GTP (UL)
Control	147.00 <sup>a</sup>	37.00 <sup>a</sup>
Control (vehiculo)	66.00 <sup>ab</sup>	14.00
TCDD(0.375µg/kg)	67.25 <sup>abc</sup>	63.00 <sup>a</sup>
TCDD(0.75µg/kg)	160.00 <sup>abcd</sup>	129.20 <sup>a</sup>
TCDD(1.5µg/kg)	191.45 <sup>abcd</sup>	98.25 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Los diferentes superíndices que siguen en la columna indican diferencias en  $p < 0.05$

En la Figura 12 se muestra el comportamiento de las poblaciones de linfocitos T en hígado y bazo de ratones administrados con TCDD, marcados con anticuerpos monoclonales y empleando citometría de flujo. En bazo se observa un aumento en los grupos tratados de los porcentos de linfocitos cooperadores marcados con CD4, destacando el mayor porcentaje en los tratados con aceite de maíz con un 58.01%. Los linfocitos T citotóxicos también tuvieron un ligero aumento 34.46 y 33.39% en dosis media y alta respectivamente con respecto al control. En hígado también muestra un aumento de los linfocitos CD4 y CD8 con 68.98 y 58.25 % respectivamente en la dosis media.

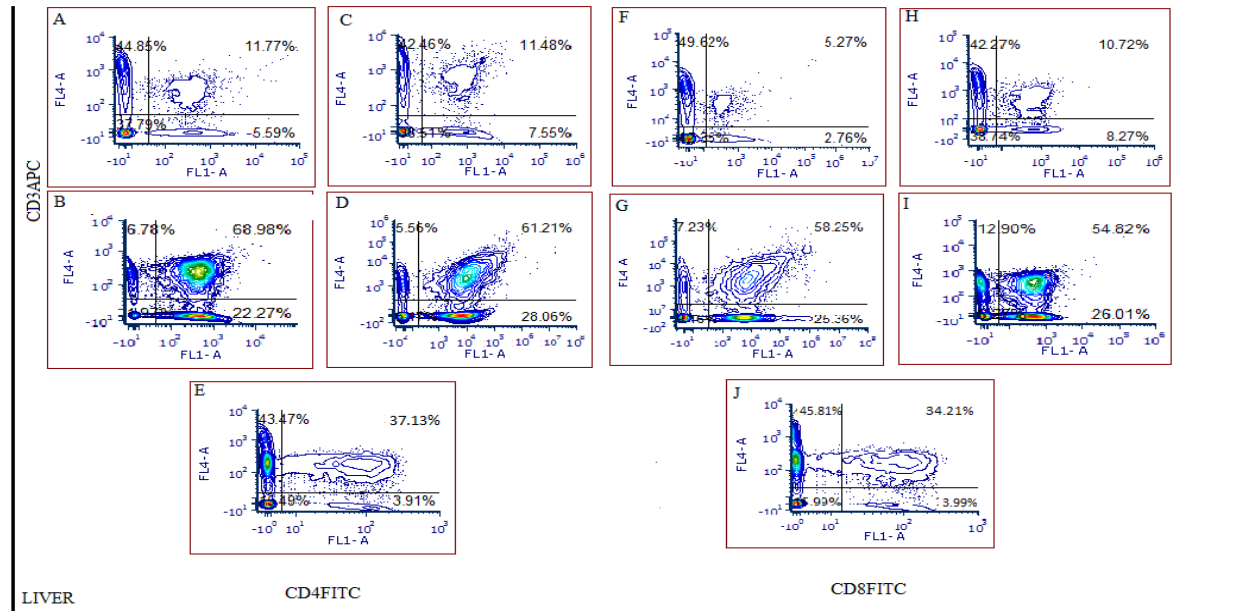
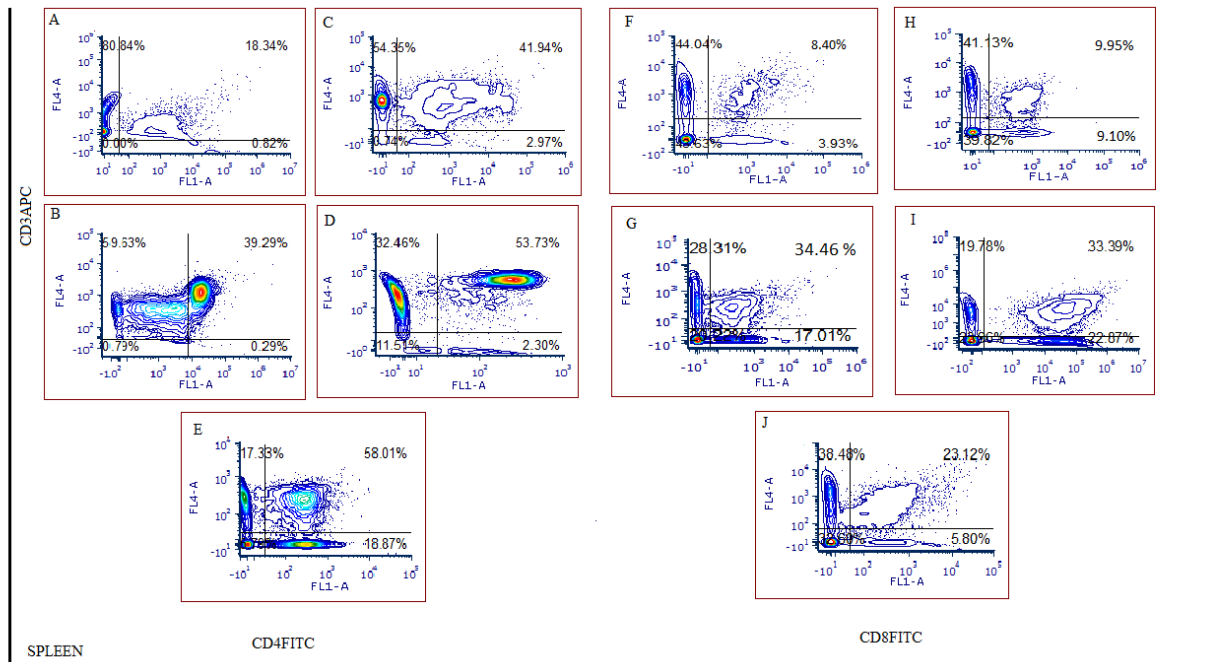


Figure. 12. Immunofenotipificación de linfocitos CD3APC/CD4FITC y CD3APC/CD8FITC en hígado y bazo de ratones administrados con TCDD (A-F: Control Negativo ; B-G:Dosis Media; C-H: Dosis Baja;D-I: Dosis Alta; E-J: Control Vehículo).

En la Figura 13 se muestra el comportamiento de las poblaciones de linfocitos T en bazo de ratones administrados con TCDD marcados con AnnexinV. En el cuadro 13A correspondiente a la dosis alta 1.5 µg/Kg se observa un 25.97 % de apoptosis en linfocitos; en el cuadrante 13D correspondiente al control positivo se muestra un 47.59%, estas figuras muestran los resultados para un solo animal sin embargo en el cuadro G para todos los animales el grupo control muestra un 30.03% y el grupo tratado con dosis alta un 20.36% estos resultados muestran una disminución de la apoptosis de los linfocitos en bazo.

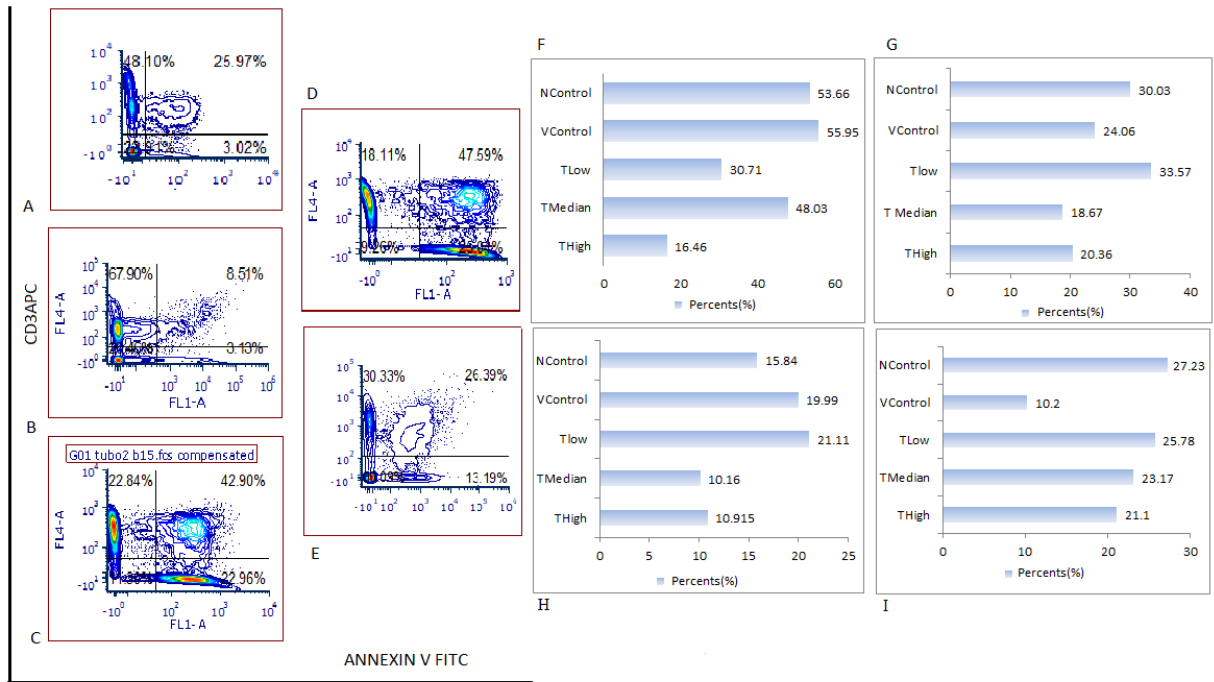


Figure 13. Población de linfocitos de bazo de ratones(n = 6 ) marcados con AnnexinV/IP exposed to TCDD (A:1.5 µg/Kg Dosis Alta; B:0.75 µg/Kg Dosis Media; C:0.375µg/Kg Dosis baja; D:Control Negativo; E:Control Vehículo (F: ULFL4+/FL1-;G: URFL4+/FL1+;H: LLFL4-/FL1-;I: H: LRFL4-/FL1+)

En la Figura 14 se muestra el comportamiento de las poblaciones de linfocitos T en hígado de ratones administrados con TCDD marcados con AnnexinV. En el cuadro 14A correspondiente a la dosis alta 1.5 µg/Kg se observa un 7.58 % de apoptosis en linfocitos; en el cuadrante 14D correspondiente al control positivo se muestra un 12.77 %, estas figuras muestran los resultados para un solo animal sin embargo en el cuadro G para todos

los animales el grupo control muestra un 16.2% y el grupo tratado con dosis alta un 6.8% estos resultados muestran una disminución de la apoptosis de los linfocitos en hígado.

