



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANA PAULA FRANCO PUNHAGUI

**EFEITOS DA OBESIDADE, HIPOTIREOIDISMO E  
HIPERTIREOIDISMO EM TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS  
DE CAMUNDONGOS C57BL/6 ADULTOS**

---

Londrina  
2018

ANA PAULA FRANCO PUNHAGUI

**EFEITOS DA OBESIDADE, HIPOTIREOIDISMO E  
HIPERTIREOIDISMO, EM TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS  
DE CAMUNDONGOS C57BL/6 ADULTOS**

Exame de defesa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa Dra Glaura Scantamburlo  
Alves Fernandes

Coorientador: Prof Dr Francemilson Goulart-  
Silva

Londrina  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Punhagui, Ana Paula Franco.

EFEITOS DA OBESIDADE, HIPOTIREOIDISMO E HIPERTIREOIDISMO EM TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS DE CAMUNDONGOS C57BL/6 ADULTOS / Ana Paula Franco Punhagui. - Londrina, 2018.  
93 f. : il.

Orientador: Glaura Scantamburlo Alves Fernandes.

Coorientador: Francemilson Goulart-Silva.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Obesidade - Tese. 2. Hipotireoidismo - Tese. 3. Hipertireoidismo - Tese. 4. Órgãos reprodutores - Tese. I. Fernandes, Glaura Scantamburlo Alves . II. Goulart-Silva, Francemilson . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

ANA PAULA FRANCO PUNHAGUI

**EFEITOS DA OBESIDADE, HIPOTIREOIDISMO E HIPERTIREOIDISMO, EM  
TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS DE CAMUNDONGOS C57BL/6 ADULTOS**

Exame de defesa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Profa Dra Glaura  
Scantamburlo Alves Fernandes  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa Dra Marli Cardoso Martins Pinge  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Dra Larissa Staurengo Ferrari  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 20 de fevereiro de 2018.

Aos meus pais, Marília e José Carlos, pelo apoio infinito e amor incondicional.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina, UEL, por todo acolhimento e infraestrutura para que esse trabalho fosse possível ser realizado. Obrigada a todos os funcionários que com tanta excelência fazem desta universidade um lar.

À CAPES, pelo auxílio financeiro na forma de bolsa de estudo, permitindo me dedicar exclusivamente à pesquisa.

À minha orientadora Glaura Scantamburlo Alves Fernandes pelo apoio emocional e psicológico, bem como pelo conhecimento, dedicação e alegria. Obrigada por fazer da rotina de laboratório um ambiente mais leve, prazeroso e aconchegante. Com você aprendi a nunca desistir ou desanimar diante de um resultado não esperado, a sempre erguer a cabeça e fazer de novo, e analisar com precisão os resultados encontrados.

Ao meu co-orientador Francemilson Goulart da Silva pelo incentivo à pesquisa, pela realização da parte experimental e pelo acolhimento nas coletas e na cidade de São Paulo. Obrigada por todo conhecimento, carinho e paciência para ensinar. Agradeço também ao pessoal do laboratório pelas risadas e conversas inspiradoras.

Ao Seu Sérgio por prestar seu serviço com excelência, por escutar e resolver os problemas, pelas conversas e risadas. Obrigada por tudo, você é muito importante para todos.

Ao coordenador do curso de Patologia Experimental, Prof Dr Wander Rogério Pavanelli por toda dedicação e excelência em resolver os problemas e dilemas dos alunos.

À banca examinadora composta pela Profa Dra Marli e Dra Larissa por terem aceito o convite para me avaliarem, por toda a atenção e carinho em ler meu trabalho e contribuir grandemente com ele, e também pelo apoio e ensinamento.

Aos meus amigos do Laboratório de Toxicologia e Distúrbios Metabólicos da Reprodução, em especial: Eliane Swely, Fernanda, Gláucia e Rafaela. Obrigada pelo apoio emocional, por escutar quando estava em crise e por auxiliar em todos os passos do mestrado.

Aos técnicos do interlaboratório do departamento de Biologia Geral: Melissa, Carlinhos e Dário pelos conselhos e por me socorrer sempre que precisei.

Aos professores do Programa de Patologia Experimental pela excelência em ensinar e transmitir todo o conhecimento para que fosse possível receber esse título.

Aos professores e colegas parceiros Marina Trevisan Guerra e Renata da Rosa pelo apoio e ensinamento.

Aos meus amigos Ana Beatriz Monteiro, Angélica Tiepo, Maiara Sugeta, João Felipe Besegato e Anelise Franciosi por me atuarem de bom e mal humor durante essa jornada, vocês mantiveram minha sanidade e minha psicologia íntegra. Obrigada pelo apoio, pelas conversas, pelos conselhos e pelos desabafos durante o curso.

Ao meu namorado Giovane pelo carinho, amor e companheirismo em todos os momentos. Obrigada por me apoiar e estar presente nos momentos difíceis e me acolher nos momentos de tristeza. Obrigada por me alegrar com suas piadas e seu bom humor, além do seu abraço acolhedor sempre. Com certeza, um amor para vida inteira, uma amizade eterna e um companheiro para minha jornada.

Principalmente, à minha família, pai e mãe, por se dedicarem com tanta firmeza nesses 2 anos de mestrado e me ajudarem a concretizar minha jornada acadêmica. Sem o apoio, amor incondicional e educação de vocês nada disso seria possível. Obrigada por me abrigarem em meio a tempestade, por escutarem meus desabafos e por me abraçarem quando estava em crise existencial. Agradeço também à minha irmã por estar presente e aturar minha irritação, mesmo quando não estava muito disposta.

À minha avó Virgínia pelos almoços delicioso de domingo, pelas conversas e por estar sempre presente e ao meu lado nessa jornada acadêmica, obrigada por mostrar seu orgulho sempre. Ao meu avô Antônio, que hoje está na presença de Deus, sei que está feliz por todas as minhas conquistas, obrigada pelo apoio, broncas e carinho, saudades!

Aos meus avós Sônia e Anísio, pelos conselhos, apoio, ajuda e pelo amor demonstrado em todos os passos dessa jornada. Obrigada por se mostrarem orgulhosos durante toda a minha vida acadêmica, vocês são parte fundamental da minha vida.

What is the big "why" of doing what we do? Love. Time. Death. These three abstractions connect all humans on Earth. All that we desire, all we fear not to possess is because, after all, we long for love, we long for more time, and we fear death.

Movie Collateral Beauty

PUNHAGUI, Ana Paula Franco. **Efeitos da obesidade, hipotireoidismo e hipertireoidismo em testículos e epidídimos de camundongos C57BL/6 adultos**. 2018. 93 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

Obesidade e desordens hormonais na tireoide são muito comuns na população e ambos são considerados um problema de saúde pública, visto que esses distúrbios metabólicos agravam o risco de infertilidade, por alteração no perfil hormonal e anormalidades nos parâmetros funcionais do trato genital masculino. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o impacto das desordens dos hormônios tireoidianos (hipotireoidismo e hipertireoidismo) em camundongos alimentados com dieta padrão ou dieta hiperlipídica sobre a morfologia e função de testículos e epidídimos. Para isso, camundongos C57BL/6 adultos machos foram distribuídos em 6 grupos experimentais alimentados com dieta padrão (DP) ou hiperlipídica (DHL) durante 12 semanas. Após ambos grupos foram tratados com salina (DP e DHL), PTU (droga antitireoidiana propiltiouracil – DP+PTU e DHL+PTU) ou T3 (hormônio triiodotironina – DP+T3 e DHL+T3) durante mais 30 dias. Ao final os animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia. O soro do sangue foi utilizado para dosagem de hormônio luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH), testosterona e T4 livre. O testículo e epidídimo foram removidos para dosagem do perfil inflamatório de citocinas ( $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$  e  $IL10$ ) e a quantidade de macrófagos (NAG) e de neutrófilos (MPO), além da contagem espermática, análise histopatológica, morfométrica, estereológica e de dinâmica espermatogênica, somado às análises de estresse oxidativo. Os espermatozoides do ducto deferente foram retirados para análise de morfologia espermática. O peso da próstata e do fígado aumentaram nos grupos obeso (DHL+salina) e hipotireoideo obeso (DHL+PTU). O peso da vesícula cheia diminuiu no grupo hipertireoideo obeso (DHL+T3) e da vesícula vazia aumentou no grupo DHL+PTU. A eficácia na indução do hipotireoidismo e hipertireoidismo foi confirmada pela expressão pituitária de mRNA  $TSH\beta$ , na qual ficou aumentada na condição de hipotireoidismo e reduzida na condição de hipertireoidismo independente da dieta; enquanto que a eficácia na indução da obesidade foi confirmada com o aumento significativo do peso dos animais alimentados com DHL+salina e DHL+PTU. A dosagem de LH ficou aumentada no grupo hipertireoideo (DP+T3); enquanto, a dosagem de T4 livre diminuiu nos grupos hipo (DP+PTU e DHL+PTU) e hipertireoideo (DP+T3 e DHL+T3), independente da dieta. A contagem de espermátides e a produção diária de espermatozoides (PDE) no testículo aumentaram no grupo DHL+salina e diminuíram no grupo DP+T3 comparado aos demais grupos. A altura do epitélio germinativo aumentou nos grupos DHL+PTU e DHL+T3. A estereologia epididimária da cabeça teve aumento de epitélio no grupo DP+PTU e diminuição na região intersticial do grupo DHL+T3; na cauda teve aumento na região intersticial do grupo DP+T3. A dosagem das enzimas NAG (macrófago) e MPO (neutrófilo) não tiveram resultado significativo entre os grupos. A dosagem de  $IL1\beta$  no testículo aumentou no grupo DHL+T3 e diminuiu no grupo

DHL+salina comparado ao controle (DP+salina), enquanto que as demais citocinas ( $TNF\alpha$  e IL10) não tiveram resultados significativos. A peroxidação lipídica aumentou no grupo DP+PTU comparado ao controle. Com isso, podemos concluir que tanto a dieta hiperlipídica como a desregulação dos hormônios tireoidianos impactaram o tecido testicular e epididimário, porém o hipertireoidismo e a obesidade associados ou isolados prejudicaram com maior intensidade os parâmetros espermáticos.

**Palavra-chave:** Obesidade. Hipotireoidismo. Hipertireoidismo. Testículo. Epidídimo.

PUNHAGUI, Ana Paula Franco. **Effects of obesity, hypothyroidism and hyperthyroidism in testis and epididymis of C57BL/6 adult mice.** 2018. 93 p. Dissertation (Master's Degree Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

Obesity and hormonal disorders in the thyroid are very common in the population and both are considered a public health problem, since these metabolic disorders aggravate the risk of infertility, altered hormonal profile and abnormalities in the functional parameters of the male genital tract. The objective of this study was to evaluate the impact of thyroid hormone disorders (hypothyroidism and hyperthyroidism) on mice fed a standard diet or a high-fat diet on the morphology and function of the testis and epididymis. For this, male C57BL/6 mice were distributed in 6 experimental groups fed standard diet (SD) or high-fat diet (HFD) for 12 weeks. After, both groups were treated with saline (SD+saline and HFD+saline), PTU (antithyroid drug propylthiouracil - SD+PTU and HFD+PTU) or T3 (hormone triiodothyronine - SD+T3 and HFD+T3) for another 30 days. At the end, the animals were anesthetized and submitted to euthanasia. Blood serum was used for dosage of luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH), testosterone and free T4. The testis and epididymis were removed to quantify the inflammatory profile of cytokines (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  and IL10) and the number of macrophages (NAG) and neutrophils (MPO), as well as sperm count, histopathological, morphometric, stereological and spermatogenic dynamics, added to the analyzes of oxidative stress. The spermatozoa of the vas deferens were removed for analysis of spermatid morphology. The weight of the prostate increased in the obese (HFD+saline) and obese hypothyroid (HFD+PTU) groups. The weight of the full vesicle decreased in the obese hyperthyroid group (HFD+T3) and the empty vesicle increased in the HFD+PTU group. The efficacy in the induction of hypothyroidism and hyperthyroidism was confirmed by the pituitary expression of TSH $\beta$  mRNA, in which it was increased in the condition of hypothyroidism and reduced in the condition of diet-independent hyperthyroidism; while the efficacy in obesity induction was confirmed with a significant increase in the weight of the animals fed HFD+saline and HFD+PTU. The LH dosage was increased in the hyperthyroid group (SD+T3); while the free T4 levels decreased in the hypo (SD+PTU and HFD+PTU) and hyperthyroid (SD+T3 and HFD+T3) groups, regardless of diet. The spermatid count and daily sperm production (PDE) in the testis increased in the HFD+saline group and decreased in the SD+T3 group compared to the other groups. The height of the germinal epithelium increased in the HFD+PTU and HFD+T3 groups. The epididymal stereology of the head had increased epithelium in the DP + PTU group and decreased in the interstitial region of the DHL + T3 group; in the tail had an increase in the interstitial region of the SD+T3 group. The dosages of the NAG (macrophage) and MPO (neutrophil) enzymes did not show significant results between the groups. The IL1 $\beta$  dosage in the testis increased in the HFD+T3 group and decreased in the HFD+saline group compared to the control (SD+saline), whereas the other cytokines (TNF $\alpha$  and IL10) did not have

significant results. Lipid peroxidation increased in the SD+PTU group compared to the control group. With this, we can conclude that both the high-fat diet and the dysregulation of thyroid hormones had an impact on the testicular and epididymal tissue, but associated or isolated hyperthyroidism and obesity affected the sperm parameters more intensely.

**Keywords:** Obesity. Hypothyroidism. Hyperthyroidism. Testis. Epididymis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Aspecto macroscópico do sistema genital masculino de roedores .....	16
<b>Figura 2.</b>	Esquema representativo do testículo e epidídimo.....	17
<b>Figura 3.</b>	Esquema do epitélio germinativo do túbulo seminífero e da área intersticial que circunda o túbulo .....	18
<b>Figura 4.</b>	Ciclo da espermatogênese em camundongos .....	19
<b>Figura 5.</b>	Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-testículo e a ação hormonal em <i>feedback</i> .....	21
<b>Figura 6.</b>	Organização esquemática da maioria dos tipos celulares do epidídimo observadas em microscópio de luz.....	22
<b>Figura 7.</b>	Mecanismo esquemático de regulação dos hormônios tireoidianos no eixo hipotálamo-hipófise-tireoide .....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DP	dieta padrão
DHL	dieta hiperlipídica
PTU	6-n-propil-2-tiouracil
PDE	produção diária de espermatozoides
SD	<i>standart diet</i>
HFD	<i>high-fat diet</i>
DSP	<i>daily sperm production</i>
NAG	N-acetilglucosaminidase
MPO	Mieloperoxidase
DHT	diidrotestosterona
ABP	proteína de ligação a andrógenos
BHT	barreira hemato-testicular
FSH	hormônio folículo estimulante
LH	hormônio luteinizante
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofina
AR	receptores androgênicos
EROs	espécies reativas de oxigênio
BHE	barreira hemato-epididimária
pH	potencial hidrogeniônico
APE	antígeno prostático específico
OMS	Organização Mundial de Saúde
SHBG	globulina transportadora de hormônio sexual
DPN	dias pós-natal
PND	<i>post natal days</i>
HT	hormônio tireoidiano
SBEM	Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia
T3	triiodotironina
T4	tiroxina
TRs	receptores de hormônios tireoidianos
TSH	hormônio estimulante da tireoide
TRH	hormônio liberador de tireotrofina
TR $\alpha$ 1	receptor de hormônio T3 tipo $\alpha$ 1

TR $\beta$ 1	receptor de hormônio T3 tipo $\beta$ 1
TR $\beta$ 2	receptor de hormônio T3 tipo $\beta$ 2
THRA	gene de hormônio tireoidiano tipo A
THRB	gene de hormônio tireoidiano tipo B
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ATA	teste com anticorpo antitireoglobulina
AMA	teste com anticorpo antimicrosomático
FNAC	citologia aspirativa por agulha fina
Treg	células T regulatórias
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral
IL-6	interleucina-6
IL-1 $\beta$	interleucina-1 beta
REE	gasto total de energia em repouso
IMC	índice de massa corpórea

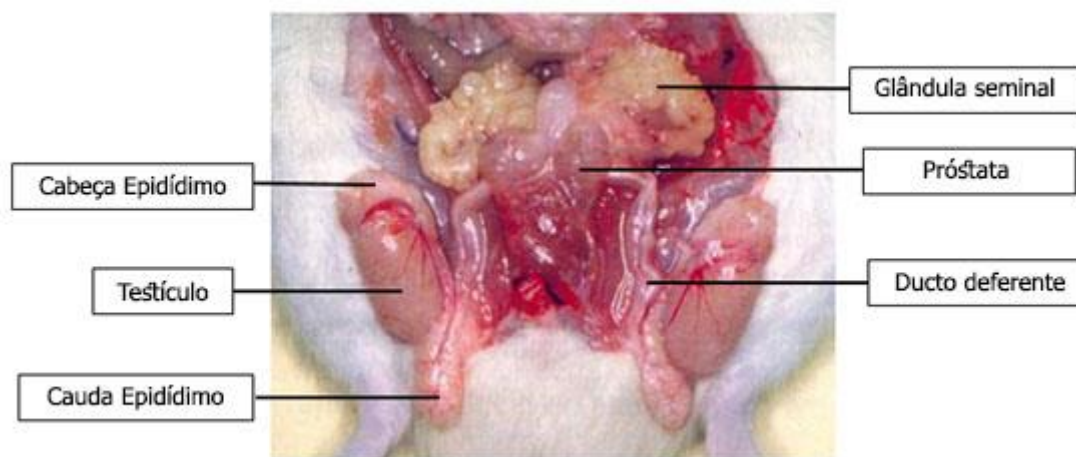
## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 SISTEMA GENITAL MASCULINO .....	16
1.2 OBESIDADE.....	24
1.3 OBESIDADE E SISTEMA GENITAL MASCULINO.....	27
1.4 DESREGULAÇÃO DA TIREOIDE: HIPOTIREOIDISMO E HIPERTIREOIDISMO .....	29
1.5 DESREGULAÇÃO DA TIREOIDE E SISTEMA GENITAL MASCULINO .....	32
1.6 OBESIDADE, HIPOTIREOIDISMO E HIPERTIREOIDISMO.....	34
1.7 INFLAMAÇÃO E DISTÚRBIOS METABÓLICOS .....	36
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	38
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	39
3.1 GERAL.....	39
3.2 ESPECÍFICOS.....	39
<b>4 ARTIGO 1</b> .....	40
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	85
<b>REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO DA INTRODUÇÃO</b> .....	86

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 SISTEMA GENITAL MASCULINO

O sistema genital masculino é composto por testículos, epidídimos, ductos deferentes, e glândulas sexuais acessórias, como próstata, glândula seminal (Figura 1), coaguladora, bulbouretral e prepucial. Todos esses órgãos dependem da ação dos hormônios testosterona e diidrotestosterona (DHT) para desenvolvimento e manutenção de sua morfologia e função (COSTANZO, 2005).

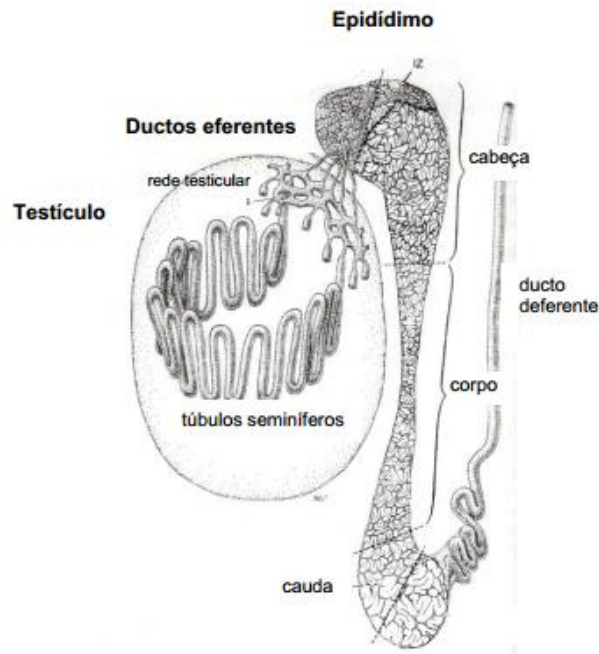


**Figura 1.** Aspecto macroscópico do sistema genital masculino de roedores (adaptado de PEROBELLI, 2012).

Os testículos possuem duas principais funções: espermatogênese e produção de testosterona. Ocupam o escroto do animal, fora da cavidade corpórea, e são mantidos em torno de 34°C. Para manutenção correta da espermatogênese e esteroidogênese testicular, neste órgão ocorre circulação contracorrente das artérias e veias testiculares, facilitando a troca de calor (COSTANZO, 2005).

Em humanos, a túnica albugínea é uma cápsula de tecido conjuntivo denso que envolve os testículos, sendo espessa na região posterior do órgão, formando o mediastino do qual partem septos fibrosos em sentido radial dividindo o parênquima testicular em lóbulos piramidais e lóbulos ocupados pelos túbulos seminíferos, cuja função é a produção de espermatozoides (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). O parênquima testicular de ratos e camundongos é formado por um conjunto de 20 túbulos seminíferos, em média,

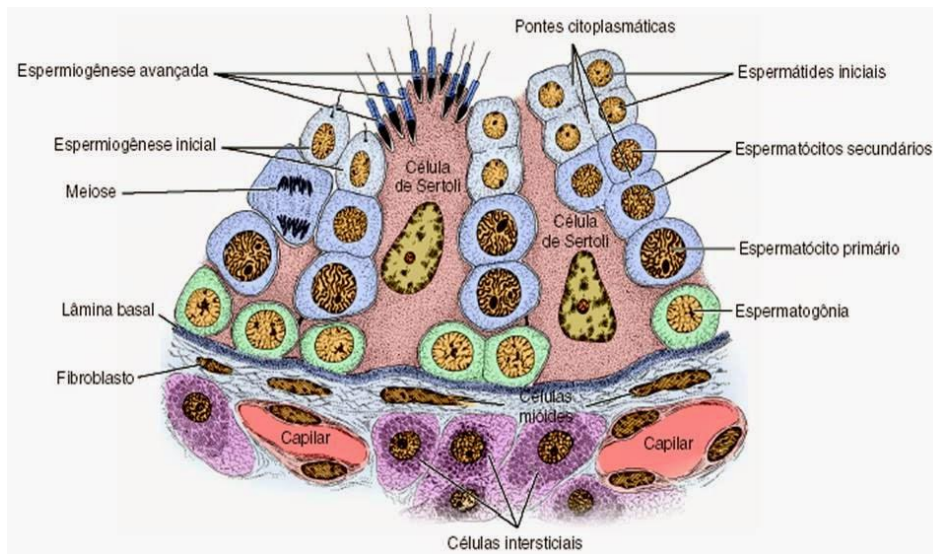
que apresenta pouco tecido conjuntivo e isento de lóbulos. Ao final de cada túbulo seminífero existe uma região de transição em que se conectam formando a rede testicular (Figura 2) (FOLEY, 2001).



**Figura 2.** Esquema representativo do testículo e epidídimo. O testículo está representado com os túbulos seminíferos e a rede testicular. O epidídimo subdivide-se em 3 regiões características (cabeça, corpo e cauda) e o ducto deferente (adaptado de ROBAIRE; HERMO, 1988).

O epitélio germinativo dos túbulos seminíferos é formado por células de Sertoli e células germinativas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides) apoiadas no tecido peritubular de revestimento (Figura 3) (CLERMONT, 1972). As células somáticas de Sertoli interagem quimicamente com células germinativas em desenvolvimento, garantindo a sustentação física e nutricional dessas células (FOLEY, 2001), além de secretar proteínas inibina, activina e de ligação a andrógenos (ABP), realizar fagocitose de restos celulares e do excesso de citoplasma das espermátides durante a espermiogênese, garantir uma barreira hemato-testicular (BHT), e secretar fluido testicular rico em íons e fatores de crescimento. Além disso, forma dois compartimentos nos túbulos seminíferos (basal e adluminal) através da BHT por junções oclusivas criando um microambiente favorável ao desenvolvimento das células germinativas, protegendo os tipos celulares em estágios mais diferenciados

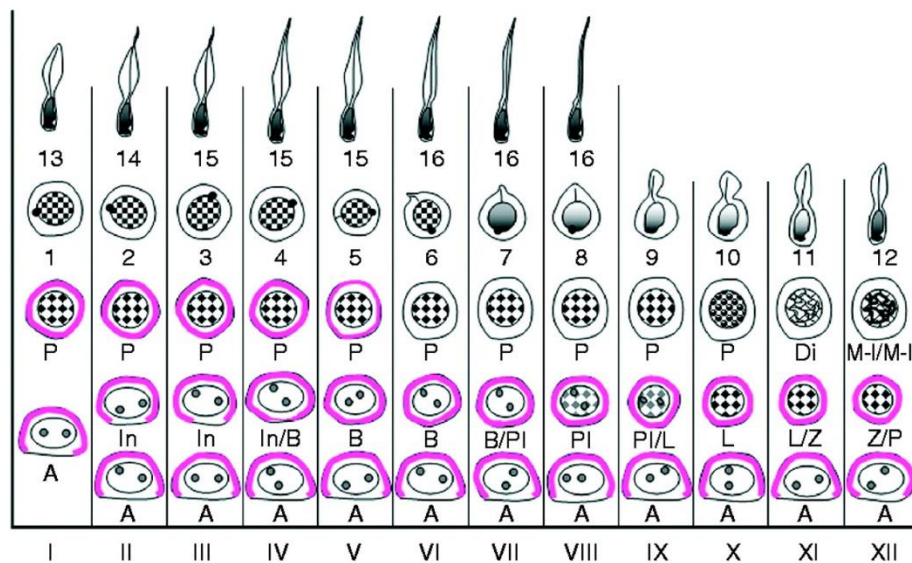
(COSTANZO, 2005; GARCIA; FERNÁNDEZ, 2009; KIERSZENBAUM, 2008; PINEAU; DUPAIX; JÉGOU, 1999).