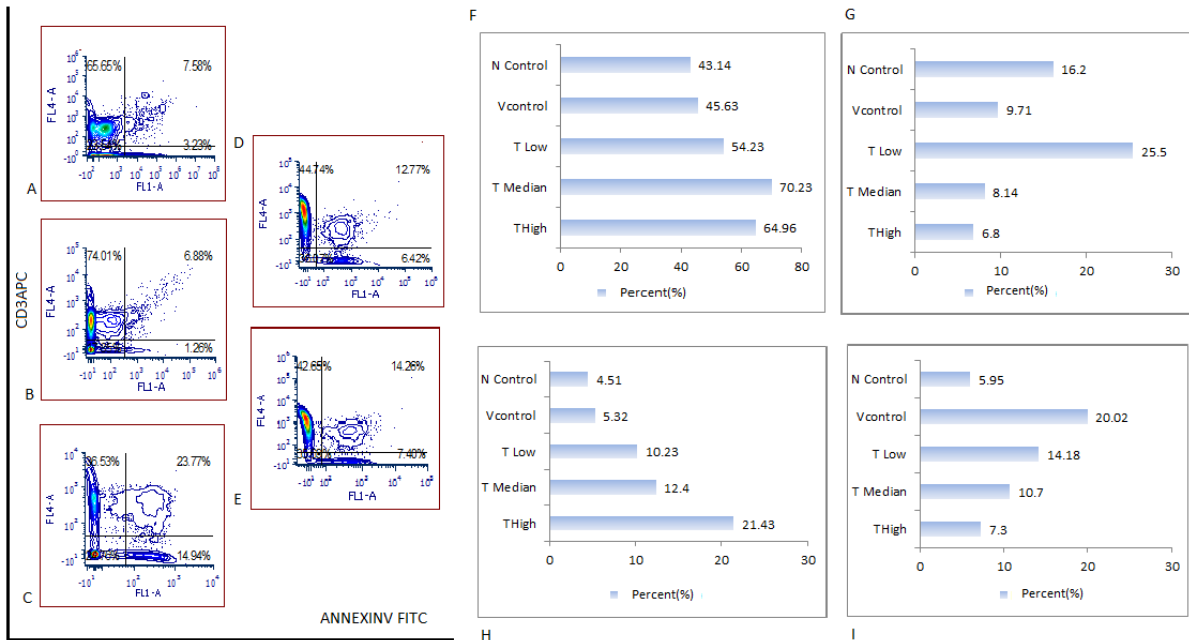


Figure 14. Población de linfocitos de hígado en ratones(n = 6 ) marcados con AnexinV/IP exposed to TCDD (A:1.5 µg/Kg Dosis Alta; B:0.75 µg/Kg Dosis Media; C:0.375µg/Kg Dosis baja; D:Control Negativo; E:Control Vehículo (F: ULFL4+/FL1-;G: URFL4+/FL1+;H: LLFL4-/FL1-;I: H: LRFL4-/FL1+)

En la Figura 15 se muestra el comportamiento de las poblaciones de linfocitos T de bazo marcados con 7ADD en dos tipos de gráficos en los cuadrantes A-A1 correspondiente al control negativo se observa un 11.88 y 6.01 por ciento de linfocitos muertos esto puede estar dado por el manejo, por su parte en el cuadrante E-E1 correspondiente a los linfocitos de ratón expuestos a la dosis alta de TCDD, se observa un 35.44 y 35.34 por ciento de citotoxicidad en los linfocitos de bazo.



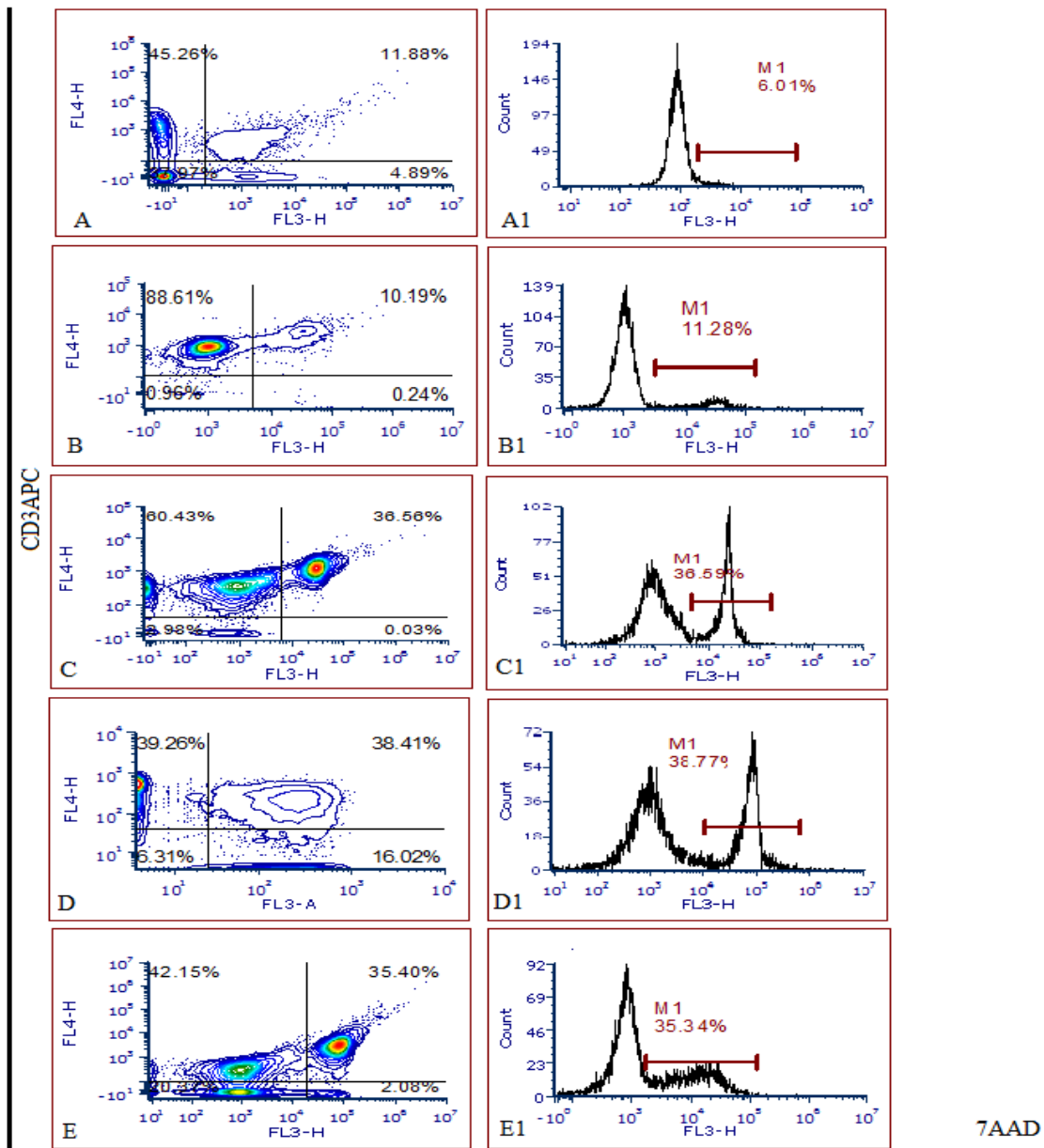


Figure 15. Dot-Plot e Histograma de la población de linfocitos de bazo en ratones (n = 6) expuestos a TCDD marcados con 7AAD (A-A1:Control Negativo, B-B1:Control Vehículo, C-C1:0.375µg/Kg Dosis Baja, D-D1:0.75 µg/Kg Dosis Media, E-E1:1.5 µg/Kg Dosis Alta).

En la Figura 16 se muestra el comportamiento de las poblaciones de linfocitos T de hígado marcados con 7AAD en dos tipos de gráficos en los cuadrantes A-A1 correspondiente al

control negativo se observa un 11.11 y 2.10 por ciento de linfocitos muertos esto puede estar dado por el manejo, por su parte en el cuadrante E-E1 correspondiente a los linfocitos de ratón expuestos a la dosis alta de TCDD, se observa un 51.53 y 37.53 por ciento de citotoxicidad en los linfocitos de bazo.

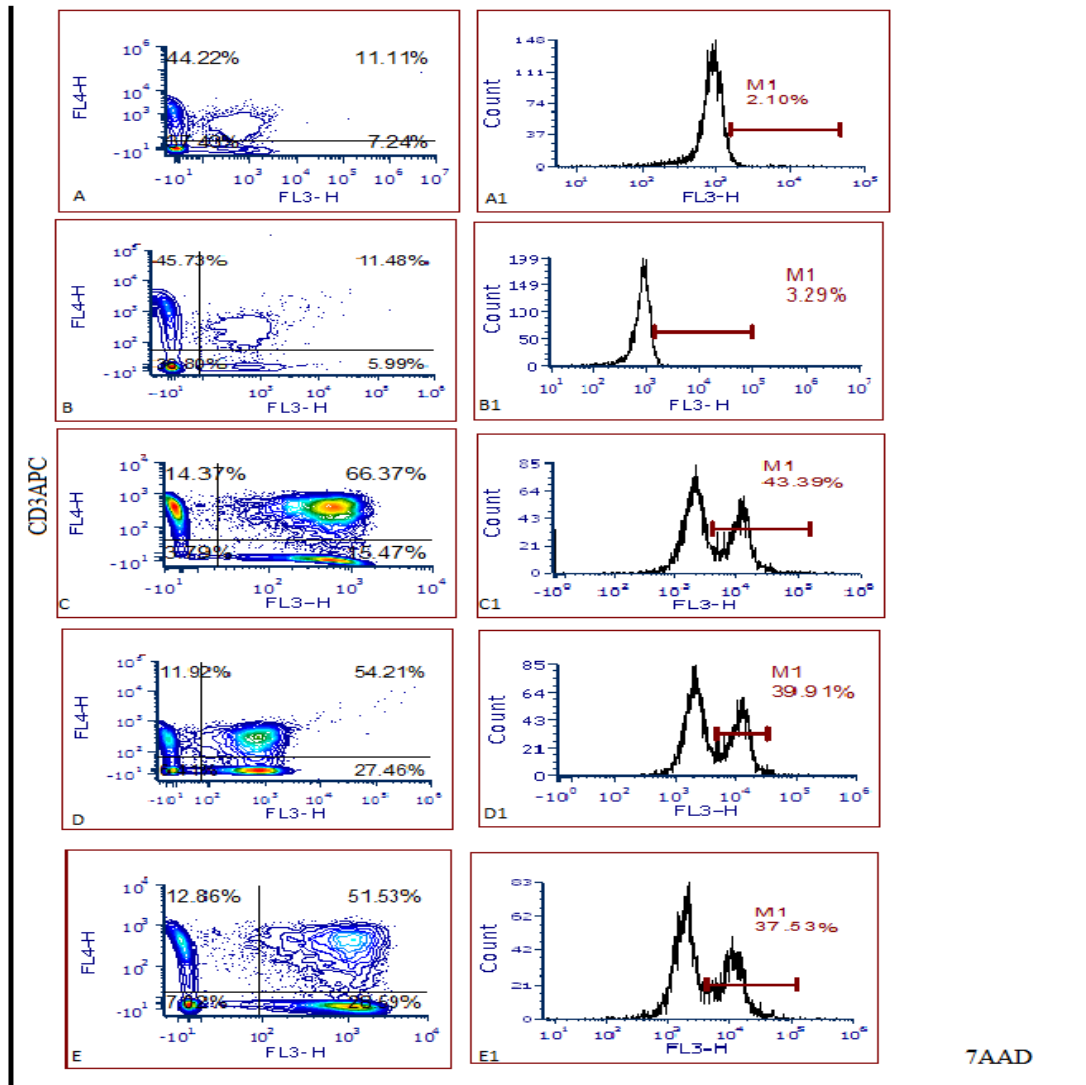
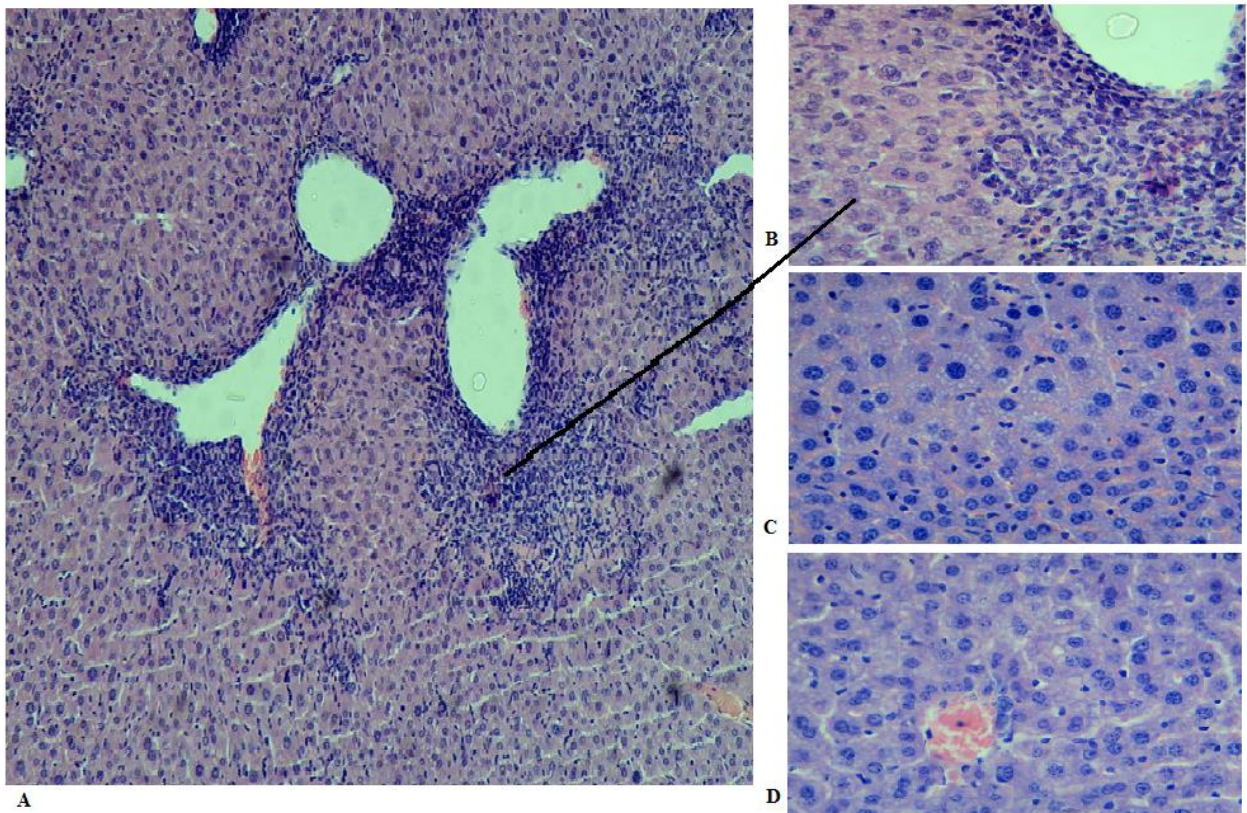


Figure 16. Dot-Plot e Histograma de la población de linfocitos de bazo en ratones (n = 6) expuestos a TCDD marcados con 7AAD (A-A1:Control Negativo, B-B1:Control Vehículo, C-C1:0.375 µg/Kg Dosis Baja, D-D1:0.75 µg/Kg Dosis Media, E-E1:1.5 µg/Kg Dosis Alta.).

En adición a la citometría, se realizaron cortes histopatológicos al hígado y al bazo de ambas especies en la figura 17 se muestra un corte de hígado de ratón expuesto a una dosis de 1.5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de TCDD observándose en la sección 17A del hígado un infiltrado inflamatorio mixto (linfocitos, células plasmáticas y neutrófilos) que engrosa el espacio portal. En la sección 17B muestra un espacio de infiltración linfoplasmocitaria. En la 17C se observan células hepáticas con micro vacuolas y núcleos con polimorfismo regenerativo con ligero agrandamiento nuclear, hiper cromatismo y binucleación. Por otra parte en la sección 17D se muestran linfocitos escasos en los sinusoides.



**Figura 17.** Análisis histopatológicos del hígado de ratón administrado por vía oral a una dosis de 1.5  $\mu\text{g} / \text{Kg}$  de TCDD; A: Sección del hígado con infiltrado inflamatorio mixto (linfocitos, células plasmáticas y neutrófilos) que engrosan el espacio portal. HE 10X; B: Espacio de infiltración linfoplasmocitaria. Binucleación 40X; C: células del hígado con micro vacuolas. Núcleos con polimorfismo regenerativo: ligero agrandamiento nuclear, hiper cromatismo y binucleación. Linfocitos escasos en sinusoides. HE 40X; D: Vena central hepática, congestión centrololular HE 40X.

### 3.2 Efectos de la Dioxina (TCDD) sobre el Sistema Inmune en conejos.

En los conejos los parámetros evaluados, para observar los efectos del TCDD a bajas dosis sobre el sistema inmune se registro el peso de hígado y el peso corporal, en la Tabla 8 se muestra un decrecimiento significativo para  $p \leq 0.05$  del peso corporal en los conejos administrados con TCDD, después de 10 días de administración por vía oral. En la misma se muestran diferencias significativas entre el peso corporal de grupo control y el grupo tratado con 0.75 y 1.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Por otra parte no se muestra diferencias en el peso de hígado de los grupos tratados con respecto al control similar comportamiento que en los ratones.

Tabla 8 Comportamiento del peso corporal y el peso de hígado de conejos expuestos a diferentes dosis de TCDD.

<b>Tratamiento/ conejo</b>	<b>Peso Corporal (final)</b>	<b>Peso Hígado</b>
Control	3157.5 <sup>a</sup>	54.06
Control (vehículo)	3166.7	54.16
TCDD(0.375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	2862.3 <sup>b</sup>	54.80
TCDD(0.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	2742.8 <sup>ab</sup>	54.65
TCDD(1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	2704.8 <sup>ab</sup>	54.68

<sup>a,b</sup> Los diferentes superíndices que siguen en la columna indican diferencias en  $p < 0.05$

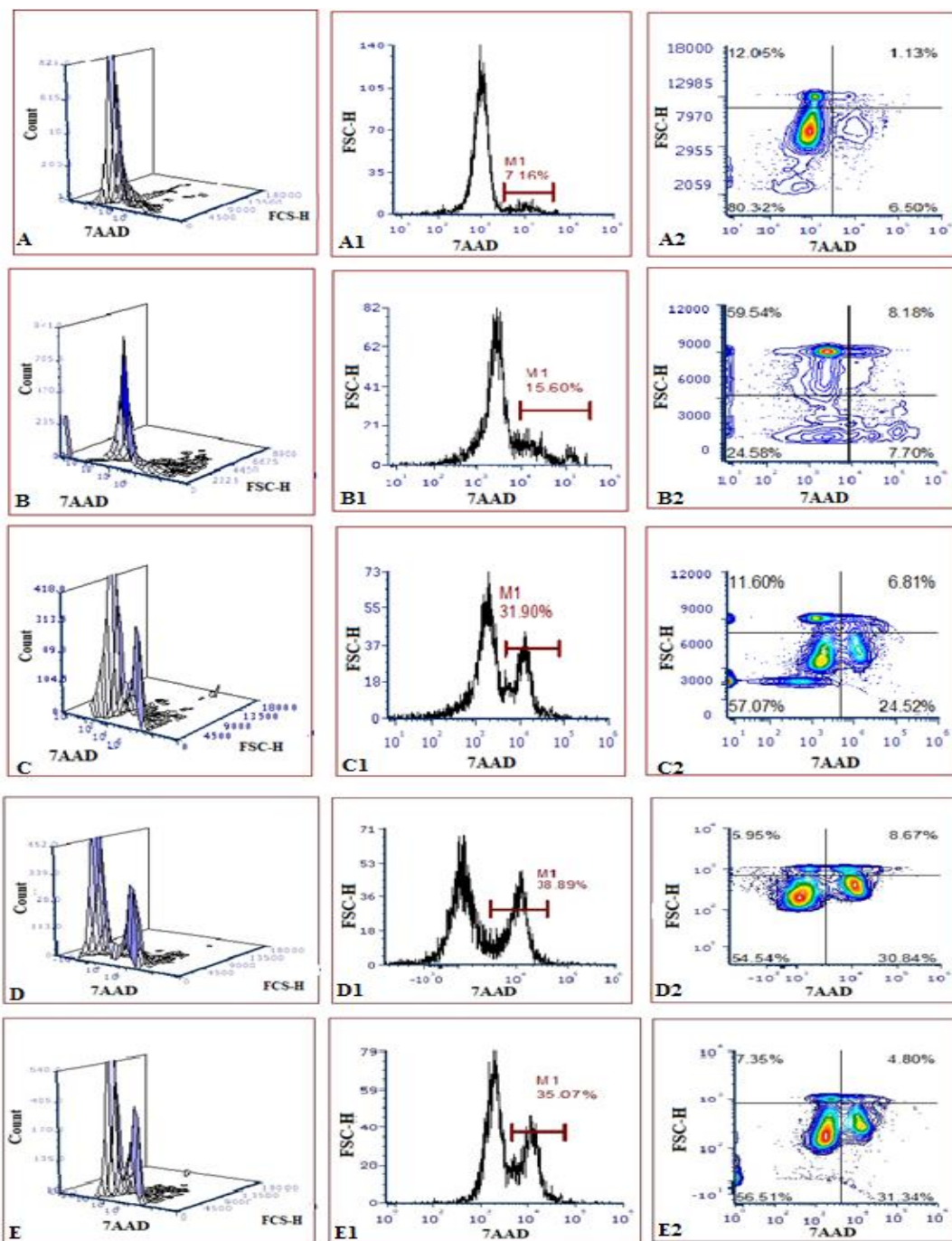
En la Tabla 9 se muestra el comportamiento de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT) que evidencian el daño en la función del hígado, se observan diferencias significativas para  $p < 0.05$  entre el grupo control y los grupos tratados para ambas enzimas este comportamiento es similar al observado en ratones.

Tabla 9. Efectos sobre los parametros bioquímicos de hígado (aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT) en conejos adminitrados por vía oral con TCDD durante 10 días.

Tratamiento/ conejo	AST/GOT (UL)	ALT/GTP (UL)
Control	150.00 <sup>a</sup>	39.00 <sup>a</sup>
Control (vehiculo)	60.00 <sup>ab</sup>	19.00
TCDD(0.375µg/kg)	69.25 <sup>abc</sup>	68.00 <sup>a</sup>
TCDD(0.75µg/kg)	168.00 <sup>abcd</sup>	126.20 <sup>a</sup>
TCDD(1.5µg/kg)	198.45 <sup>abcd</sup>	96.25 <sup>a</sup>