**Figura 3.** Esquema do epitélio germinativo do túbulo seminífero e da área intersticial que circunda o túbulo. Os túbulos seminíferos estão apoiados pela lâmina basal com células mióides contráteis e achatadas. No interstício estão situados vasos sanguíneos e fibroblastos, além das células intersticiais de Leydig. O epitélio possui espermatogônias, espermatócitos (primário e secundário), espermatídeos iniciais e tardias que estão localizadas na porção apical às junções oclusivas das células de Sertoli, as quais se projetam da lâmina basal até o lúmen do túbulo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O processo de espermatogênese (Figura 4) pode ser dividido em três fases distintas: proliferativa mitótica, meiótica e espermiogênica (CLERMONT, 1972; RUSSELL et al., 1993). A fase mitótica é caracterizada pela proliferação das espermatogônias-tronco do tipo A isolada com a finalidade de aumentar a população espermatogonial, acarretando na origem de diferentes classes dessas células: tipo A proliferativa (pareada ou alinhada), tipo A diferenciada (A1, A2, A3, A4), tipo intermediário e tipo B. Parte das espermatogônias tipo B, que estão ligadas entre si por pontes citoplasmáticas, iniciam o processo de diferenciação formando os espermatócitos primários (RAFF; LEVITZKY, 2012; RUSSELL et al., 1993). Na fase meiótica os espermatócitos primários (diploides) realizam meiose I e originam os espermatócitos secundários (haploides), que por sua vez sofrem meiose II formando as espermatídeos iniciais (haploides)

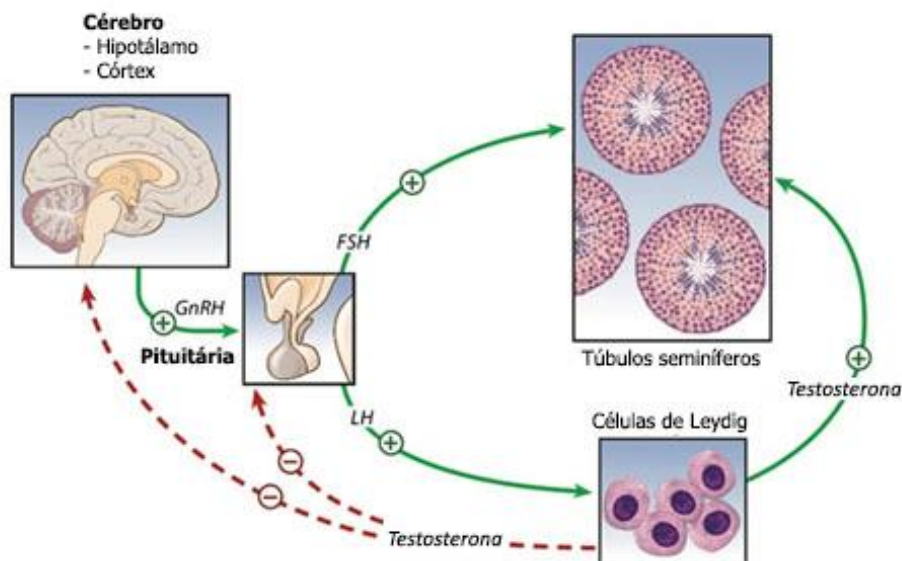
(JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Durante a fase espermiogênica, as espermátides iniciais passam por um processo de citodiferenciação no qual ocorre condensação do material genético, formação do acrossoma, reposicionamento das mitocôndrias, perda de citoplasma e formação do flagelo, resultando na formação dos espermatozoides (CLERMONT, 1972; RAFF; LEVITZKY, 2012; RUSSELL et al., 1993). A duração total da espermatogênese em mamíferos é de aproximadamente 30 a 75 dias, sendo baseada em 4,5 ciclos espermáticos (SHARPE, 1993)



**Figura 4.** Ciclo da espermatogênese em camundongos. Mostra os diferentes tipos de células germinativas durante cada fase do ciclo. A fase I-VI consiste na fase de maturação da espermátide tardia (números 13-15), a fase de VII-VIII consiste na fase de espermição, em que as espermátides tardias (número 16) se tornam espermatozoides no lúmen do túbulo seminífero e as espermátides imaturas (números 7 e 8) estão de diferenciando em novas espermátides tardias; a fase IX-XI é caracterizada pela continuidade da diferenciação das espermátides imaturas (números 9-11) e pela ausência de espermatozoide no lúmen; a fase XII é caracterizada pela divisão meiótica nas espermatogônias e nos espermatócitos para completar o epitélio germinativo (TERADA et al., 2010). *Legenda:* A = espermatogônia do tipo A; In = estágio intermediário das espermatogônias; B = espermatogônia do tipo B; PI = prófase I; L = leptóteno; Z = zigóteno; P = paquíteno; Di = diplóteno; M-I = meiose I; M-II = meiose II; 1-16 = diferenciação das espermátides iniciais em tardias.

O tecido intersticial testicular é o compartimento que engloba a função endócrina do órgão, sendo composto pelas células de Leydig que fazem a biossíntese de testosterona, macrófagos residentes associados, endotélio e o espaço linfático testicular (WALKER, 2011). As citocinas e os mediadores inflamatórios secretados pelos macrófagos residentes são extremamente importantes para a homeostase fisiológica do interstício testicular, principalmente para o desenvolvimento e diferenciação das células de Leydig (HALES, 2002). Os produtos secretados pelos macrófagos testiculares estimulam a produção de testosterona pelas células de Leydig, com isso, esses macrófagos tem ação indireta sobre a espermatogênese (MOSSADEGH-KELLER; SIEWEKE, 2018).

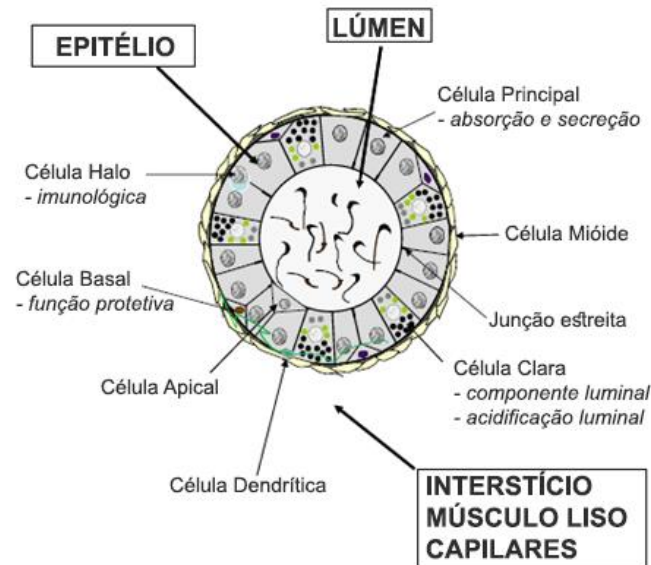
A regulação da cascata de diferenciação espermatogênica ocorre através da síntese e secreção de hormônios produzidos pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular (Figura 5). A liberação pela adenohipófise dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) é induzida pela liberação de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo. O FSH atua sobre as células de Leydig estimulando a formação de receptores de LH, além disso, atua sobre as espermatogônias produzindo uma onda de diferenciação ao longo do túbulo seminífero de estágios sucessivos da espermatogênese (GARCIA; FERNÁNDEZ, 2009). O FSH exerce suas funções biológicas sobre a espermatogênese através do acoplado à proteína-G da membrana plasmática das células de Sertoli. O LH, por sua vez, atua sobre as células de Leydig para sintetizar testosterona que exerce seus efeitos biológicos através de receptores androgênicos (AR) presentes também nas células de Sertoli (RUWANPURA; MCLACHLAN; MEACHEM, 2010). A testosterona tem efeitos parácrinos, sustentando a espermatogênese através das células de Sertoli e reforçando a ação espermatogênica do FSH, além disso, possui efeitos endócrinos em outros órgãos como próstata e músculo esquelético (COSTANZO, 2005).



**Figura 5.** Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-testículo e a ação hormonal em *feedback*. O FSH atua sobre as células de Sertoli, presente nos túbulos seminíferos, e o LH atua sobre as células de Leydig estimulando a liberação de testosterona que atua também sobre as células de Sertoli (adaptado de SHARMA; AGARWAL, 2013)

Após a formação dos espermatozoides maduros, estes sofrem o processo espermição no lúmen testicular onde são transportados através de ductos eferentes ao epidídimo, onde ocorre o processo de maturação espermática funcional (COSTANZO, 2005). O comprimento do ducto epididimário varia de acordo com a espécie, sendo aproximadamente de 6 metros no humano adulto, 3 metros no rato adulto e 1 metro no camundongo adulto. Diversos estudos na literatura tem provado que ocorre uma grande semelhança entre as regiões e tipos celulares entre mamíferos, incluindo o rato, camundongo e humano (ROBAIRE; HINTON, 2015).

Nos roedores, o epidídimo é dividido em segmento inicial, cabeça, corpo e cauda (ROBAIRE; HINTON, 2015), como mostrado na figura 2. Essas porções são histologicamente divididas de acordo com a altura do epitélio, e com a distribuição e quantidade entre os tipos celulares (REID; CLELAND, 1957), dentre eles existem as células basais, principais, estreitas, halo, claras e apicais (Figura 6) (HERMO; ROBAIRE, 2002).



**Figura 6.** Organização esquemática da maioria dos tipos celulares do epidídimo observadas em microscópio de luz. Os três compartimentos epididimários possuem distribuição relativa de cada tipo celular ilustrada. As funções principais de cada tipo celular está especificado logo abaixo do nome da célula (adaptado de ROBAIRE; HINTON, 2015).

Os espermatozoides, ao deixarem o lúmen testicular, possuem sua morfologia completa, porém ainda não apresentam motilidade e são incapazes de fecundar o ovócito II (DACHEUX; DACHEUX, 2014). A função principal de todos os compartimentos do epidídimo é o transporte dos espermatozoides, porém, além disso, a região da cabeça possui função sobre a maturação espermática, regulando o desenvolvimento da motilidade, a aquisição da capacidade de sofrer reação acrossômica e de reconhecer sítios importantes de modificações na membrana plasmática dos espermatozoides. Somando a isso, o epidídimo protege os espermatozoides de espécies reativas de oxigênio (EROs) através da barreira hemato-epididimária (BHE) e faz a estocagem dos gametas maduros na região da cauda (COSENTINO; COCKETT, 1986; HERMO; ROBAIRE, 2002; GREGORY; CYR, 2014; ROBAIRE; HINTON, 2015)

A maturação dos espermatozoides no epidídimo ocorre através da forte interação entre a lâmina própria do ducto epididimário, as células epiteliais, o fluido luminal e os espermatozoides (BEDFORD, 1975; ORGEBIN-CHRIST; DANZO; DAVIES, 1975; KEMPINAS; KLINEFELTER, 2010). O processo de

maturação consiste em determinar a qualidade espermática (ROBERTS, 2010), sendo dependente dos hormônios andrógenos (EZER; ROBAIRE, 2002), ocorrendo através do remodelamento na membrana do gameta, em que a degradação de componentes testiculares e integração com componentes secretados pelo epitélio epididimário e do próprio espermatozoide são cruciais para garantir essa qualidade (GATTI et al., 2004); dessa forma o gameta pode adquirir capacidade funcional (BARRIOS et al., 2005). O microambiente intraluminal possui um rigoroso controle de atividade secretora e absorviva das células epiteliais (ROBAIRE; HINTON, 2015).

Os gametas permanecem no interior do epidídimo, principalmente estocados na cauda, em estado quiescente até a ejaculação. Um dos motivos se deve ao fato do pH ser ácido no ambiente luminal que impede a degradação das estruturas do espermatozoide (BRETON et al., 1999; PIETREMENT et al., 2006; ROBAIRE; HINTON, 2015). O fluido luminal do epidídimo contém uma ampla composição proteica incluindo enzimas, fatores de crescimento, proteínas de ligação de ferro, proteínas de proteção ao espermatozoide e outras proteínas, como as lipocalinas e lactoferrina. A composição iônica do fluido epididimário auxilia no desenvolvimento da motilidade e na manutenção do estado quiescente dos espermatozoides, sendo composta por concentrações menores de sódio, cloreto, cálcio e magnésio na região da cabeça, e maiores de fósforo e potássio quando comparada à composição da cauda (ROBAIRE; HINTON, 2015).

Assim como no testículo, no epidídimo a BHE protege os gametas do sistema imunológico, agentes xenobióticos, EROs, e restringe a passagem de íons, solutos e macromoléculas, dessa forma garante um microambiente apropriado para a maturação dos gametas. Os mecanismos de defesa incluem restrição de compostos, síntese e secreção de proteínas específicas como as defensinas e antioxidantes, além de células imunes residentes, como macrófagos, mastócitos e linfócitos (ROBAIRE; HINTON, 2015).

O ducto deferente conecta a porção final da cauda epididimária à uretra prostática, sendo um tubo muscular revestido internamente por epitélio pseudoestratificado com células principais, basais, claras e estreitas. Essas células secretam glicoproteínas e possuem funções de proteção dos espermatozoides, reabsorvendo fluidos e acidificando o ambiente luminal, sendo

este o término do processo de maturação espermática (KOMÁREK et al., 2000). O ducto ejaculatório é o segmento do ducto que entra na próstata, possuindo mucosa semelhante ao ducto deferente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

As glândulas sexuais acessórias, como a glândula seminal, próstata, glândula coaguladora, bulbouretral e prepucial (HASCHEK; ROUSSEAU, 1998), tem por função produzir secreções de nutrição e suporte pós-ejaculação aos espermatozoides. São dependentes da ação de andrógenos, portanto refletem qualquer mudança do estado endócrino ou da função testicular (MANN, 1972; CLEGG; PERREAULT; KLINEFELTER, 2001). A secreção da glândula seminal compõe a maior parte do ejaculado, sendo rica em frutose e prostaglandinas, e participa do processo de coagulação do ejaculado e imunoproteção dos espermatozoides (ROBERTS, 2010). A próstata possui uma secreção líquida alcalina de natureza proteica, sendo rica em zinco, ácido nítrico e colina, além de conter fosfatase ácida, antígeno prostático específico (APE), amilase e fibrinolisa (KIERSZENBAUM, 2008; ROBERTS, 2010). O fluido da glândula bulbouretral neutraliza os vestígios de urina e lubrifica a uretra, sendo também uma fonte energética para os gametas masculinos (CHUGHTAI et al., 2005). Por fim, as glândulas prepuciais são glândulas sebáceas modificadas ricas em óleo que lubrificam a glândula e apresentam ação antibacteriana e antiviral (HASCHEK; ROUSSEAU, 1998).