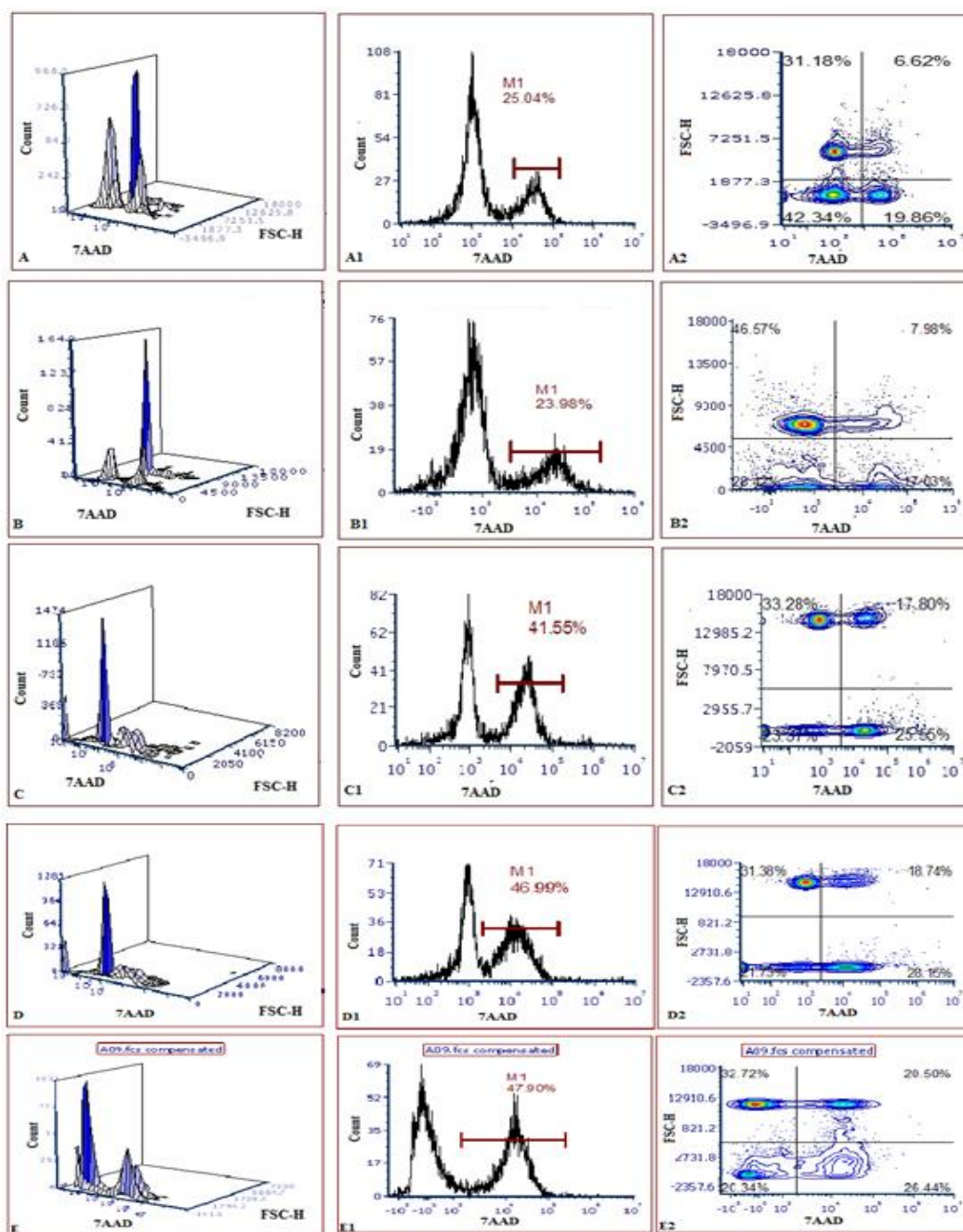
<sup>a,b,c,d</sup> Los diferentes superíndices que siguen en la columna indican diferencias en  $p < 0.05$

En este estudio realizamos el marcaje de células de bazo e hígado con 7AAD en conejos administrados con TCDD, en la Figura 18 se muestran los resultados de la citotoxicidad provocada por este producto sobre el hígado, se evidencia un aumento hasta el 31.34 por ciento en la dosis alta de 1.5µg/kg con respecto al control que fue de 1.13%.



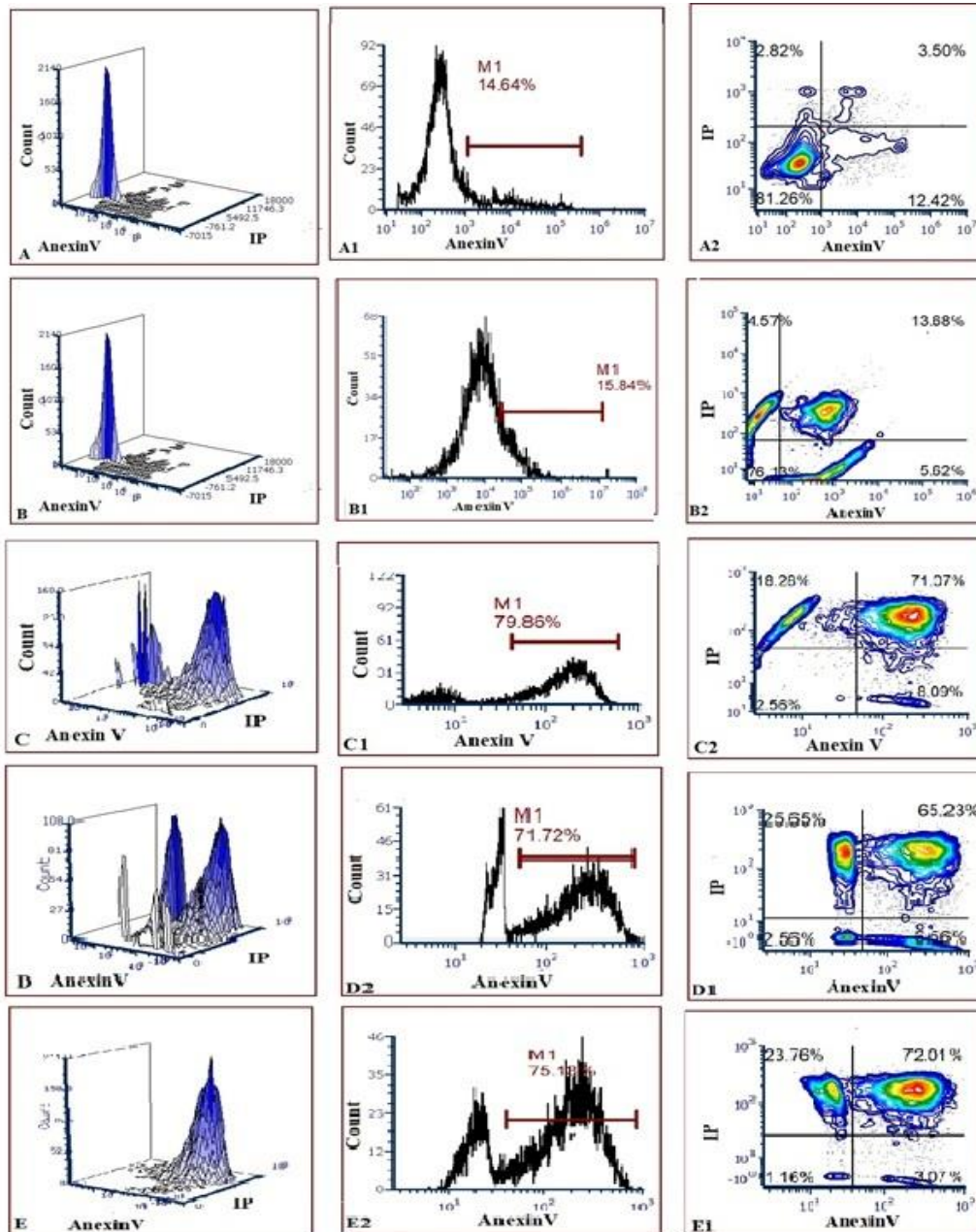
**Figura 18.** 3D- Dot-Plot e Histograma de la población de Celulas de Hígado en conejos (n = 6 ) expuestos a TCDD marcados con 7AAD (A-A1:Control Negativo, B-B1:Control Vehículo, C-C1:0.375µg/Kg Dosis Baja, D-D1:0.75 µg/Kg Dosis Media, E-E1:1.5 µg/Kg Dosis Alta.

Por su parte este aumento de la citotoxicidad también se muestra en las células del bazo del conejo con un 40.90 por ciento en la dosis alta como se muestra en la Figura 19.



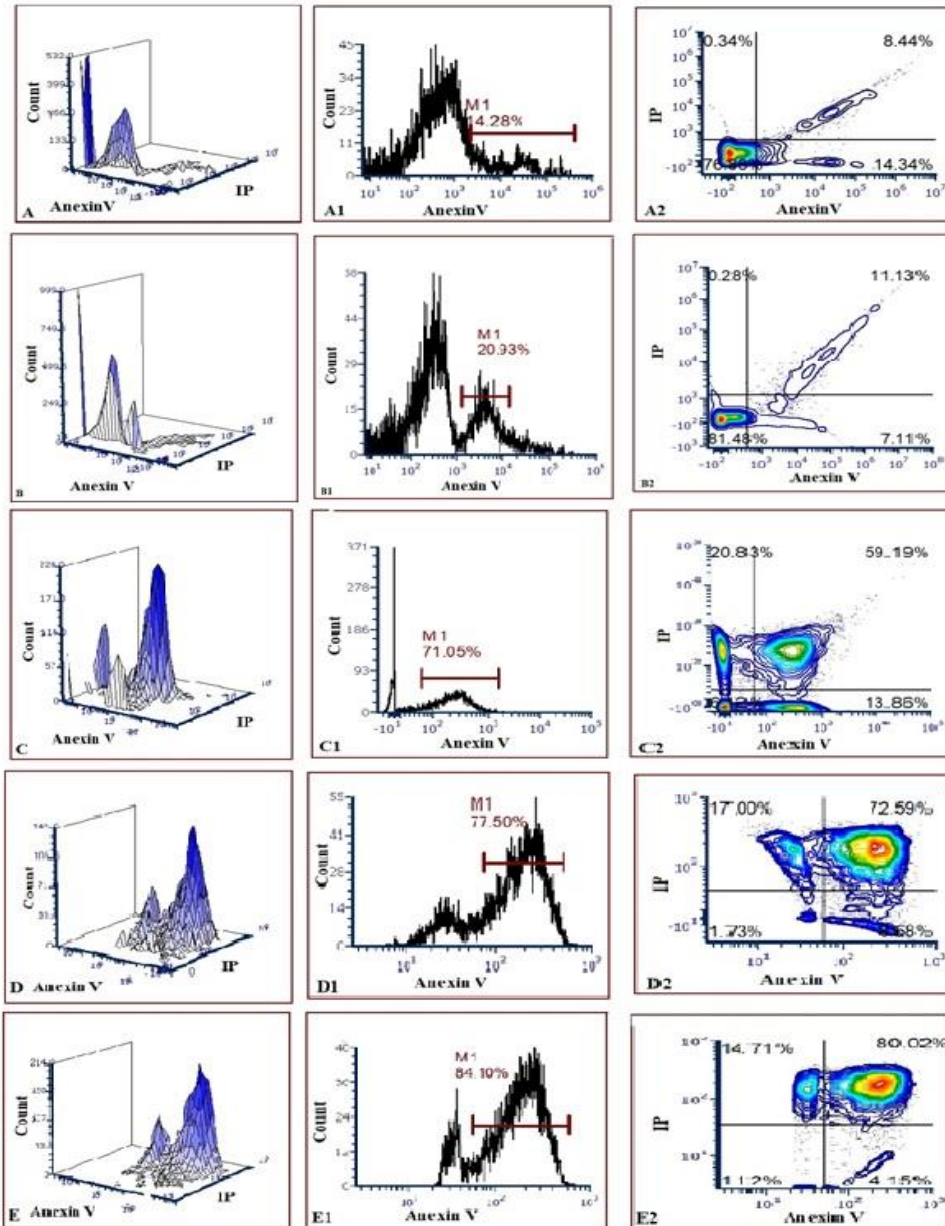
**Figura 19.3D-** Dot-Plot e Histograma de la población de células de Bazo en conejos (n = 6) expuestos a TCDD marcados con 7AAD (A-A-A2:Control Negativo, B-B1-B2:Control Vehículo, C-C1-C2:0.375µg/Kg Dosis Baja, D-D1-D2:0.75 µg/Kg Dosis Media, E-E1-E2:1.5 µg/Kg Dosis Alta).

A continuación se muestra las gráficas 20 y 21, donde se muestran células de hígado y bazo marcadas con Anexin V/IP, en ella se muestra un decrecimiento de la apoptosis entre los tratamientos y el grupo control. En la gráfica 20 hay una disminución del 12.42 por ciento de células en grupo control con respecto al 3.07 por ciento de la apoptosis de las células de hígado del grupo de dosis alta.