## 1.2 OBESIDADE

A obesidade, de maneira simplificada, é uma condição de acúmulo anormal ou excessivo de gordura no organismo, onde o excesso de gordura, sua distribuição e associação trazem consequências negativas para a saúde (WHO, 2000a). Um levantamento feito pela Organização Mundial de Saúde (OMS) mostra que a prevalência da obesidade no mundo dobrou, sendo 11% em homens e 15% em mulheres. O fato da pessoa ter obesidade aumenta a probabilidade de possuir outras doenças associadas como diabetes, hipertensão, infarto, câncer, apneia e osteoartrite, bem como afeta negativamente a performance reprodutiva do indivíduo (WHO, 2014).

No Brasil, segundo a Pesquisa Nacional de Saúde realizada pelo IBGE em 2013, cerca de 37,3% dos brasileiros acima de 18 anos consomem hortaliças diariamente, sendo maior entre as mulheres, porém cerca de 23,4% dos brasileiros acima de 18 anos consomem refrigerantes e sucos artificiais em pelo menos 5 dias da semana, sendo mais frequente entre os homens (SAÚDE; CRUZ, 2014). No levantamento de 2012 do ministério da saúde feito pela Vigitel (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico) mostrou que 51% da população brasileira acima de 18 anos está acima do peso, sendo predominante em homens (BRASIL, 2014).

Na história da humanidade, o fato de ganhar peso e estocar gordura eram vistos como sinal de saúde e prosperidade, pois antigamente era necessário caçar e buscar alimentos para sobreviver. No entanto, atualmente, a oferta de alimentos ricos em gorduras e o aumento do ganho de peso estão representando um problema crescente de saúde pública (WHO, 2000a). O excesso de alimentos ricos em calorias combinado com atividades corpóreas pouco dispendiosas como assistir televisão, jogos de computador e internet, contribuem para a obesidade infanto-juvenil (WHO, 2014).

A etiologia da obesidade tem como principal causa o desbalanço entre a energia ingerida na alimentação frente a quantidade de energia gasta (NAMMI et al., 2004). O excesso de energia permanece estocado nos adipócitos, que aumentam de tamanho, causando a lesão patológica da obesidade que são a hiperplasia e a hipertrofia celular (BRAY, 2014). O controle entre a ingestão e o gasto de energia mantém o peso corpóreo dentro dos valores proporcionais normais, porém, um leve aumento na ingestão diária de comida ou uma redução no gasto de energia a longo prazo leva a um aumento do peso corporal (VIANNA; COPPARI, 2011).

O tipo de distribuição da gordura afeta os riscos associados à obesidade e o tipo de doença à qual o indivíduo estará sujeito. O acúmulo de gordura abdominal, dita obesidade androide, é um fator de risco maior para o desenvolvimento de doenças do que o excesso de gordura, dita obesidade ginoide, em que a gordura está distribuída de maneira mais uniforme (WHO, 2000a). Dito isso, podemos observar que a obesidade não provém de uma única causa ou de um único desarranjo, mas de um grupo heterogêneo de condições

com múltiplas causas que culminam no fenótipo de obesidade. A obesidade envolve complexas e diversas relações etiológicas entre os quadros genéticos, metabólicos e neurais, bem como o comportamento, hábitos alimentares, atividade física e fatores socioculturais (NAMMI et al., 2004).

A síndrome metabólica é um conjunto complexo de fatores de risco cardiovascular relacionados ao acúmulo de gordura abdominal e resistência à insulina (SABOYA et al., 2016), conferindo aumento no risco de desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 e de doença cardiovascular (KAUR, 2014). O diagnóstico de síndrome metabólica é um desafio clínico e de saúde pública crescente no mundo todo (KAUR, 2014), pesquisadores realizam medidas de obesidade, hipertensão, hiperglicemia, dislipidemia e resistência à insulina para ter um panorama completo da saúde do indivíduo (FORD, 2004). Pessoas que apresentam tal síndrome possuem risco aumentado de mortalidade por doença cardiovascular, doença cardíaca coronária, acidente vascular cerebral e disfunção vascular (SRIKANTHAN et al., 2016).

O tecido adiposo é preenchido de lipídios nos adipócitos, sendo composto também por: células endoteliais que garantem a vascularização, pericitos que são potenciais adipócitos, fibroblastos que fazem o suporte estrutural, mastócitos que influenciam na angiogênese e no remodelamento tecidual, e células imunes como células T e macrófagos residentes, entre outros componentes (LEE; WU; FRIED, 2010; LEMOINE; LEDOUX; LARGER, 2013). Cada uma dessas células contribuem para criar um microambiente específico para a síntese e remodelamento da matriz extracelular, dessa forma garante uma anatomia única para depósito de gordura (LEE; WU; FRIED, 2010; DODSON et al., 2011).

A principal função do tecido adiposo é de armazenar triacilglicerol, porém existem outras funções como a secreção de hormônios, de fatores angiogênicos, fatores de crescimento, citocinas, entre outras moléculas (DODSON et al., 2011; LEMOINE; LEDOUX; LARGER, 2013). O remodelamento tecidual entre o tecido adiposo e o tecido não alterado desregula a secreção hormonal e de moléculas sinalizadoras como a insulina, podendo causar danos à viabilidade celular. Assim, a lipólise que ocorre na obesidade e o consequente fluxo de ácidos graxos livres do tecido adiposo expõe outros tecidos a uma

sobrecarga de ácidos graxos no meio extracelular. A patologia celular e a resistência à insulina presentes nos outros tecidos na condição de obesidade se deve ao fato desses outros tecidos poderem também acumular triglicerídeos no seu interior (ATTIE; SCHERER, 2009).

### 1.3 OBESIDADE E SISTEMA GENITAL MASCULINO

A obesidade é uma epidemia crescente em muitos países e a capacidade reprodutiva fica potencialmente reduzida (RAMLAU-HANSEN et al., 2007). A obesidade androide é o fenótipo que está associado a vários distúrbios reprodutivos, incluindo a infertilidade (PASQUALI et al., 2003). A literatura coloca que existe uma ligação entre o estado energético e a função reprodutiva (SPICER, 2001), sendo controlado por uma gama de sinais que atuam em diferentes níveis do eixo neuroendócrino (NOGUEIRAS et al., 2004). A obesidade é associada a diversas alterações no sistema endócrino, como concentrações anormais de hormônios no sangue devido a alterações no padrão de secreção ou metabolismo, e o transporte hormonal com sua ação no tecido-alvo (PASQUALI, 2006).

No aspecto reprodutivo, homens obesos possuem maior risco de disfunção erétil; além de um perfil hormonal alterado com diminuição da globulina transportadora de hormônio sexual (SHBG) e de testosterona, aumento dos níveis de estradiol e, em homens com obesidade mórbida, ocorre alterações na secreção de gonadotrofina. Recentemente, alguns estudos descrevem que o excesso de peso e a obesidade estão relacionados com os baixos níveis de inibina B, marcador da função das células de Sertoli e espermatogênese (CHAVARRO et al., 2010). Além disso, outros estudos mostram um aumento na anormalidade de parâmetros seminais em homens com sobrepeso e obesidade, bem como um aumento do risco de infertilidade entre casais em que o homem está acima do peso ou obeso (HOFNY et al., 2010).

Em roedores, a exposição a dietas ricas em gorduras por períodos prolongados causa um balanço energético positivo, sendo considerado um modelo experimental de obesidade humana. Esta dieta com alto teor de gordura e carboidratos é similar à de *fast food*, com alimentos como mortadela, chips,

refrigerante e outros mais, levando a um ganho de peso e deposição de gordura corporal, sendo este um modelo de obesidade animal não genético (TAKASHIBA et al., 2011).

Nos estudos de Viguera-Villaseñor et al. (2011) com ratos machos Sprague-Dawley de 21 dias pós-natal (DPN) induzidos à obesidade por dieta hipercalórica, mostraram uma redução na razão testosterona-estradiol, indicando aumento significativo nos níveis de estradiol e redução significativa nos níveis de testosterona. Esses resultados corroboram outros estudos na literatura, tanto em humanos (CHAVARRO et al., 2010) como em ratos (FERNANDEZ et al., 2011).

A conversão da testosterona em estradiol através da aromatização é a principal etapa na síntese de estrógenos, sendo esta reação catalisada pela enzima aromatase, com expressão aumentada em tecido adiposo periférico. Acredita-se que o aumento de estrógenos em homens obesos é devido a uma maior conversão de testosterona devido ao aumento da enzima catalisadora disponível no tecido adiposo. Esta conversão periférica pode gerar valores reduzidos de testosterona e aumentados de estradiol. Porém, este aumento de estradiol pode inibir a secreção de GnRH, LH e FSH (ERDEMIR et al., 2012), e prejudicar a espermatogênese. Animais com obesidade induzida por dieta mostraram uma redução na motilidade espermática e na taxa de fertilização (GHANAYEM et al., 2010; BAKOS et al., 2011), bem como um aumento no dano de DNA dos espermatozoides (BAKOS et al., 2011).

O estresse oxidativo está intimamente ligado a um aumento na taxa de danos celulares induzidos pelo oxigênio e seus derivados oxidados (EROs). Os alvos dessas espécies reativas são lipídios de membrana que levam ao processo de peroxidação lipídica. Isto posto, o tecido testicular bem como os espermatozoides ficam mais vulneráveis ao estresse oxidativo devido à riqueza de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas (ERDEMIR et al., 2012).

Bakos et al. (2011) confirmam, em camundongos machos de 6 semanas de idade induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica, os resultados mostraram uma diminuição na motilidade espermática, na capacidade de fecundação e no número de espermatozoide por ovócito; além disso, houve um

aumento de EROs intracelular e danos de DNA espermático. Estes resultados fornecem evidências de que a obesidade pode induzir o estresse oxidativo no sistema genital masculino.

#### 1.4 DESREGULAÇÃO DA TIREOIDE: HIPOTIREOIDISMO E HIPERTIREOIDISMO

Os hormônios tireoidianos (HTs) estão envolvidos em vários processos biológicos relacionados ao crescimento, desenvolvimento e metabolismo (RIBEIRO et al., 1995; IWASAKI et al., 2004). Os efeitos fisiológicos dos HTs envolvem a modulação do consumo de oxigênio, o metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas, também causam alterações entre a razão de síntese e degradação de grande parte dos fatores de crescimento e hormônios (NORMAN; LITWACK, 1997; BOELAERT; FRANKLYN, 2005). Pacientes com hipertireoidismo apresentam perda de peso, baixos níveis de colesterol, temperatura corporal elevada e taquicardia, enquanto que pacientes com hipotireoidismo apresentam perda de cabelo, hipertensão, hipercolesterolemia, mixedema e bradicardia (RIBEIRO et al., 1995).

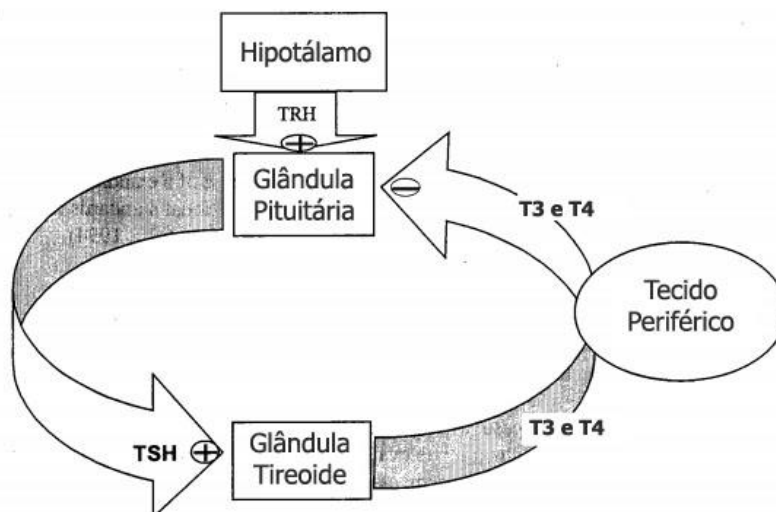
Segundo a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) em uma publicação de 2010, cerca de 10% das mulheres acima de 40 anos e em torno de 20% das mulheres acima de 60 anos manifestam algum tipo de problema na tireoide. Algumas estatísticas demonstram que 1 em cada 5 mulheres que fazem reposição estrogênica apresentam, na verdade, problemas tireoidianos (SBEM, 2010). De acordo com o Ministério da Saúde, o hipotireoidismo é o agravo mais comum da tireoide, atingindo cerca de 2% da população no geral, com prevalência de 15% em pessoas com mais de 60 anos, sendo 8 vezes mais frequente em mulheres que em homens (BRENTA et al., 2013). Dados prospectivos sobre a epidemiologia das doenças tireoidianas, a incidência média em mulheres foi de 0,8 casos por mil/ano, sendo insignificante em homens; estudos de prevalência, com taxas semelhantes no Brasil, indicam que a presença de hipertireoidismo está em torno de 2 a 3% entre mulheres e 0,2% em homens (SILVA et al., 2011b).

As doenças que afetam a glândula da tireoide são desordens endócrinas mais prevalentes no mundo. O hipertireoidismo, sendo uma

hiperfunção da tireoide, acomete por volta de 2% da população mundial, enquanto que o hipotireoidismo, considerado uma menor função da tireoide, acomete cerca de 1%. O hipertireoidismo e o hipotireoidismo podem ocorrer devido a doenças da tireoide, ou por mal funcionamento da glândula pituitária ou do hipotálamo. Em regiões com deficiência dietética de iodo, a prevalência de desregulação de tireoide pode subir até 15% (WHO, 2000b).

A glândula tireoide sintetiza e libera triiodotironina (T3) e tiroxina (T4). O T4 é o principal produto da secreção da tireoide, enquanto que nos tecidos periféricos ocorre produção de T3 por desiodação local, sendo este o hormônio biologicamente ativo (BOELAERT; FRANKLYN, 2005; SMITH; WALKER, 2015).

A secreção e síntese dos HTs são reguladas pelo hormônio estimulante da tireoide (TSH), que ao se ligar aos receptores de hormônios tireoidianos (TRs) presentes na membrana da tireoide, estimulam a liberação hormonal a partir da tireoglobulina. Além disso, o TSH regula a produção de T3 nos tecidos periféricos (NORMAN; LITWACK, 1997). A síntese e liberação de TSH pela glândula pituitária ocorre em resposta ao hormônio liberador de tireotrofina (TRH) secretado pelo hipotálamo (YEN, 2001; BOELAERT; FRANKLYN, 2005). Os níveis circulantes de TRH e TSH são regulados por *feedback* negativo, em que as concentrações plasmáticas de T3 e T4 agem tanto no hipotálamo como na pituitária, inibindo a liberação hormonal no eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (Figura 7). Com esse mecanismo, os níveis circulantes dos HTs ficam dentro de uma faixa normal de concentração (NORMAN; LITWACK, 1997; WHO, 2000b; BOELAERT; FRANKLYN, 2005).



**Figura 7.** Mecanismo esquemático de regulação dos hormônios tireoidianos no eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. A glândula pituitária produz TSH que estimula a glândula tireoide a produzir T4. No tecido o T4 sofre desidiação e se transforma em T3. O *feedback* ocorre pela ação do T3 e T4 na glândula pituitária. A hiperfunção da tireoide suprime a produção de TSH, enquanto que a hipofunção estimula a produção de mais TSH (adaptado de WHO, 2000b).

As ações dos HTs são iniciados pela interação com seus TRs, estes pertencentes a uma superfamília de receptores de hormônios esteroides (BOELAERT; FRANKLYN, 2005). Existem dois genes que são transcritos para a formação de duas isoformas  $TR\alpha$  e  $TR\beta$  com diferentes padrões de expressão no desenvolvimento e nos tecidos adultos, codificados como *THRA* e *THRB* respectivamente. O  $TR\alpha$  tem dois produtos de ligação com o T3, sendo o  $TR\alpha1$  predominantemente expresso no cérebro, coração e músculo esquelético, enquanto que o  $TR\alpha2$  e  $TR\alpha3$  não possuem união com o T3. O  $TR\beta$  possui três produtos principais de ligação ao T3, sendo que o  $TR\beta1$  é expresso amplamente pelos tecidos,  $TR\beta2$  principalmente no cérebro, retina e ouvido interno, e o  $TR\beta3$  no rim, fígado e pulmão (BRENT, 2012; ORTIGA-CARVALHO; SIDHAYE; WONDISFORD, 2014).

As ações dos hormônios tireoidianos estão diretamente relacionadas com a disponibilidade dos TRs, dos transportadores relacionados, dos correceptores e coativadores nucleares, bem como pela sequência e localização dos elementos de resposta. Todas as isoformas diferem em comprimento amino

e carboxilo terminais, sendo semelhantes nos domínios de DNA e ligante. Essas diferenças específicas garantem a interação específica aos TR $\alpha$  e TR $\beta$  que irão gerar suas ações específicas (BRENT, 2012).

As doenças relacionadas à tireoide são bastante graves, mas geralmente são curáveis e tratáveis. As condições clínicas são manifestadas de forma sutil e pode ser confundida com outras doenças, entre elas a insuficiência renal, doença hepática, infecções e doenças metabólicas, visto que essas doenças podem causar respostas adaptativas da tireoide (WHO, 2000b). Em níveis normais nos seres humanos, a concentração total de T3 está entre 80 e 190 ng/dL de soro, enquanto que a concentração total de T4 está entre 5 e 12  $\mu$ g/dL de soro (SHIVARAJ et al., 2009).

O diagnóstico da função tireoidiana fornece informações fisiológicas, patológicas e anatômicas somado com o histórico familiar e exame físico. Os principais exames sorológicos são tiroxina sérica total (T4), triiodotironina total (T3), tiroxina livre (T4 livre), triiodotironina livre (T3 livre), triiodotironina reversa (rT3), hormônio estimulante da tiroide (TSH), calcitonina de soro e tiroglobulina proteica (Tg); podem ser utilizados testes com anticorpos como antitireoglobulina (ATA) e antimicrosomáticos (AMA). O exame histológico invasivo é feito por citologia aspirativa por agulha fina (FNAC) e não invasivo é feito por ultrassonografia, ressonância magnética e tomografia. Um estudo molecular adicional fornece marcadores moleculares para detecção de câncer de tireoide. A realização desses testes fornecem sensibilidade e especificidade que aumentam a probabilidade de detecção precoce (SHIVARAJ et al., 2009).

### 1.5 DESREGULAÇÃO DA TIREOIDE E SISTEMA GENITAL MASCULINO

Os HTs agem sobre a morfologia e função testicular, sendo discutidos desde quando observaram que os testículos de animais adultos se mostraram sensíveis a estes hormônios (OPPENHEIMER; SCHWARTZ; SURKS, 1974). Além dessas alterações também foram observadas diminuição da fertilidade e na atividade sexual de homens (KRASSAS; PERROS, 2003).

Nos órgãos genitais masculinos existem duas isoformas de receptores de T3: TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1, na qual ambos estão expressos nas células de

Sertoli. O receptor TR $\beta$ 1 é mais encontrado nas células de Leydig, células peritubulares e células germinativas durante o desenvolvimento pós-natal e adulto (KUMAR; SHEKHAR; DHOLE, 2014; SMITH; WALKER, 2015). Estudo com camundongos transgênicos revela que o hormônio T3 age predominantemente através do receptor TR $\alpha$ 1 para regular a proliferação e a maturação das células de Sertoli (HOLSBERGER; KIESEWETTER; COOKE, 2005). A presença de TRs nas células germinativas tem função de sustentar essas diferentes populações de células no epitélio germinativo. As células epiteliais dos diferentes segmentos do epidídimo de rato expressam TRs no citoplasma, tanto a isoforma TR $\alpha$ 1 quanto a isoforma TR $\beta$ 1 (KUMAR; SHEKHAR; DHOLE, 2014).

Diversas funções da célula de Sertoli são influenciadas pelos HTs, como o transporte de glicose, a produção de gama-glutamil transpeptidase, ABP e fator de crescimento semelhante à insulina-I, além do estímulo na captação de aminoácidos, hiperpolarização celular (MENEGAZ et al., 2006; SILVA et al., 2001; VOLPATO et al., 2004), inibição da atividade da aromatase e efeitos no metabolismo da testosterona (SILVA; LEITE; WASSERMANN, 2002). Os HTs também regulam algumas funções no desenvolvimento e esteroidogênese nas células de Leydig, como na síntese de hormônios esteroides pelo colesterol (KUMAR; SHEKHAR; DHOLE, 2014).

O funcionamento incorreto da tireoide afeta hormônios envolvidos na reprodução, como o LH através de modificações no padrão de neurotransmissores hipotalâmicos (MAIA et al., 1995), e ainda permanece controverso os efeitos sobre os hormônios de crescimento, FSH e testosterona (SMITH; WALKER, 2015). Diversos estudos comprovam que o hipotireoidismo neonatal transitório induzido pelo composto propiltiouracil (PTU) altera mecanismos fisiológicos diversos de ratos (CHIAO et al., 2000), camundongos (JOYCE; PORCELLI; COOKE, 1993) e aves domésticas (KIRBY et al., 1996). Enquanto que o hipertireoidismo neonatal transitório em ratos resulta no encerramento precoce da proliferação das células de Sertoli, levando a uma menor população dessas células no animal adulto (HOLSBERGER; COOKE, 2005).

O PTU é uma droga anti-tireoidiana que age inibindo a síntese de hormônios tireoidianos na glândula tireoide e na conversão de T4 na sua forma ativa (T3) nos tecidos periféricos (CHIAO et al., 2000; YANG; GORDON, 1997). Além disso, o 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) reduz a circulação de T3 e T4 e aumenta os níveis de TSH, bem como inibe a ação de conversão de T4 em T3 da enzima tireoperoxidase e da deiodinase tipo 1. Essa droga também altera a expressão hormônio-responsiva de genes, e essa alteração pode causar danos na estrutura de regiões do cérebro (ZOELLER; CROFTON, 2005).

A produção metabólica de substâncias essenciais ao funcionamento celular utiliza oxigênio para obtenção de energia e gera radicais livres. Os HTs são importantes no balanço entre EROs e moléculas antioxidantes em diversos tecidos (KUMAR; SHEKHAR; DHOLE, 2014). No hipertireoidismo, em que ocorre um aumento da atividade hipermetabólica dos HTs, acontece aumento na produção desses radicais. Por consequência, ocorrem danos oxidativos nos tecidos-alvo (VENDITTI; DI MEO, 2006) podendo causar mudanças significativas nas defesas antioxidantes de diversos tecidos, incluindo fígado (HUH et al., 1998), coração (SHINOHARA et al., 2000), cérebro (DAS; CHAINY, 2004) e testículo (CHOUDHURY; CHAINY; MISHRO, 2003). Em camundongos e ratos, o processo de diferenciação das células de Sertoli envolve a indução de um ciclo dependente de quinase pelo hormônio T3, dessa forma, os animais neonatais em estado de hipotireoidismo sofrem prejuízos no crescimento testicular, na maturação das células germinativas, na formação dos túbulos seminíferos e outros processos de diferenciação (SILVA et al., 2011a).

#### 1.6 OBESIDADE, HIPOTIREOIDISMO E HIPERTIREOIDISMO NO SISTEMA GENITAL MASCULINO

Os HTs regulam o metabolismo basal, a termogênese e desenvolvem um papel essencial no metabolismo de lipídeos e glicose, na ingestão de alimentos e na oxidação de gordura (ROSENBAUM et al., 2000). A desregulação da tireoide está associada a alterações no peso, na composição e na temperatura corporal, bem como no gasto total de energia em repouso (REE) e independente da atividade física (BIONDI, 2010; SANYAL; RAYCHAUDHURI, 2016).

A disfunção da tireoide pode ser o principal evento que induz alterações no gasto de energia com sucessivo aumento do índice de massa corpórea (IMC) e peso (BIONDI, 2010). O acúmulo de gordura tem sido associado a baixos níveis de T4 livre e altos níveis de TSH em indivíduos eutireoideos pouco acima do peso, resultando em uma correlação entre os níveis séricos de TSH e o aumento progressivo de peso em determinado período de tempo (REINEHR; DE SOUSA; ANDLER, 2006). Além disso, foi relatado uma relação entre a quantidade de T3 e T4 livre com a circunferência da cintura e o IMC em indivíduos obesos (CHOMARD et al., 1985). Contudo, as causas dessas alterações encontradas nas funções da tireoide ainda permanecem desconhecidas. Autores sugerem que uma maior atividade das deiodinase leva a uma alta taxa de conversão de T4 em T3. Sendo este um mecanismo de defesa encontrado em indivíduos obesos contra a acumulação de gordura ao aumentar o gasto de energia (LONGHI; RADETTI, 2013). Outro mecanismo provável é o aumento compensatório na secreção de TSH e T3 livre na tentativa de superar a redução na capacidade de resposta dos tecidos aos hormônios tireoidianos circulantes em indivíduos obesos; isso ocorre devido à baixa expressão de TSH e hormônios da tireoide em adipócitos (NANNIPIERI et al., 2009). Além disso, os elevados níveis de leptina encontrados em indivíduos obesos pode ser outra possível explicação uma vez que a principal ação da leptina é detectar o excesso de gordura e diminuir o apetite e a ingestão de alimentos. Uma explicação adicional está nas citocinas inflamatórias secretadas pelo tecido adiposo, como o fator de necrose tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), a interleucina (IL)-1 e a IL-6, que inibem a expressão de mRNA do simporte de sódio e iodo e com isso a atividade de captação de iodeto (SANYAL; RAYCHAUDHURI, 2016).

Células de gordura produzem leptina e são considerados um órgão endócrino ativo (FELDT-RASMUSSEN, 2007; REINEHR, 2010). Existe uma correlação entre a quantidade de TSH e o nível do IMC podendo ser mediada pela leptina produzida pelo tecido adiposo. A leptina rege fisiologicamente a homeostase energética informando ao sistema nervoso central sobre as reservas de tecido adiposo (REINEHR, 2010). Este hormônio modula e regula as respostas neuroendócrinas e comportamentais, como o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e a ingestão alimentar (FELDT-RASMUSSEN, 2007;

MENENDEZ et al., 2003), por regulação da expressão gênica do TRH no núcleo paraventricular e o TSH, por sua vez, estimulará a secreção de leptina pelo tecido adiposo humano (MENENDEZ et al., 2003; OGE et al., 2005; SANTINI et al., 2010). A leptina também afeta atividades de deiodinase da tireoide com ativação da conversão de T4 para T3 (REINEHR, 2010; ZIMMERMANN-BELSING et al., 2003).

Em estudo clínico com 1944 pacientes adultos acompanhados por 11 anos descobriram uma associação positiva estatisticamente significativa entre a concentração sérica de TSH e a mudança de peso (BJERGVED et al., 2014). Outro estudo com 4649 participantes evidenciou, além de uma relação positiva entre a concentração de TSH e o IMC dos indivíduos, uma relação com a quantidade de T4 livre, sendo influenciável em casos com hiper ou hipotireoidismo (KNUDSEN et al., 2005).

#### 1.7 INFLAMAÇÃO E DISTÚRBIOS METABÓLICOS NA OBESIDADE E ALTERAÇÕES TIREOIDIANAS

O testículo consegue tolerar os auto-antígenos expressos pelas células germinativas devido à indução de um microambiente imunossupressor induzido pela presença de citocinas, dessa forma esse órgão é considerado imuno-privilegiado (HEDGER; MEINHARDT, 2003; GUAZZONE et al., 2009). O mecanismo envolvido na autoimunidade é a existência da BHT, uma estrutura que limita o acesso de antígenos e anticorpos nas células germinativas, além da presença de células T regulatórias (Treg) no interstício testicular, e a secreção de imunossupressores secretados por macrófagos, células de Sertoli e Leydig (TUNG; FUSI; TEUSCHER, 2002).