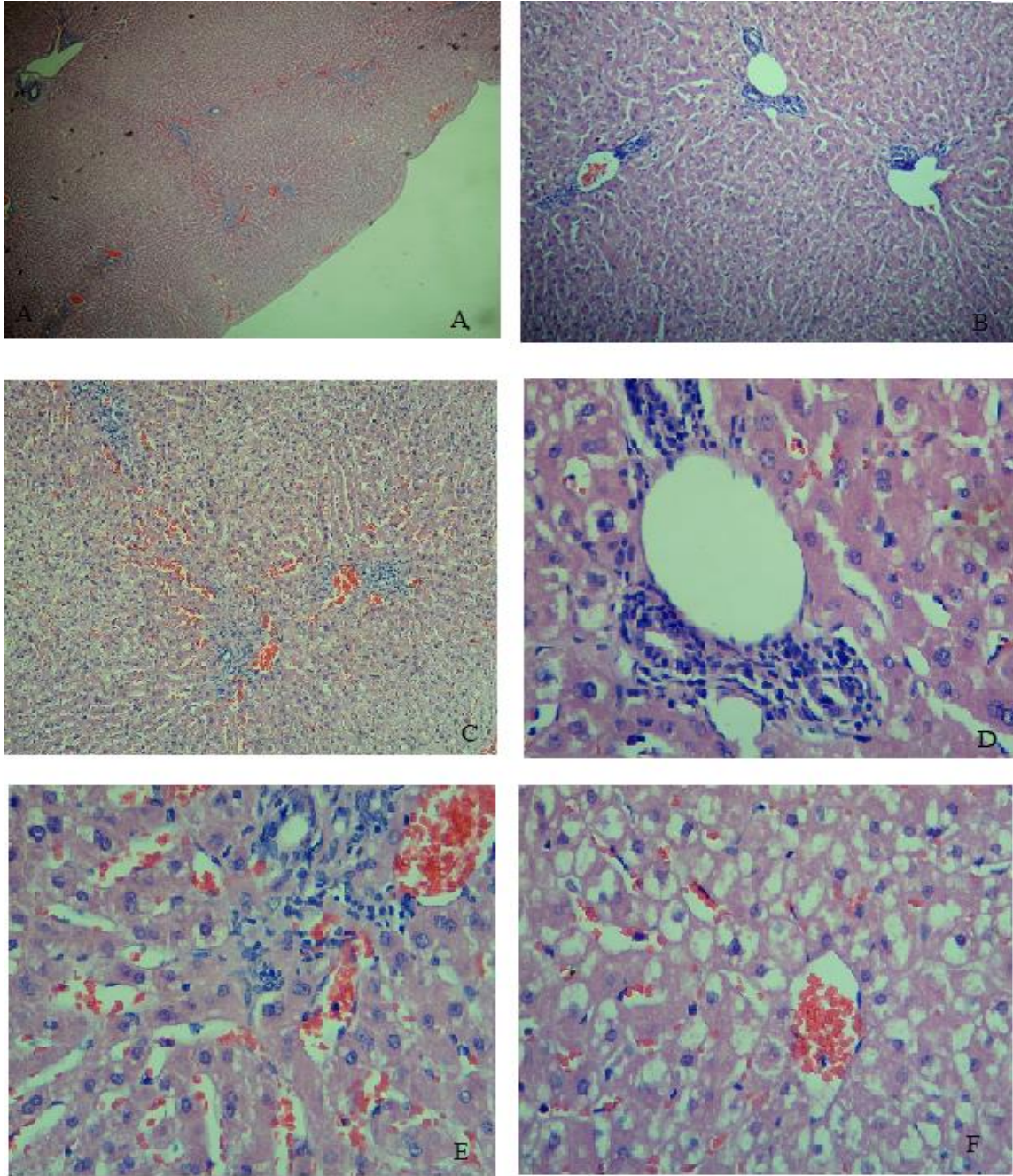


**Figura 20.** 3D- Dot-Plot e Histograma de la población de células de Hígado en conejos (n = 6 ) expuestos a TCDD marcados con Anexin V/IP (A-A1:Control Negativo, B-B1:Control Vehículo, C-C1:0.375µg/Kg Dosis Baja, D-D1:0.75 µg/Kg Dosis Media, E-E1:1.5 µg/Kg Dosis Alta.

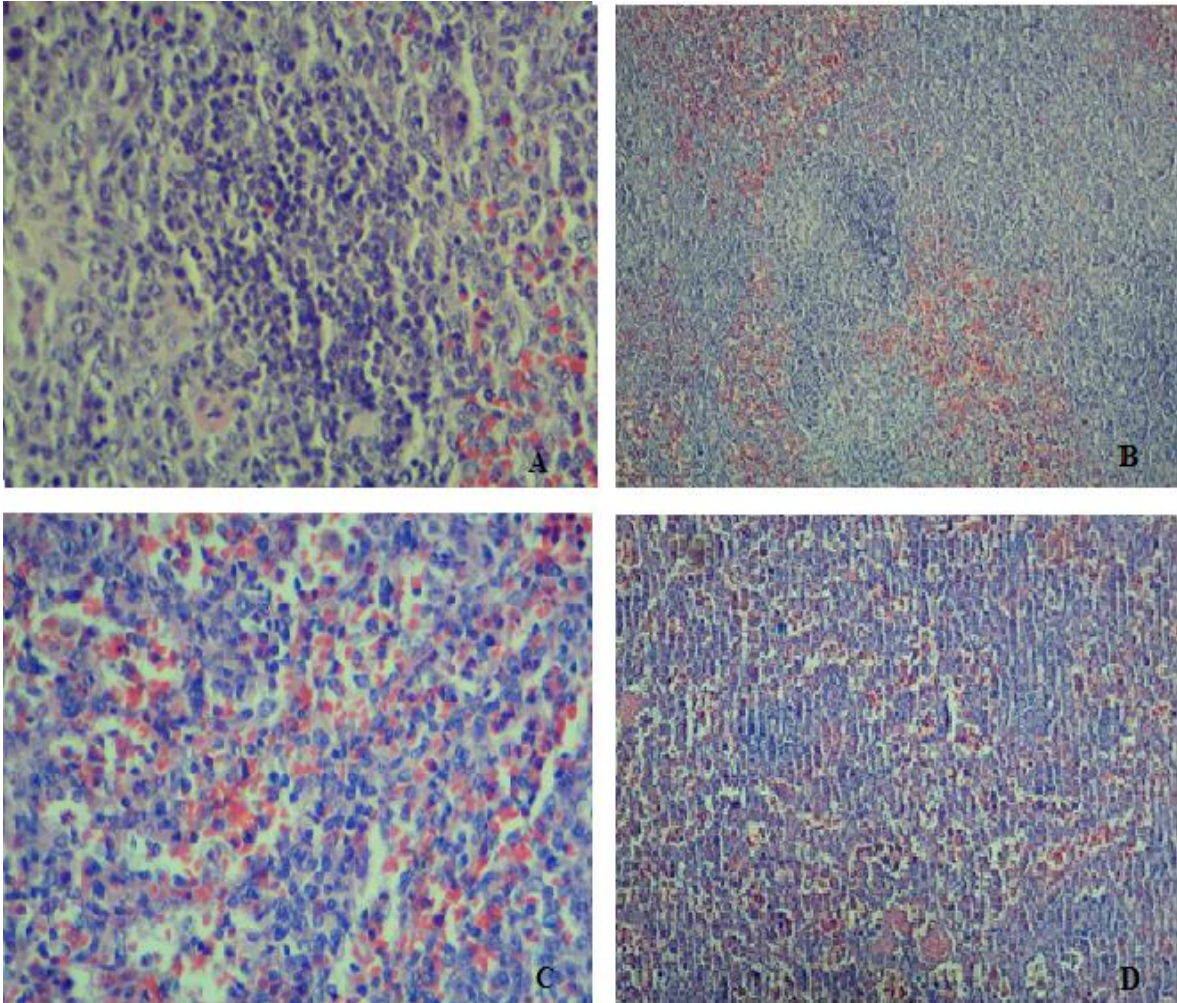


**Figura 21.** 3D- Dot-Plot e Histograma de la población de Células de Bazo en conejos (n = 6) expuestos a TCDD marcados con Anexin V/IP (A-A1:Control Negativo, B-B1:Control Vehículo, C-C1:0.375µg/Kg Dosis Baja, D-D1:0.75 µg/Kg Dosis Media, E-E1:1.5 µg/Kg Dosis Alta.

En adición se realizaron cortes histopatológicos de hígado y bazo de los conejos tratados esto se muestra en las gráficas 22 y 23. Los cortes de hígado muestran una tendencia a la nodulación, Fibrosis joven con Infiltración linfoplasmocitaria. Células hepáticas con microvacuolación así como elementos inflamatorios, congestión vascular y necrosis hepatocítica focal; además de la presencia de hepatocitos con vacuolización coalescente. Congestión de sinusoides y vena centrolobulillar. Estas alteraciones pueden estar relacionadas con la alta citotoxicidad y la disminución de la apoptosis ocasionada por el TCDD. Por su parte las alteraciones en bazo mostradas en la gráfica 23 evidencia hiperplasia linfoide con formación de cordones de linfoblastos en la pulpa blanca blanca, eritrofagocitosis, depleción linfoide, disminución de la pulpa roja y eritrofagocitosis acentuada entre otras alteraciones.



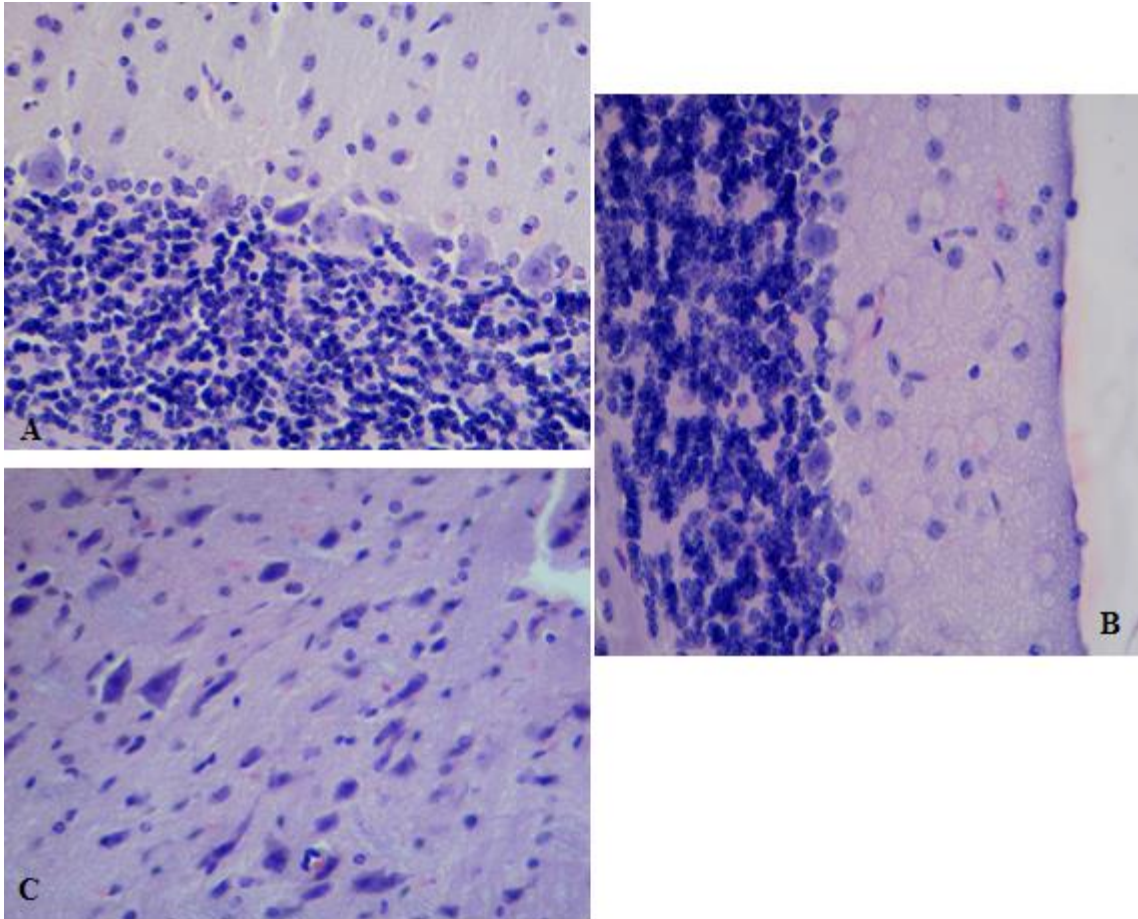
**Figura 22** Análisis histopatológicos del hígado de Conejo administrado por vía oral a una dosis de 1.5 µg / Kg de TCDD;A: Unión de espacios porta con tendencia a la nodulación (4X) B: Fibrosis joven que une espacios porta HE 10X;C: Fibrosis joven que une espacios porta HE 10X. D: Espacio porta con Infiltración linfoplasmocitaria. Celulas hepáticas con microvacuolación. HE 40X E: Espacio porta con elementos inflamatorios, congestión vascular. Centro obsérvese necrosis hepatocítica focal. HE 40X;F: Presencia de hepatocitos con vacuolización coalescente. Congestión de sinusoides y vena centrolobulillar.