Todas as funções epididimária são dependentes da composição luminal do epidídimo, que são criadas por produtos de secreção das células de Sertoli no testículo, pela secreção e absorção de íons e proteínas pelas células principais do epidídimo, e pela BHE que limita o transporte de moléculas. Essa BHE oferece proteção imunológica ao espermatozoide, uma vez que estes gametas são imunogênicos devido à quantidade de cromossomos ser diferente

das demais células do corpo, por meio das junções célula-célula constituídas por proteínas transmembrana em condições normais (GREGORY; CYR, 2014).

As características histopatológicas da inflamação no tecido testicular e epididimário são caracterizados principalmente pela presença de infiltrado inflamatório no interstício de ambos os órgãos. O infiltrado é caracterizado pela presença de células inflamatórias como linfócitos, macrófagos e mastócitos. Quando essas células estão no lúmen de qualquer um dos órgãos citados, podem caracterizar o comprometimento da barreira imunológica presente no testículo e no epidídimo (GUAZZONE et al., 2009; GREGORY; CYR, 2014).

A obesidade está intimamente relacionada com uma inflamação sistêmica crônica, caracterizada pela produção anormal de citocinas, aumento de mediadores da fase aguda da inflamação e ativação de vias pró-inflamatórias (HOTAMISLIGIL, 2006). As principais citocinas encontradas no tecido adiposo são o fator de necrose tumoral TNF- $\alpha$  (FEINSTEIN et al., 1993; CASTOLDI et al., 2016) e a IL-6 (ROTTER; NAGAEV; SMITH, 2003). Essas citocinas atuam como moduladores imunes e regulam o processo de recrutamento leucocitário, sendo sintetizadas por diversas células do tecido testicular, como células peritubulares, Sertoli e Leydig (GUAZZONE et al., 2009), e outras células que estão sendo recrutadas e podem perturbar o processo inflamatório. A expansão de adipócitos e a morte de adipócitos produz sinais quimiotáticos levando ao recrutamento primeiramente de macrófagos e depois de outras células, como os neutrófilos (HOTAMISLIGIL, 2006; CASTOLDI et al., 2016).

Os HTs afetam o recrutamento de várias células imunes, como os macrófagos, e a liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  (DE VITO et al., 2011). A quantidade de HTs circulante afeta diretamente a geração de EROs que estimulam o recrutamento dos neutrófilos e monócitos, que nos tecidos são diferenciados em macrófago (SPEK; FLIERS; BOELEN, 2017). O hipertireoidismo resulta no aumento de EROs e, conseqüentemente, maior recrutamento neutrofílico, enquanto no hipotireoidismo ocorre o contrário, limitando a geração de EROs e de neutrófilos (FERNÁNDEZ; VIDELA, 1995; VIDELA et al., 1993).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Tendo em vista as mudanças fisiológicas de peso corpóreo ocorridas com o desenvolvimento do hipotireoidismo e do hipertireoidismo, a obesidade em conjunto com desregulações nos hormônios tireoidianos pode deturpar a homeostase fisiológica. Contudo, a literatura permanece escassa e pouco esclarecida sobre a alteração morfofisiológica no sistema genital masculino em decorrência da obesidade e desregulação tireoidiana, além dos mecanismos pelos quais a fertilidade é prejudicada não estarem completamente elucidados.

Dito isso, o presente estudo possui grande aplicabilidade biológica ao avaliar se a obesidade juntamente com a desregulação tireoidiana, na forma de hipertireoidismo ou hipotireoidismo, trará danos celulares, teciduais ou fisiológicos sobre o sistema genital masculino, especificamente nos testículos e epidídimos de camundongos C57BL/6 adultos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar se a obesidade juntamente com o hipotireoidismo ou hipertireoidismo traz prejuízos ao desenvolvimento testicular e epididimário de camundongos C57BL/6 adultos.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Entender a relação entre a obesidade, hipotireoidismo e hipertireoidismo sobre a morfofisiologia testicular e epididimária;

- Avaliar aspectos histopatológicos, espermáticos e hormonais, assim como a resposta imunológica e oxidativa em animais obesos com ou sem distúrbios tireoidianos;

- Analisar se o recrutamento de células e mediadores inflamatórios pode ser o mecanismo pelos quais a obesidade e distúrbios hormonais tireoidianos participam da morfofisiologia testicular e epididimária de animais obesos, com hipotireoidismo ou hipertireoidismo;

Analisar se o estresse oxidativo (perfil oxidativo e antioxidante) pode ser o mecanismo pelos quais a obesidade e distúrbios hormonais tireoidianos participam da morfofisiologia testicular e epididimária de animais obesos, com hipotireoidismo ou hipertireoidismo;

- Verificar os efeitos e possíveis mecanismos de ação da obesidade e da desregulação tireoidiana sobre os testículos e epidídimos de camundongos C57BL/6 adultos.

#### 4 ARTIGO 1

Hipertireoidismo em camundongos alimentados com uma dieta padrão ou rica em gordura têm contagem de espermatozoides prejudicada

Hyperthyroid mice fed with a standard or high-fat diet have impaired sperm count

Artigo submetido à revista "Reproduction"

F.I. 2016: 2,65 / Qualis CAPES 2016 (Medicina II): A2

## **Hyperthyroid mice fed with a standard or high-fat diet have impaired sperm count**

*Thyroid hormone and obesity impair sperm*

Punhagui, A. P. F.<sup>1,2</sup>; Goulart-Silva, F.<sup>3</sup>; Staurengo-Ferrari, L.<sup>2</sup>; Pescim, R. R.<sup>5</sup>; Anselmo-Franci, J. Ap.<sup>4</sup>; Verri Jr, W. A.<sup>2</sup>; Fernandes, G. S. A.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> General Biology Department, Biological Sciences Center, State University of Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 – Km 380, Campus Universitário, 86057-970, Londrina, PR, Brazil

<sup>2</sup> General Pathology Department, Biological Sciences Center, State University of Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 – Km 380, Campus Universitário, 86057-970, Londrina, PR, Brazil

<sup>3</sup> Physiology and Biophysics Department, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes – 1374, Butantã, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

<sup>4</sup> Morphology Department, Physiology and Basic Pathology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, FORP, Av. do Café - S/N, 14040-904, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

<sup>5</sup> Statistics Department, Exact Sciences Center, State University of Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 – Km 380, Campus Universitário, 86057-970, Londrina, PR, Brazil

\*Correspondent author: State University of Londrina, Celso Garcia Cid Highway, Km 380, Londrina, PR, 86057-970, Brazil. Phone: +55 43 3371-4417.

Email: glaura@uel.br (G.S.A. Fernandes)

## **Abstract**

Thyroid disorders and obesity are very common in the population, and both are considered public health problems, since they may aggravate and induce several diseases, including risk of infertility. We evaluated the impact of thyroid hormone disorders on the testis and epididymis function of mice fed with a standard or high-fat diet. Adult male C57BL/6 mice were distributed in 6 experimental groups and fed a standard diet (SD) or high-fat diet (HFD) for 12 weeks. Afterwards, both groups were treated with saline (SD and HFD+saline), propylthiouracil (PTU-antithyroid drug: SD+PTU and HFD+PTU) or T3 (SD+T3 and HFD+T3) for 30 more days. At treatment end, the mice were anesthetized and euthanized by decapitation. Blood serum was used to determine testosterone, LH and FSH doses. Testis and epididymis were removed to determine inflammatory profile, oxidative stress, sperm count and histological analysis. Vas deferens was used to obtain spermatozoa for sperm morphology. LH dose was increased in the HFD+T3 group. Daily sperm production (DSP) and number of spermatids were higher in HFD+saline group and lower in HFD+T3 group. IL1 $\beta$  dose in testis increased in HFD+T3 group, whereas lipid peroxidation was lower in this group and higher in HFD+PTU group. Histological analysis showed increase in seminiferous epithelium height in HFD+PTU group. Epithelium compartment increased in HFD+saline group, whereas stromal compartment decreased in HFD+T3 group in epididymal caput, and increased in HFD+PTU group in epididymal cauda. In conclusion, hyperthyroid state had greater negative impact on testis than epididymis, whether associated with obesity in testis or not.

**Keywords:** Obesity, Hypothyroidism, Hyperthyroidism, Testis, Epididymis.

## 1 Introduction

The global prevalence of obesity has doubled, now 11% among men and 15% among women. Excessive accumulation of fat increases the likelihood of other associated diseases, including male infertility (WHO, 2014). Currently, there is a growing supply of high-fat foods combined with physical activities (WHO, 2000b). The main cause of obesity is the imbalance between the amount of energy ingested versus the amount of energy expended (Nammi *et al.*, 2004), insofar as a slight increase in daily food intake or a reduction in energy expenditure in the long run leads to an increase in body weight (Vianna and Coppari, 2011).

Thyroid hormones are involved in several biological processes related to growth, development and metabolism (Iwasaki *et al.*, 2004). Diseases that affect the thyroid gland are among the most prevalent in the world, amounting to about 2% of hyperthyroid and 1% of hypothyroid cases. In regions with dietary iodine deficiency, the prevalence of thyroid dysregulation may rise by as much as 15% (WHO, 2000a). Circulating plasma levels of T3 and T4 regulate hormone release in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis (Boelaert and Franklyn, 2005), and these hormones regulate the action of sex hormones in the hypothalamic-pituitary-reproductive gonad axis (Drumond, Meistrich and Chiarini-Garcia, 2011).

In rodents, exposure to high-fat diets for prolonged periods causes a positive energy balance (Takashiba *et al.*, 2011). Several studies with obese male rats from a high-fat diet show a reduction in the testosterone-estradiol ratio, occurring with reduced testosterone levels (Fernandez *et al.*, 2011; Viguera-Villaseñor *et al.*, 2011). In addition, other studies have found reductions in sperm

motility and fertilization rates in obese rats and mice, resulting from an increase in sperm DNA damage (Bakos *et al.*, 2011).

Improper thyroid function affects reproductive hormones, such as LH (Maia *et al.*, 1995), whereas the effects on growth hormones, such as FSH, and testosterone remain controversial (Smith and Walker, 2015). Studies show that transient neonatal hypothyroidism induced by propylthiouracil (PTU) causes alterations in physiological mechanisms in rats (Chiao *et al.*, 2000) and mice (Joyce, Porcelli and Cooke, 1993), such as a decrease in both the adrenocortical response to ACTH and the production of corticosterone. Transient neonatal hyperthyroidism in rats results in the early cessation of Sertoli cell proliferation, leading to a lower population of these cells in the adult animal (Holsberger and Cooke, 2005).

Therefore, given the biological, clinical and social importance of this subject, in addition to the absence of studies associating these metabolic diseases to the male reproductive system, the aim of the research was to evaluate whether obesity in conjunction with hypothyroidism or hyperthyroidism causes damage to the testicular and epididymal development of C57BL/6 mice, and whether it depends on inflammation and/or oxidative stress.

## **2 Material and Methods**

### *2.1 Animals*

Adult male C57BL/6 mice (n=20/group) aged 8 weeks were supplied by the animal facility of the University of São Paulo (USP) School of Medicine,

and kept under controlled temperature ( $\pm 23^{\circ}\text{C}$ ) and lighting (12L, 12D photoperiod, lights switched off at 6:00 p.m.). All experimental procedures and protocols complied with the Ethical Principles of Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA / USP no. 106/2014).

## 2.2 Experimental design

The animals were randomly assigned to six groups, and fed either a standard diet (SD) or a high-fat diet (HFD) for 12 weeks. Afterwards, both groups were treated with saline as a vehicle (SD+saline and HFD+saline groups), or PTU (propylthiouracil antithyroid drug – SD+PTU and HFD+PTU groups), or else T3 (triiodothyronine – SD+T3 and HFD+T3 groups) for over 30 days (Figure 1). Total calories of the SD were provided by 70% carbohydrates, 20% proteins and 10% fat, whereas those of the HFD were provided by 20% carbohydrates, 20% proteins and 60% fat, according to Belchior *et al.* (2015) (PragSoluções Biociências Ltda., Jaú, SP, Brazil). Hyperthyroidism was induced with a daily dose of 0.25  $\mu\text{g/g}$  T3 (Losacco *et al.*, 2018), and hypothyroidism, with a daily dose of 12.5 mg/Kg PTU (Ben Hamida *et al.*, 2013; Mallela *et al.*, 2014), both subcutaneously. After 16 weeks of treatment, the mice were anesthetized with isoflurane (Isoran®; BioChimico, Itatiaia, Brazil) and euthanized by decapitation. The body, testis, epididymis, vas deferens, prostate and seminal vesicle (full and empty) weights were measured. The blood serum was separated into testosterone, LH and FSH doses. The testis and epididymis were removed for sperm count, inflammatory profile and oxidative stress. The spermatozoa

removed from the vas deferens were used for sperm morphology analysis. Histological analyses were performed on the testis, including spermatogenic kinetics, tubule diameter and germinal epithelium height. The epididymis was also used for stereological analysis. Given that the mice used in this study were also used in another recently published study, the data confirming the condition of hypo- and hyperthyroidism, as well as obesity, can be checked in the article authored by Losacco *et al.* (2018).

### *2.3 Testosterone, free T4, LH and FSH concentrations*

Blood serum was collected and used to determine the testosterone, free T4, LH and FSH serum concentrations, as described by Ogo *et al.* (2017), with minor adaptations. The serum concentrations of LH, FSH, free T4 and testosterone were determined by radioimmunoassay (RIA), using the double-antibody method. Specific kits for LH and FSH were provided by the National Hormone and Peptide Program (Harbor-UCLA Medical Center). The primary antibody for LH and FSH were anti-rat LH-S10 and FSH-S11, respectively. The reference was LH-RP3 and FSH-RP2. The lower limit of assay detection was 0.04 ng/mL LH and 0.2 ng/mL FSH. The intra-assay coefficients of variance (CVs) for LH and FSH were 3.4% and 3.0%, respectively. Serum testosterone concentrations were determined using specific kits provided by MP Biomedicals (MP Biomedicals do Brasil, São Paulo, SP, Brazil). The lower limit of detection was 0.07 pg/mL testosterone, and the intra-assay CV was 4.0%. All the samples were measured in duplicate and included in the same assay to avoid inter-assay errors.

## *2.4 Sperm number, daily sperm production (DSP) per testis, and transit time in the epididymis caput*

The testis and the epididymis caput were weighed and homogenized, as described previously by Punhagui *et al.* (2016), with minor adaptations. After the homogenized material was diluted, a small sample was transferred to a Neubauer chamber (4 fields/animal) to count the resistant spermatids (stage 19 of spermatogenesis) in the testis, and the spermatozoa in the epididymis. In calculating the DSP, the concentration of spermatids per testis was divided by 4.84, which is the number of days in which mature spermatids are present in the seminiferous epithelium (Garcia *et al.*, 2011). In calculating sperm transit time through the epididymis, the number of sperm in each portion was divided by the DSP.

## *2.5 Inflammatory profile*

### *2.5.1 Myeloperoxidase activity*

Myeloperoxidase (MPO) is an enzyme abundant in the azurophilic granules of neutrophils, and is used as a biochemical marker of neutrophil infiltration into various tissues. Thus, in the present study, an MPO colorimetric assay was used to assess neutrophil migration into the testis and epididymis, as described by Siervo *et al.* (2016). Frozen samples were homogenized and centrifuged (1400 rpm, 2min, 4°C). The resulting supernatant was assayed spectrophotometrically for MPO activity at 450 nm. Briefly, 5 µL supernatant was mixed with 200 µL of 50 mM phosphate buffer (pH 6.0), containing 0.167 mg/mL *o*-dianisidine dihydrochloride and 0.015% hydrogen peroxide (Valério *et al.*,

2009). MPO activity is expressed as the number of neutrophils per mg of tissue, read off a standard curve constructed over a range of 196-400 000 neutrophils.

### 2.5.2 *N-Acetyl-b-D-glucosaminidase activity*

N-Acetyl-b-D-glucosaminidase (NAG) activity was determined using a colorimetric method adapted by Siervo *et al.* (2016). Briefly, 20  $\mu$ L of supernatant (testis and epididymis), obtained as described above for determining MPO activity, was placed in a 96-well plate, to which 40  $\mu$ L of 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) was added. The reaction was initiated by the addition of 2.24 mM 4-nitrophenyl *N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide. The plate was incubated at 37°C for 10 min, and the reaction was stopped by adding 50  $\mu$ L of 0.2 M glycine buffer (pH 10.6). Enzyme activity was determined spectrophotometrically at 400 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer; Thermo Scientific, Vantaa, Finland). NAG activity was expressed as the number of macrophages per mg of tissue, read off a standard curve constructed over a range of 196-400 000 macrophages.

### 2.5.3 *Cytokine measurement*

Testicle and epididymal samples were homogenized in 350  $\mu$ L of phosphate buffer saline for the testis sample and 300  $\mu$ L for the epididymis sample. The samples were centrifuged (14000 rpm x 15 min x 4°C), and the supernatants were used to measure the TNF $\alpha$ , IL1, IL6 and IL-10 levels with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using eBioscience kits. The results were expressed as picograms (pg) of cytokine per mg of protein (Manchope *et al.*, 2016).

## 2.6 Oxidative stress

### 2.6.1 Quantification of superoxide anion

Superoxide anion production was evaluated in tissue homogenates, as described by Ogo *et al.* (2017). Briefly, the homogenates (50  $\mu\text{L}$ ) were mixed with a nitro blue tetrazolium (NBT) solution (100  $\mu\text{L}$ , 0.1% in ddH<sub>2</sub>O, weight/volume) and incubated in 96-well plates at 37°C for 1 hr. The aqueous mixture was removed from the wells carefully, and the formazan precipitate was solubilized by adding KOH (120  $\mu\text{L}$ , 2M) and DMSO (120  $\mu\text{L}$ ) solutions in each well. The absorbance was measured at 600 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Vantaa, Finland). The total protein of each sample was used for data normalization, and the results were expressed as NBT reduction (OD at 600 nm).

### 2.6.2 Lipid peroxidation

Lipid peroxidation in the testis and epididymis was assessed by determining the thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels. In brief, trichloroacetic acid (10%) was added to the homogenate to precipitate the proteins. This mixture was then centrifuged (1000 g, 3 min at 4°C). The protein-free sample was extracted and thiobarbituric acid (0.67%) was added. The mixture was kept in a water bath at 100°C for 15 min. Malondialdehyde (MDA), an intermediate product of lipoperoxidation, was determined by calculating the difference between absorbances at 535 and 572 nm on a microplate spectrophotometer reader (Multiskan GO, Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Vantaa, Finland), and the results were expressed as TBARS (nmol of MDA per mg of tissue) (Staurengo-Ferrari *et al.*, 2017).

### 2.6.3 Antioxidant activity – ABTS assay

Testicle and epididymal samples were homogenized in 500  $\mu\text{L}$  of 1.15% potassium chloride (KCl) and centrifuged (15 min x 4000 rpm x 4°C). The supernatant (10  $\mu\text{L}$ ) was mixed with the ABTS reagent (7.0 mM ABTS solution in 2.45 mM potassium persulfate) and 40  $\mu\text{L}$  ultrapure water. The absorbance was determined at 730 nm in a microplate reader. The Trolox curve (0.01 to 20 nmol) was plotted, and the results were presented as nmol Trolox equivalents per mg of protein (Martinez *et al.*, 2016).

### 2.6.4 Total antioxidant capacity – FRAP assay

Testicle and epididymal samples were homogenized with 350  $\mu\text{L}$  of 1.15% KCl and centrifuged (15 min x 4000 rpm x 4°C). The ability of the sample to resist oxidative damage was determined using the FRAP assay, by mixing 20  $\mu\text{L}$  of supernatant with 30  $\mu\text{L}$  of deionized water and 150  $\mu\text{L}$  of freshly prepared FRAP reagent. The reaction mixture was incubated at 37°C for 45 min, and the absorbance was measured at 595 nm. The results were equated against a Trolox standard curve (1.5–30  $\mu\text{mol/L}$ , final concentrations), and expressed as Trolox equivalents per mg of protein (Manchope *et al.*, 2016).

### 2.6.5 Glutathione (GSH) assay

Testicle and epididymal samples were collected and maintained at 80°C. The samples were homogenized with 500  $\mu\text{L}$  of 1.15% KCl. The homogenate was mixed with 25  $\mu\text{L}$  of 50% trichloroacetic acid and was homogenized three times for 15 min. The mixture was centrifuged (15 min x 4000 rpm x 4°C). The supernatant was added to 200  $\mu\text{L}$  of 0.4 M TRIS buffer, pH 8.9, and 10  $\mu\text{L}$  of 0.01M DTNB. After 5 min, the absorbance was measured at 412 nm

against a reagent blank with no supernatant. A standard curve was plotted with standard GSH. The results were expressed as GSH nmol per mg of protein (Manchope *et al.*, 2016).

### *2.7 Sperm morphology*

The contents of the vas deferens were removed by internal rinsing with 0.3  $\mu$ L of 10% formal saline. Smears on histological slides were prepared from this solution and observed under a photomicroscope (Opton) at 400X magnification. One hundred spermatozoa were analyzed per animal. Morphological analysis was classified into three general categories: normal morphology, head abnormalities (either a head without characteristic curvature or an isolated form, i.e., no tail attached) and tail abnormalities (broken, rolled into a spiral or isolated, i.e., no head attached). This analysis was performed as described by Punhagui *et al.* (2016), with minor adaptations.

### *2.8 Histological process*

The left testis and the epididymis (5/group) were removed and fixed in Methacarn (60% Methanol, 30% Chloroform and 10% Glacial Acetic Acid). This material was then immersed in a few baths (20 min each) of alcohol (95% and absolute), xylene (40 min) and Paraplast®. The last xylene and Paraplast® baths were performed in an oven at 65°C, after which the material was sectioned into 5  $\mu$ m slices, and stained with hematoxylin and eosin (HE) (Punhagui *et al.*, 2016).

#### *2.8.1 Histopathological analysis of the testis and epididymis*

The epididymal and testicle tissues were evaluated qualitatively, according to the presence of immune cells in the epithelium, lumen and interstitial

compartment, and of epithelium vacuolization and inflammatory infiltrate. This analysis was performed using an Opton microscope (100X and 400X magnification), a light microscope with four objective lenses (4X, 10X, 40X, and 100x) and an ocular lens (10X). All the abnormalities were photomicrographic.

#### *2.8.2 Seminiferous tubule diameters and seminiferous epithelium height in the testis*

Ten random testicular cross sections in Stage IX of the seminiferous epithelium cycle were examined per animal. Seminiferous tubule diameters were measured using an optical light microscope – Opton photomicroscope (400X magnification), whereas the tubule images were analyzed with BELview software (version 6.2.3.0 for Windows). Likewise, the seminiferous epithelium height was measured using the same tubules and methodology mentioned earlier. The mean of four measures of diameter and height was calculated for each seminiferous tubule, and used in the statistical analysis.

#### *2.8.3 Spermatogenic kinetics in the testis*

One hundred random tubular sections per animal were classified into four categories: Stages I–VI, VII–VIII, IX–XI, and XII of the seminiferous epithelium cycle, according to Drumond *et al.* (2011), under a light microscope (Opton) at 100X and 400X magnification.

#### *2.8.4 Stereological analysis of the epididymis*

Ten random epididymal cross sections from the caput and cauda regions were obtained per animal and used for stereological analysis. This analysis was performed using Weibel's multipurpose graticulate, with 168 points, to compare the relative proportion among the epididymal components

(epithelium, stroma, and lumen) in the experimental groups, according to Punhagui *et al.* (2016), with minor adaptations.

## 2.9 Statistical analysis

A completely randomized experimental design was used in a 3x2 factorial analysis, with 3 levels of hormone (no hormone or with PTU or with T3) and 2 levels of obesity (with or without obesity) to compare all the groups. We used the *R Project for Statistical Computing* program to perform the statistical analysis of the data, which were converted into logarithmic scale to meet the assumptions of the analysis of variance (ANOVA 2-way), when necessary. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ . The normality of the errors was considered at  $P > 0.10$ , and homogeneity of variances at  $P > 0.05$ .

## 3 Results

### 3.1 Body and reproductive organ weight

The obese (HFD+saline group) and obese hypothyroid (HFD+PTU group) mice showed an increase in prostate weight, compared with the other groups. Obese hyperthyroid mice (HFD+T3 group) showed a decrease in the full seminal vesicle, whereas obese hypothyroid mice (HFD+PTU group) showed an increase in the empty seminal vesicle, compared with the other groups. The weight of other organs was not statistically significant (Table 1). The body weight of the animals is showed in Losacco *et al.* (2018).

### 3.2 LH, FSH, testosterone and free T4 concentrations

The LH dose showed that only in the presence of T3 (SD+T3 group) did a significant higher concentration of LH occur, compared with the other groups (Figure 2A). The testosterone and FSH dose remained unchanged among all the groups (Figure 2B and 2C). The free T4 was lower in all the groups exposed to PTU (SD+PTU and HFD+PTU groups) or T3 (SD+T3 and HFD+T3 groups), regardless of the diet. This difference in free T4 shows that the induction of thyroid dysregulation performed in the experiment was the correct procedure and yielded successful results in the animals. Both PTU-induced groups were more similar between each other than to the two T3-induced groups, and both T3-induced groups were more similar between each other than to the two PTU-induced groups (Figure 2D).

### *3.3 Sperm count*

The DSP and the number of spermatids in the testis were higher in the HFD+saline group and lower in the SD+T3 group, compared with the other groups. However, the number of spermatozoa and the transit time in the epididymis were statistically similar among the groups (Table 2).

### *3.4 Inflammatory profile*

Macrophage recruitment (Figures 3A, 3C and 3E) and neutrophil recruitment (Figures 3B, 3D and 3F) showed no significant results among all the groups. Although statistically insignificant, it is important to note that there was a 43.50% and 44.10% reduction in neutrophil recruitment in the SD+T3 group in the testis and in the epididymal cauda region, respectively, compared with the control group. Interestingly, there was also an average reduction of 48.29% in

neutrophil recruitment and 42.37% in macrophage recruitment in the epididymal caput region, compared with the control. This indicates that there was recruitment of resident and non-resident macrophages and neutrophils to the testis and epididymis; however, NAG and MPO activity did not induce the release of any major enzyme by these cells.

Proinflammatory cytokine IL1 $\beta$  in the testis (Figure 4C) was greater in the group exposed to HFD and hyperthyroidism (HFD+T3 group), compared with the other groups. However, this cytokine in the epididymis (Figure 4D) was similar among the experimental groups. The other cytokines, like TNF $\alpha$  (Figure 4A and 4B) and IL10 (Figure 4E), were similar among the groups. It is also important to note that there was a 53.85% reduction in IL10 levels in the hypothyroid group (SD+PTU), compared with the control group (SD+saline) in the epididymis, albeit with no statistical significance.