**Figura 23** Análisis histopatológicos del Bazo de Conejo administrado por vía oral a una dosis de 1.5  $\mu\text{g} / \text{Kg}$  de TCDD;A: Hiperplasia linfoide con formación de cordones de linfoblastos en la pulpa blanca; en la periferia de la pulpa roja , eritrofagocitosis.B: Extensa zona de depleción linfoide, con inicios de hiperplasia linfoide focal en la pulpa blanca. Disminución de la pulpa roja,C: Eritrofagocitosis acentuada , moderada congestión en la pulpa roja;D: Hiperplasia linfoide moderada multifocal

### 3.3 Efectos de la Dioxina (TCDD) sobre el Sistema Nervioso de ratones y conejos.

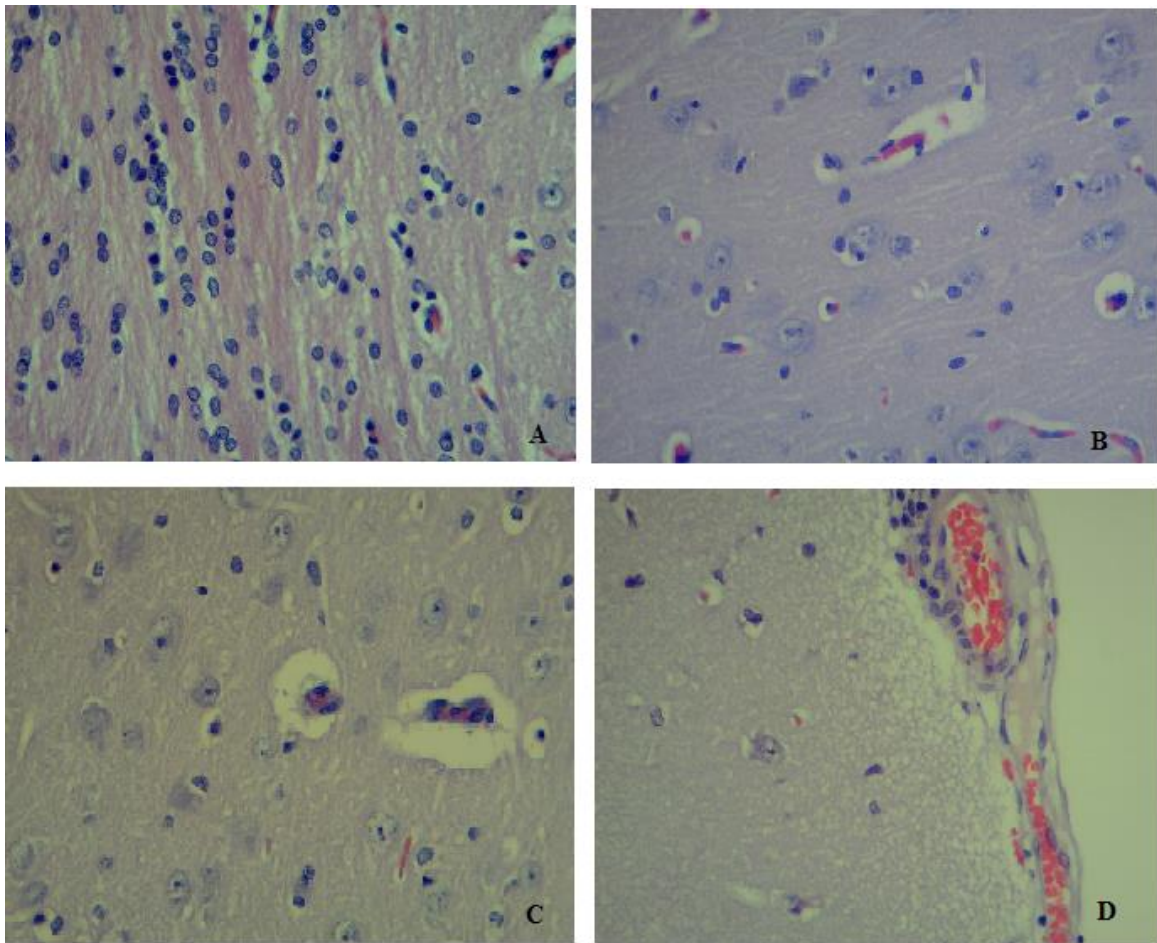
En nuestro estudio se realizaron análisis histopatológicos al cerebro y cerebelo de ratones, gráfica 24; en ambos organos se muestran alteraciones, como necrosis en células de Purkinje y retracción de los cuerpos neuronales.



**Figura 24** Análisis histopatológicos del Cerebro y Cerebelo de ratones administrados con TCDD por vía oral a una dosis de 1.5  $\mu\text{g} / \text{Kg}$ . A: Interfase cerebelo capa ganulosa, necrosis de células de Purkinje con moderada migración de la granulosa a la capa molecular; B: Necrosis de las células de Purkinje; C: Necrosis de neuronas piramidales y retracción de cuerpos neuronales.

En la gráfica 25 se muestra alteraciones histopatológicas en el cerebro de conejo en las que se destaca de degeneración Walleriana, oligodendrogliosis y espongiosis, además de edema

cerebral estas alteraciones muestran efectos del TCDD sobre este sistema el cual, según la literatura esta directamente relacionado con el receptor de arilo hidrocarburo (AhR) y aunque el mecanismo de acción del TCDD sobre el sistema nervioso no se ha examinado completamente suponemos que este puede causar dichos efectos dada su activación



Análisis histopatológicos del Cerebro de Conejos administrados con TCDD por vía oral a una dosis de 1.5  $\mu\text{g} / \text{Kg}$  A: Degeneración Walleriana, oligodendrogliosis y espongiosis; B: Edema cerebral, congestión capilar, necrosis neuronal, cromatolisis y neuronofagia; C: Edema pericapilar, espongiosis y satelitosis; D: Espongiosis submeníngica, congestión de capilares de leptomeninges.

## VII. DISCUSIÓN GENERAL

Los químicos de alteración endocrina (EDC) comprenden un grupo de compuestos químicos que se han examinado ampliamente debido a los efectos potencialmente dañinos para la salud de los humanos. Durante las últimas décadas, se ha prestado especial atención a los efectos nocivos de los EDC en el sistema reproductivo. En poblaciones humanas, la mayoría de los estudios apuntaron hacia una asociación entre la exposición a EDC para los trastornos del sistema reproductor masculino y / o femenino, como la infertilidad, la endometriosis, el cáncer de mama, el cáncer de testículo, la mala calidad y / o la función del esperma (Sifakis et al., 2017). Tanto las poblaciones humanas como las animales están continuamente expuestas a EDC ubicuos sintéticos y naturales a través de la dieta, el contacto dérmico y / o la inhalación, por lo tanto, potencialmente comprometiendo la salud reproductiva masculina (Tavares et al., 2016). El interés en los efectos en la salud pública de los químicos de alteración endocrina con respecto a los efectos de las exposiciones a dosis bajas a largo plazo está aumentando (Veerasingam y Ali Mohd, 2013). En este estudio, se analizó el efecto de las dosis bajas (0.375; 0.75; 1.5  $\mu\text{g} / \text{Kg}$ ) de TCDD sobre la calidad del esperma. Estos animales se expusieron durante 10 días a tres niveles de dosis bajas de TCDD. Por otro lado, el efecto de este disruptor endocrino sobre la apoptosis y la muerte de espermatozoides en conejos se analizó mediante citometría de flujo (FCM). En este trabajo para el análisis de la integridad de la membrana y la apoptosis de los espermatozoides expuestos a TCDD, se utilizó la citometría de flujo. Se han desarrollado numerosos protocolos en la última década que permiten la evaluación simultánea de múltiples parámetros en los espermatozoides (Gillan et al., 2005; Hossain et al., 2011; Ayhan et al., 2016). Los desarrollos en la citometría de flujo han permitido una mejor comprensión de la biología de los espermatozoides, particularmente en los campos de la espermatozoología clínica y la biotecnología de espermatozoides (Barrier Battut et al., 2016). En el presente estudio, el uso de la combinación de Annexin V / IP y 7ADD para detectar espermatozoides vivos muertos y apoptóticos en muestras frescas obtenidas de ratones expuestos durante 10 días a dosis (0,375; 0,75; 1,5  $\text{mg} / \text{Kg}$ ) de TCCD. Otros informes en

la literatura han utilizado marcadores como la suspensión de células testiculares teñidas con Hoechst y el colorante PI (Gaysinskaya et al., 2014; Gaysinskaya e Bortvin, 2015). El yoduro de propidio (PI), que es el colorante más utilizado para evaluar cuantitativamente el contenido de ADN, se ha utilizado ampliamente para identificar poblaciones de células testiculares. La 7-aminoactinomicina D (7-AAD) es otro colorante intercalante que no atraviesa las membranas celulares intactas. Su capacidad de tinción aumenta aproximadamente 6 veces después del tratamiento con HCl, lo que disminuye la unión de las proteínas histonas al ADN en células espermáticas tetraploides, diploides y redondas, lo que aumenta la accesibilidad del tinte al ADN (Zembruski et al., 2012). En consecuencia, 7-AAD muestra diferencias en la condensación de la cromatina a medida que las células progresan a través de la meiosis más claramente que la tinción con PI. 7AAD, al igual que la PI, no penetra en las membranas celulares intactas y, por lo tanto, su aplicación está restringida a células permeabilizadas, células fijas o células con membranas dañadas. (Wlodkowic et al., 2011). Este estudio reveló los efectos tóxicos de las dosis bajas administradas con TCDD sobre la calidad del espermatozoides, la integridad de la membrana y la apoptosis en las células espermáticas que utilizan citometría de flujo; también el daño en el epitelio de los túbulos seminíferos (EST) y la disminución general en el diámetro de los túbulos seminíferos (DST) en ratones a diferentes dosis. Los resultados del presente estudio indican que a estas dosis bajas de TCDD causan toxicidad en el sistema reproductor, por lo que sugerimos que podrían ocurrir problemas de fertilidad. La infertilidad es uno de los mayores problemas, tanto en humanos como en animales, debido a la contaminación ambiental de los numerosos componentes químicos. Debido a que los animales y los humanos pueden tener contacto fácilmente con TCDD en muchos países, la intoxicación subclínica con TCDD debe considerarse en casos de infertilidad en ambos. El posible mecanismo de toxicidad relacionado con la actividad apoptótica en las células espermáticas sugiere que se deben realizar estudios adicionales, incluida la evaluación genotóxica, para evaluar si a estas dosis el TCDD puede dañar la fertilidad del hombre expuesto. Los resultados del presente estudio indican que incluso con estas dosis bajas de TCDD causan toxicidad en el sistema reproductor del conejo, por lo que se puede sugerir que podrían



ocurrir problemas de fertilidad. Este estudio reveló los efectos tóxicos de las dosis bajas administradas de TCDD en la calidad del espermatozoide, la integridad de la membrana y la apoptosis en las células espermáticas mediante citometría de flujo, el daño en el epitelio de los túbulos seminíferos (EST) y la reducción general en el diámetro del seminífero Túbulos (DST) en conejos en todas las dosis. Es imperativo investigar los efectos de estas EDC en diferentes concentraciones sobre la salud reproductiva masculina en animales y en humanos. Entre los parámetros evaluados para observar los efectos del TCDD a bajas dosis sobre el sistema inmune se registró el peso de hígado y el peso corporal en la Tabla 6 se muestra un decrecimiento del peso corporal en los ratones administrados con TCDD, después de 10 de administración por vía oral. En la misma se muestran diferencias significativas entre el peso corporal de grupo control y el grupo tratado con 0.75 y 1.5 µg/kg. Por otra parte no se muestra diferencias en el peso de hígado de los grupos tratados con respecto al control. En adición a la citometría, se realizaron cortes histopatológicos al hígado y al bazo de ambas especies en la figura 17 se muestra un corte de hígado de ratón expuesto a una dosis de 1.5 µg/Kg de TCDD observándose en la sección 17A del hígado un infiltrado inflamatorio mixto (linfocitos, células plasmáticas y neutrófilos) que engrosa el espacio portal. En la sección 17B muestra un espacio de infiltración linfoplasmocitaria. En la 17C se observan células hepáticas con micro vacuolas y núcleos con polimorfismo regenerativo con ligero agrandamiento nuclear, hipercromatismo y binucleación. Por otra parte en la sección 17D se muestran linfocitos escasos en los sinusoides. En humanos así como en la vida silvestre, la exposición a TCDD puede dañar las funciones cognitivas, desarrollo motor y conductas relacionadas con el género (Kodavanti et al., 2017). Estudios realizados in vitro en células endoteliales de rata, astrocitos y pericitos, sugiere que la exposición a TCDD durante la formación de la barrera hematoencefálica interrumpe y altera su función, en parte por la supresión de la acción del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial, que puede contribuir a los efectos adversos de TCDD en el Sistema Nervioso Central fetal.

## VIII. CONCLUSIONES GENERALES

Se concluye que:

1. El TCDD provoca alteraciones en la calidad de los espermatozoides específicamente en su movilidad, la integridad de la membrana y la apoptosis en las células espermáticas, además de ocasionar malformaciones en la cabeza del espermatozoide además se evidencio daño en el epitelio de los túbulos seminíferos (EST) y disminución general en el diámetro de los túbulos seminíferos (DST) a diferentes dosis en ambas especies. Los resultados del presente estudio indican que a estas dosis bajas de TCDD causan toxicidad en el sistema reproductor
2. El TCDD disminuye la apoptosis de las poblaciones linfocitarias de bazo e hígado de ratón y muestra este mismo efecto en las células de hígado y bazo de conejos por lo que se puede suponer un efecto inmunosupresor.
3. Las alteraciones histopatológicas como necrosis neuronal sobre las estructuras del sistema nervioso sugieren alta citotoxicidad y neurotoxicidad del producto sobre las estructuras nerviosas a bajas dosis.

## **IX. SUGERENCIAS**

El posible mecanismo de toxicidad relacionado con la actividad apoptótica en las células espermáticas sugiere que se deben realizar estudios adicionales, incluida la evaluación genotóxica, para evaluar si a estas dosis el TCDD puede dañar la fertilidad de otras especies.

Tomando como referencia el conjunto, nuestros nuevos hallazgos sugerimos realizar ensayos a bajas dosis de TCDD en modelos de autoinmunidad para conocer sobre los mecanismos de estas alteraciones, por el efecto tardío de la exposición a la contaminación con TCDD.

Se sugiere adoptar medidas de control en los piensos. Tales medidas pueden incluir la elaboración de orientaciones sobre Buenas Prácticas Agrícolas, Buenas Prácticas de Alimentación y Buenas Prácticas de Fabricación, así como las medidas para reducir las dioxinas y los BPC Análogos a las dioxinas presentes en los piensos, tales como:

- Identificación de zonas contaminadas y de la contaminación por dioxinas y análogos a las dioxinas debida a emisiones locales, a accidentes o a la eliminación de los contaminantes.
- Establecimiento de valores de orientación para el suelo y recomendación de usos agrícolas específicos (por ejemplo, la limitación del pastoreo o la utilización de técnicas agrícolas adecuadas).

## X. REFERENCIAS

- Babina, K., Dollard, M., Pilotto, L., & Edwards, J. W. (2012). Environmental exposure to organophosphorus and pyrethroid pesticides in South Australian preschool children: a cross sectional study. *Environ Int*, 48, 109-120. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22892382>. doi:10.1016/j.envint.2012.07.007
- Balaguer, P., Delfosse, V., Grimaldi, M., & Bourguet, W. (2017). Structural and functional evidences for the interactions between nuclear hormone receptors and endocrine disruptors at low doses. *C R Biol*, 340(9-10), 414-420. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29126514>. doi:10.1016/j.crv.2017.08.002
- Bergman, Å., Heindel, J. J., Jobling, S., Kidd, K. A., & Zoeller, R. T. (2013a). *State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012: an assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme and World Health Organization*. World Health Organization Retrieved from <https://www.myendnoteweb.com/EndNoteWeb.html?func=downloadInstallers&cat=download&>
- Besteman, E. G., Zimmerman, K. L., Huckle, W. R., Prater, M. R., Gogal, R. M., & Holladay, S. D. (2007). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) or diethylstilbestrol (DES) cause similar hematopoietic hypocellularity and hepatocellular changes in murine fetal liver, but differentially affect gene expression. *Toxicol Pathol*, 35(6), 788-794. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17943652>. doi:10.1080/01926230701584155
- Björndahl, L., Söderlund, I., & Kvist, U. (2003). Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum Reprod*, 18(4), 813-816. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12660276>.
- Bock, K. W. (2018). From TCDD-mediated toxicity to searches of physiologic AHR functions. *Biochem Pharmacol*, 155, 419-424. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30055148>. doi:10.1016/j.bcp.2018.07.032
- Carbone, L., & Austin, J. (2016). Pain and Laboratory Animals: Publication Practices for Better Data Reproducibility and Better Animal Welfare. *PLoS One*, 11(5), e0155001. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27171143>. doi:10.1371/journal.pone.0155001
- Chang, H. J., Park, J. S., Lee, E. K., Kim, M. H., Baek, M. K., Kim, H. R., . . . Jung, Y. D. (2009). Ascorbic acid suppresses the 2,3,7,8-tetrachloridibenxo-p-dioxin (TCDD)-induced CYP1A1 expression in human HepG2 cells. *Toxicol In Vitro*, 23(4), 622-

626. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19268519>. doi:10.1016/j.tiv.2009.02.008
- Chapin, R. E., Filler, R. S., Gulati, D., Heindel, J. J., Katz, D. F., Mebus, C. A., . . . Schrader, S. (1992). Methods for assessing rat sperm motility. *Reprod Toxicol*, 6(3), 267-273. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1591485>.
- Chen, H. M., Lee, Y. H., Chen, R. J., Chiu, H. W., Wang, B. J., & Wang, Y. J. (2013). The immunotoxic effects of dual exposure to PCP and TCDD. *Chem Biol Interact*, 206(2), 166-174. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24051191>. doi:10.1016/j.cbi.2013.09.005
- Colborn, T. (2004). Commentary: setting aside tradition when dealing with endocrine disruptors. *ILAR J*, 45(4), 394-400. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15454678>.
- Delistraty, D., & Stone, A. (2007). Dioxins, metals, and fish toxicity in ash residue from space heaters burning used motor oil. *Chemosphere*, 68(5), 907-914. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17350666>. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.01.070
- Dhanabalan, S., Mathur, P. P., & Latha, P. (2015). TCDD and corticosterone on testicular steroidogenesis and antioxidant system of epididymal sperm in rats. *Toxicol Ind Health*, 31(9), 811-822. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23363575>. doi:10.1177/0748233713475501
- di Domenico, A., & Zapponi, G. A. (1986). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the environment: human health risk estimation and its application to the Seveso case as an example. *Regul Toxicol Pharmacol*, 6(3), 248-260. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3775083>.
- Dopico, M., & Gómez, A. (2015). Review of the current state and main sources of dioxins around the world. *J Air Waste Manag Assoc*, 65(9), 1033-1049. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26068294>. doi:10.1080/10962247.2015.1058869
- Erdemli, M. E., Yigitcan, B., Gul, M., Bag, H. G., Gul, S., & Aksungur, Z. (2018). Thymoquinone is protective against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced hepatotoxicity. *Biotech Histochem*, 93(6), 453-462. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29701106>. doi:10.1080/10520295.2018.1453549
- Erthal, R. P., Siervo, G. E. M. L., Silveira, L. T. R., Scarano, W. R., & Fernandes, G. S. A. (2018). Can resveratrol attenuate testicular damage in neonatal and adult rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin during gestation? *Reprod Fertil Dev*, 30(3), 442-450. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28784202>. doi:10.1071/RD17180

- Fernández-González, R., Yebra-Pimentel, I., Martínez-Carballo, E., & Simal-Gándara, J. (2015). A Critical Review about Human Exposure to Polychlorinated Dibenzop-Dioxins (PCDDs), Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs) and Polychlorinated Biphenyls (PCBs) through Foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 55(11), 1590-1617. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24279584>. doi:10.1080/10408398.2012.710279
- Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., . . . Zoeller, R. T. (2015). Executive Summary to EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr Rev*, 36(6), 593-602. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26414233>. doi:10.1210/er.2015-1093
- Groot, M. J., & Van't Hooft, K. E. (2016). The Hidden Effects of Dairy Farming on Public and Environmental Health in the Netherlands, India, Ethiopia, and Uganda, Considering the Use of Antibiotics and Other Agro-chemicals. *Front Public Health*, 4, 12. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26942171>. doi:10.3389/fpubh.2016.00012
- Han, M., Liu, X., Liu, S., Su, G., Fan, X., Chen, J., . . . Xu, G. (2017). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces hepatic stellate cell (HSC) activation and liver fibrosis in C57BL6 mouse via activating Akt and NF-κB signaling pathways. *Toxicol Lett*, 273, 10-19. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28302560>. doi:10.1016/j.toxlet.2017.03.013
- Hao, Y., Liu, S., Lu, Z. N., Huang, J., & Zhao, M. (2018). The impact of environmental pollution on public health expenditure: dynamic panel analysis based on Chinese provincial data. *Environ Sci Pollut Res Int*, 25(19), 18853-18865. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29713982>. doi:10.1007/s11356-018-2095-y
- Hawkins, P., Morton, D. B., Burman, O., Dennison, N., Honess, P., Jennings, M., . . . BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW, U. J. W. G. o. R. (2011). A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Lab Anim*, 45(1), 1-13. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21123303>. doi:10.1258/la.2010.010031
- Kabir, E. R., Rahman, M. S., & Rahman, I. (2015). A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ Toxicol Pharmacol*, 40(1), 241-258. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26164742>. doi:10.1016/j.etap.2015.06.009
- Kalaiselvan, I., Samuthirapandi, M., Govindaraju, A., Sheeja Malar, D., & Kasi, P. D. (2016). Olive oil and its phenolic compounds (hydroxytyrosol and tyrosol) ameliorated TCDD-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of oxidative stress

- and apoptosis. *Pharm Biol*, 54(2), 338-346. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25955957>. doi:10.3109/13880209.2015.1042980
- Kanan, S., & Samara, F. (2018). Dioxins and furans: A review from chemical and environmental perspectives. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 17., 1-13.
- Kapp, R. W. (2014). *TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin)* (Elsevier Ed.).
- Katole, S. B., Kumar, P., & Patil, R. D. (2013). Environmental pollutants and livestock health: a review. *Veterinary Research International*, 1(1), 1-13.
- Kawamoto, K., & Miyata, H. (2015). Dioxin formation and control in a gasification-melting plant. *Environ Sci Pollut Res Int*, 22(19), 14621-14628. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24894757>. doi:10.1007/s11356-014-3104-4
- Kodavanti, P. R. S., Valdez, J., Yang, J. H., Curras-Collazo, M., & Loganathan, B. G. (2017). Polychlorinated Biphenyls, Polybrominated Biphenyls, Polychlorinated Dibenzop-dioxins, and Polychlorinated Dibenzofurans. In A. Press (Ed.), *Reproductive and Developmental Toxicology* (Second ed., pp. 711-743): Elsevier.
- Kortenkamp, A., Martin, O., Faust, M., Evans, R., McKinlay, R., Orton, F., & Rosivatz, E. (2011). *State of the art assessment of endocrine disrupters. Final report*. Retrieved from
- Kulkarni, P. S., Crespo, J. G., & Afonso, C. A. (2008). Dioxins sources and current remediation technologies--a review. *Environ Int*, 34(1), 139-153. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17826831>. doi:10.1016/j.envint.2007.07.009
- Kuo, C. H., Yang, S. N., Kuo, P. L., & Hung, C. H. (2012). Immunomodulatory effects of environmental endocrine disrupting chemicals. *Kaohsiung J Med Sci*, 28(7 Suppl), S37-42. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22871600>. doi:10.1016/j.kjms.2012.05.008
- Li, J., Phadnis-Moghe, A. S., Crawford, R. B., & Kaminski, N. E. (2017). Aryl hydrocarbon receptor activation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin impairs human B lymphopoiesis. *Toxicology*, 378, 17-24. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28049042>. doi:10.1016/j.tox.2016.12.010
- Li, Y., Luh, C. J., Burns, K. A., Arao, Y., Jiang, Z., Teng, C. T., . . . Korach, K. S. (2013). Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs): In Vitro Mechanism of Estrogenic Activation and Differential Effects on ER Target Genes. *Environmental Health Perspectives*, 121(4), 459-466. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000323706100030. doi:10.1289/ehp.1205951
- Liu, Q., Spitsbergen, J. M., Cariou, R., Huang, C. Y., Jiang, N., Goetz, G., . . . Carvan, M. J. (2014). Histopathologic alterations associated with global gene expression due to

- chronic dietary TCDD exposure in juvenile zebrafish. *PLoS One*, 9(7), e100910. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24988445>. doi:10.1371/journal.pone.0100910
- Maffini, M. V., Rubin, B. S., Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (2006). Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Mol Cell Endocrinol*, 254-255, 179-186. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16781053>. doi:10.1016/j.mce.2006.04.033
- Mandal, P. K. (2005). Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *J Comp Physiol B*, 175(4), 221-230. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15900503>. doi:10.1007/s00360-005-0483-3
- Maranghi, F., Tassinari, R., Moracci, G., Altieri, I., Rasinger, J. D., Carroll, T. S., . . . Mantovani, A. (2013). Dietary exposure of juvenile female mice to polyhalogenated seafood contaminants (HBCD, BDE-47, PCB-153, TCDD): comparative assessment of effects in potential target tissues. *Food Chem Toxicol*, 56, 443-449. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23500779>. doi:10.1016/j.fct.2013.02.056
- Melekoglu, R., Ciftci, O., Cetin, A., Basak, N., & Celik, E. (2016). The beneficial effects of Montelukast against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p -dioxin toxicity in female reproductive system in rats. *Acta Cir Bras*, 31(8), 557-563. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27579884>. doi:10.1590/S0102-8650201600800000009
- Messerlian, C., Martinez, R. M., Hauser, R., & Baccarelli, A. A. (2017). 'Omics' and endocrine-disrupting chemicals - new paths forward. *Nat Rev Endocrinol*, 13(12), 740-748. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28707677>. doi:10.1038/nrendo.2017.81
- Mohsenzadeh, M. S., Zanjani, B. R., & Karimi, G. (2018). Mechanisms of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin- induced cardiovascular toxicity: An overview. *Chem Biol Interact*, 282, 1-6. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29317249>. doi:10.1016/j.cbi.2018.01.002
- Monneret, C. (2017). What is an endocrine disruptor? *C R Biol*, 340(9-10), 403-405. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29126512>. doi:10.1016/j.crvi.2017.07.004
- Muñoz, M., Gullett, B. K., Touati, A., & Font, R. (2012). Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on PCDD/F emissions from open burning of biomass. *Environ Sci Technol*, 46(17), 9308-9314. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22845342>. doi:10.1021/es301954t
- Nadal, A., Alonso-Magdalena, P., Soriano, S., Quesada, I., & Ropero, A. B. (2009). The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for



- blood glucose homeostasis and diabetes. *Mol Cell Endocrinol*, 304(1-2), 63-68. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19433249>. doi:10.1016/j.mce.2009.02.016
- Olea Serrano, N., Fernández, M. F., & Martín-Olmedo, P. (2001). Disruptores endocrinos: el caso particular de los xenobióticos estrogénicos. I. Estrógenos naturales. In (Vol. 1, pp. 6-11): *Rev. Salud Ambient.*
- Patisaul, H. B. (2017). Endocrine disruption by dietary phyto-oestrogens: impact on dimorphic sexual systems and behaviours. *Proc Nutr Soc*, 76(2), 130-144. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27389644>. doi:10.1017/S0029665116000677
- Patrizi, B., & Siciliani de Cumis, M. (2018). TCDD Toxicity Mediated by Epigenetic Mechanisms. *Int J Mol Sci*, 19(12). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30567322>. doi:10.3390/ijms19124101
- Rathna, R., Varjani, S., & Nakkeeran, E. (2018). Recent developments and prospects of dioxins and furans remediation. *J Environ Manage*, 223, 797-806. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29986327>. doi:10.1016/j.jenvman.2018.06.095
- Romano Pozo, D. (2012). DISRUPTORES ENDOCRINOS, nuevas respuestas para nuevos retos. In *Madrid: Instituto Sindical de Trabajo, Ambiente y Salud (ISTAS)*.
- Roy, N. K., Candemlo, A., DellaTorre, M., Chambers, R. C., Nádas, A., & Wirgin, I. (2018). Characterization of AHR2 and CYP1A expression in Atlantic sturgeon and shortnose sturgeon treated with coplanar PCBs and TCDD. *Aquat Toxicol*, 197, 19-31. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29427830>. doi:10.1016/j.aquatox.2018.01.017
- Salgueiro González, N. (2015). *Estudio de disruptores endocrinos en el medio ambiente*. (Doctorado), Universidad de Coruña, España.
- Sanabria, M., Cuciello, M. S., Guerra, M. T., Dos Santos Borges, C., Banzato, T. P., Perobelli, J. E., . . . De Grava Kempinas, W. (2016). Sperm quality and fertility in rats after prenatal exposure to low doses of TCDD: A three-generation study. *Reprod Toxicol*, 65, 29-38. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27352640>. doi:10.1016/j.reprotox.2016.06.019
- Schug, T. T., Johnson, A. F., Birnbaum, L. S., Colborn, T., Guillette, L. J., Crews, D. P., . . . Heindel, J. J. (2016). Minireview: Endocrine Disruptors: Past Lessons and Future Directions. *Mol Endocrinol*, 30(8), 833-847. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27477640>. doi:10.1210/me.2016-1096

- Schuster, J. K., Harner, T., Fillmann, G., Ahrens, L., Altamirano, J. C., Aristizábal, B., . . . Tominaga, M. Y. (2015). Assessing polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans in air across Latin American countries using polyurethane foam disk passive air samplers. *Environ Sci Technol*, 49(6), 3680-3686. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25686404>. doi:10.1021/es506071n
- 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. *Toxicol Sci*, 81(2), 401-407. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15240895>. doi:10.1093/toxsci/kfh212
- Singh, S., & Nelapati, K. (2017). Effect of food processing on degradation of hexachlorocyclohexane and its isomers in milk. *Vet World*, 10(3), 270-275. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28435187>. doi:10.14202/vetworld.2017.270-275
- Sorg, O. (2014). AhR signalling and dioxin toxicity. *Toxicol Lett*, 230(2), 225-233. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24239782>. doi:10.1016/j.toxlet.2013.10.039
- Stohs, S. J. (1990). Oxidative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Free Radic Biol Med*, 9(1), 79-90. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2210442>.
- Tavakoly Sany, S. B., Hashim, R., Salleh, A., Rezayi, M., Karlen, D. J., Razavizadeh, B. B., & Abouzari-Lotf, E. (2015). Dioxin risk assessment: mechanisms of action and possible toxicity in human health. *Environ Sci Pollut Res Int*, 22(24), 19434-19450. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26514567>. doi:10.1007/s11356-015-5597-x
- Turkez, H., Geyikoglu, F., & Yousef, M. I. (2013). Beneficial effect of astaxanthin on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced liver injury in rats. *Toxicol Ind Health*, 29(7), 591-599. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22312033>. doi:10.1177/0748233711434959
- Vandenberg, L. N. (2014). Low-dose effects of hormones and endocrine disruptors. *Vitam Horm*, 94, 129-165. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24388189>. doi:10.1016/B978-0-12-800095-3.00005-5
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Lee, D. H., . . . Myers, J. P. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev*, 33(3), 378-455. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22419778>. doi:10.1210/er.2011-1050

- Wang, P., Zhang, Q., Lan, Y., Xu, S., Gao, R., Li, G., . . . Jiang, G. (2014). Dioxins contamination in the feed additive (feed grade cupric sulfate) tied to chlorine industry. *Sci Rep*, 4, 5975. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25102073>. doi:10.1038/srep05975
- Watson, J. D., Prokopec, S. D., Smith, A. B., Okey, A. B., Pohjanvirta, R., & Boutros, P. C. (2014). TCDD dysregulation of 13 AHR-target genes in rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol*, 274(3), 445-454. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24355419>. doi:10.1016/j.taap.2013.12.004
- White, S. S., & Birnbaum, L. S. (2009). An overview of the effects of dioxins and dioxin-like compounds on vertebrates, as documented in human and ecological epidemiology. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 27(4), 197-211. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19953395>. doi:10.1080/10590500903310047
- Wyrobek, A. J., & Bruce, W. R. (1975). Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(11), 4425-4429. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1060122>.
- Young, A. L. (2006). Enhanced co-metabolism of TCDD in the presence of high concentrations of phenoxy herbicides. *Environ Sci Pollut Res Int*, 13(3), 149-150. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16758703>.
- Zoeller, R. T., Bergman, Å., Becher, G., Bjerregaard, P., Bornman, R., Brandt, I., . . . Vandenberg, L. N. (2014). A path forward in the debate over health impacts of endocrine disrupting chemicals. *Environ Health*, 13, 118. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25533907>. doi:10.1186/1476-069X-13-118
- Şahin, A. D., & Saçan, M. T. (2018). Understanding the toxic potencies of xenobiotics inducing TCDD/TCDF-like effects. *SAR QSAR Environ Res*, 29(2), 117-131. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29308921>. doi:10.1080/1062936X.2017.1414075