### *3.5 Oxidative Stress*

Lipid peroxidation of the hypothyroid group (SD+PTU group) was greater in the testis (Figure 5A), and remained unchanged in the epididymis (Figure 5B), compared with the other groups. The other oxidant (Figure 5C, 5D, 5I and 5J) and antioxidant (Figure 5E, 5F, 5G and 5H) parameters remained similar among the groups.

### *3.6 Sperm morphology and histological analysis of the testis*

Sperm morphology and spermatogenic kinetics in the testis did not show any significant results among the experimental groups (Table 3). The germinal epithelium height was increased in the obese groups that had been

administered both thyroid drugs (HFD+PTU and HFD+T3 groups), whereas the seminiferous tubule diameter was statistically similar among the groups (Table 3). Qualitative histopathological analysis of the testis showed the presence of multinucleated cells adhered to the internal border of the germinal epithelium (Figure 6A), and cells detached from the germinal epithelium in the lumen of the seminiferous tubule (Figure 6) in the SD+PTU, SD+T3, HFD+PTU and HFD+T3 groups, being predominant in the last two groups.

### *3.7 Stereological and histopathological analysis of the epididymis*

The stroma compartment was decreased in the obese hyperthyroid group (HFD+T3 group), and the epithelium compartment was increased in the hypothyroid group (PTU+saline group), both in the caput epididymal region. Moreover, the stroma compartment in the cauda epididymal region was increased in the hyperthyroid group (SD+T3 group), compared with the other groups. All the other parameters remained similar (Table 4). Qualitative histopathological analysis performed in the epididymis showed the presence of immune cells (Figure 6C) and cells detached from the epithelium in the lumen of the epididymal duct (Figure 6D), in the caput region. It was also possible to observe the presence of multinucleated cells adhered to the internal border of the epididymal epithelium (Figure 6E), and inflammatory infiltrate in the stromal compartment (Figure 6F) of the epididymal cauda region.

## **4 Discussion**

In our results, the hyperthyroid state had a hormonal unbalance in the hypothalamic-pituitary-gonad axis, with higher LH concentrations associated with a lower sperm count in testicle tissue, thus shifting feedback regulation and impairing spermatogenesis. In addition, whenever hyperthyroidism was associated with obesity, it was possible to observe an increase in proinflammatory cytokine IL1 $\beta$ , and a decrease in lipid peroxidation in the testis. The hypothyroid state caused higher lipid peroxidation, and proportionally increased the stromal compartment in the epididymal cauda. Moreover, hypothyroidism in conjunction with obesity increased the seminiferous epithelium height and body weight, as well as the weight of some organs. Obesity in HFD-induced conditions caused an increase in both the testis sperm count and the body and organ weight. All these treatments impaired the spermatogenic process somewhat, whereas the histopathology detected immune cells, and inflammatory infiltrate and cells in the lumen of the tubules and epididymal duct.

Fontenelle *et al.* (2016) says that thyroid gland dysfunction in humans, such as hypothyroidism or hyperthyroidism, results in changes in body weight, because of the participation of thyroid hormones in the control of thermogenesis and appetite. The increase in body weight found in both the obese and the obese with hypothyroid groups shows that obesity associated with hypothyroidism is more harmful to the body. This becomes more evident when observing the parameters of prostate and seminal vesicle empty weight, as previously reported (Fernandez *et al.*, 2011; Fernandes *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014).

Androgens are an integral part of spermatogenesis, and are required for testosterone production by Leydig cells in early puberty; thus, they mark the beginning of spermatogenesis. Thyroid hormones also play a role in

spermatogenesis, involving Sertoli cell proliferation and development (Sharma and Agarwal, 2013). Aware of the importance of these hormones in the formation of normal spermatozoa, several authors have evaluated the hormone levels of HFD-induced 5-week-old Sprague-Dawley rats (Liu *et al.*, 2014), 5-week-old (Fernandez *et al.*, 2011) or 8-week-old (Alhashem *et al.*, 2014) Wistar rats, and 3-week-old C57/BL6 mice (Fan *et al.*, 2015). These authors observed different testosterone, and LH and FSH concentrations when comparing obese with non-obese animals. Hyperthyroid Sprague-Dawley adult male rats had lower LH and FSH levels, but an unchanged testosterone level (Schneider *et al.*, 1979), even though hypothyroid rats may also have lower LH and FSH levels (Bruni, Dibbet and Meites, 1975). Interestingly, the testosterone level differs in both states, being higher in hyperthyroidism (Korejo *et al.*, 2016) and mostly remaining unchanged in hypothyroidism (Bruni, Dibbet and Meites, 1975). Thus, the literature shows controversial results among different authors, who report reduced LH levels (Fan *et al.*, 2015) and FSH levels (Liu *et al.*, 2014) associated with changes in testosterone levels, or the reduction in these hormones (Bruni, Dibbet and Meites, 1975; Alhashem *et al.*, 2014; Korejo *et al.*, 2016), or else no alteration in any of these hormones (Fernandez *et al.*, 2011). The methods to induce thyroid disorders using PTU and T3, and the HFD composition with 60% fat, demonstrate that the amount of fat composition of the diet causes a hormonal release pattern which, unlike that reported in the literature, shows increased LH only in animals with hyperthyroidism treated with a standard diet. According to Buzzard *et al.* (2000), growth sperm production can be attributed to different causes, such as higher doses of gonadotropins and higher concentrations of both LH and FSH, which are important for spermatogenesis and germ cell survival.

Contrasting with our results, obese HFD-induced C57BL/6 mice showed no alteration in epididymis sperm concentration, and presented a higher ratio of abnormal sperm morphology; furthermore, some authors have also shown epithelial discontinuity in the testis, especially in Sertoli cells (Buzzard *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2015). Other studies using HFD-induced obesity showed controversial results: on one hand, lower DSP and number of testicular spermatids and epididymal sperm, without yielding any significant results in the epididymal stereological analysis in obese rats (Fernandes *et al.*, 2012), and, on the other hand, the presence of germ cells in testicular lumen without any difference in testicular morphometry, and with a lower number of testicular spermatids (Vendramini *et al.*, 2014). We observed greater damage in the epididymal tissue and the testicular function in our obese mice, evidenced by the presence of germinal epithelial cells in the lumen and immune cells in the stroma. Both of these cells may have promoted alterations in the testicular sperm count and in the epithelial proportions of the epididymis.

Studies by Buzzard *et al.* (2000) using male Sprague-Dawley rats showed the presence of thyroid hormone receptors on germ cells and proliferating Sertoli cell, thus indicating the role of thyroid hormones. Moreover, the thyroid hormone receptors were identified in different stages of developing rat germ cells: gonocytes, spermatogonia, and round and elongate spermatids (Buzzard *et al.*, 2000). Several clinical and experimental studies showed that thyroid dysregulation, such as hypothyroidism or hyperthyroidism, causes changes in sperm production, including hormonal dysregulation, which affects sperm quality, as well as sperm count (Kumar, Shekhar and Dhole, 2014). These studies suggest that our results in hyperthyroid animals indicated greater

activation of the germinal epithelium cells due to increased LH level and circulating T3 hormone, but one which was not enough to increase sperm production, and which actually caused a decrease in sperm count.

The epididymis is an important organ responsible for spermatozoon maturation and motility, and remains under the direct and indirect pathological influence of the testis. Korejo *et al.* (2016) experimented on 6-week-old hyperthyroid-induced mice and reported an increase in the lumen diameter of the epididymal histological compartments in the caput and cauda regions, and also observed a few germ cells resulting from the compaction of the epithelial cells. The epididymal tissue remodeling process can also be observed in our results for T3-induced obese animals, with changes in both the caput and cauda regions, but the remodeling was not sufficient to alter the sperm count or transit time in this organ.

Obesity was also related to chronic systemic inflammation characterized by the abnormal production of cytokines—increased mediators of the acute phase of inflammation—and by activation of proinflammatory pathways (Rotter, Nagaev and Smith, 2003; Hotamisligil, 2006). Thyroid hormones affect the recruitment of several immune cells, such as macrophages, and the release of several proinflammatory cytokines, such as TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  and IL6. In hyperthyroidism, there is a decrease in the proinflammatory activity of monocytes and macrophages, whereas the inverse effect occurs in hypothyroidism (De Vito *et al.*, 2011). However, the opposite effect occurred respectively in the present study, showing that the resident testicular immune cells increased the release of IL1 $\beta$  (Stéphan, Syed and Jégou, 1997) in the case of obesity associated with hyperthyroidism, a state known for rapid loss of body fat.

An experimental study with HFD-induced mice showed lower levels of IL-1 $\beta$  and macrophages in testis tissue (Zhang *et al.*, 2017), whereas Zhao *et al.* (2017) showed higher levels of IL-10 and TNF- $\alpha$ . These studies show us that obesity influences testicular macrophages, and contributes to deregulating the production of inflammatory cytokines. In addition, the macrophages in adipose tissue are highly adaptive to lipid-rich environments, wherein their adiposity is increased by activation of the lysosomal lipid metabolism, even before their own activation and that of the inflammatory profile (Xu *et al.*, 2013). Although, there are periods in which weight can be gained or lost, the adipose tissue dynamically changes the cellular composition, such as cell type and cell immunity (Mancini *et al.*, 2016), leading us to believe that fat loss can cause severe disruption of the cytokine release pattern, if it occurs at an accelerated rate.

Neutrophils are usually stimulated by oxidative stress (Videla *et al.*, 1993; Fernández and Videla, 1995) and by macrophage phagocytosis (Forner, Barriga and Ortega, 1996; Ortega *et al.*, 1996), both of which are also affected by thyroid hormones. In general, authors note that the proinflammatory effect of thyroid hormone administration generates a shift in macrophage polarization to the M1 subtype (Perrotta *et al.*, 2014). Accordingly, oxidative stress has been found to be associated with both of the thyroid dysregulation states in humans (Resch *et al.*, 2002). Thyroid hormones can themselves act as oxidants and cause DNA damage in human sperm (Dobrzynska, Baumgartner and Anderson, 2004); however, the pathways for this to occur involve many transcription factors. These hormones influence the lipid composition of rat tissue, and consequent susceptibility to oxidative stress (Mancini *et al.*, 2016). Research by Choudhury *et al.* (2003) on hypo- and hyperthyroid rats showed no significant change in the

lipid peroxidation level in the testis, or in the antioxidant levels, in either the hypo- or the hyperthyroid groups. They concluded that thyroid hormones regulate testicular antioxidant defense, and that any alteration in oxidative stress levels may affect the physiology of the testis. Thus, knowing that obesity upsets the oxidant balance, Viguera-Villaseñor *et al.* (2011) showed that the lipid peroxidation of the epididymis increases when using obese HFD-induced rats. Our oxidative stress results showed that hypothyroidism caused greater testicular lipid peroxidation, whereas obesity in conjunction with hyperthyroidism did not prove to be aggressive to the testis, but was protective to the epididymal tissue.

## **5 Conclusion**

In conclusion, the association of obesity with thyroid dysregulation was found to be more detrimental to the male reproductive organs than the association of non-obesity to hyper- or hypothyroidism. In addition, the inflammation profile and oxidative stress did not influence the morphophysiology of testicular or epididymal tissue. It is interesting to note that the testicles and epididymis are affected differently, thus showing that each organ is subject to specific alterations.

## **Acknowledgment**

The authors are grateful to CAPES for the scholarship granted to APFP, and also thank Professor Dr. Marília Franco Punhagui for her help in collecting the materials. FGS received grants from FAPESP (São Paulo State Foundation for Research Support - process number: 2014/12871-9).

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## References

- Alhashem, F., Alkhateeb, M., Sakr, H., Alshahrani, M., Alsunaidi, M., Elrefaey, H., Alessa, R., Sarhan, M., Eleawa, S. M. and Khalil, M. A. (2014) 'Exercise protects against obesity induced semen abnormalities via downregulating stem cell factor, upregulating Ghrelin and normalizing oxidative stress.', *EXCLI journal*, 13, pp. 551–72. doi: 10.17877/DE290R-289.
- Bakos, H. W., Mitchell, M., Setchell, B. P. and Lane, M. (2011) 'The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model.', *International Journal of Andrology*, 34, pp. 402–410. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20649934>.
- Belchior, T., Paschoal, V. A., Magdalon, J., Chimin, P., Farias, T. M., Chaves-Filho, A. B., Gorjão, R., St.-Pierre, P., Miyamoto, S., Kang, J. X., Deshaies, Y., Marette, A. and Festuccia, W. (2015) 'Omega-3 fatty acids protect from diet-induced obesity, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation through PPAR $\gamma$ -dependent and PPAR $\gamma$ -independent actions', *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(5), pp. 957–967. doi: 10.1002/mnfr.201400914.
- Boelaert, K. and Franklyn, J. A. (2005) 'Thyroid hormone in health and disease', *Journal of Endocrinology*, 187, pp. 1–15. doi: 10.1677/joe.1.06131.
- Bruni, J. F., Dibbet, J. A. and Meites, J. (1975) 'Effects of Hyper- and Hypothyroidism on Serum LH and FSH Levels in Intact and Gonadectomized Male and Female Rats', *Endocrinology*, 97(3), pp. 558–563. doi: 10.1210/endo-97-3-558.
- Buzzard, J. J., Morrison, J. R., O'Bryan, M. K., Song, Q. and Wreford, N. G. (2000) 'Developmental Expression of Thyroid Hormone Receptors in the Rat Testis', *Biology of Reproduction*, 62(3), pp. 664–669. doi: 10.1095/biolreprod62.3.664.
- Chiao, Y.-C., Lin, H., Wang, S.-W. and Wang, P. S. (2000) 'Direct effects of propylthiouracil on testosterone secretion in rat testicular interstitial cells', *British*

*Journal of Pharmacology*, 130(7), pp. 1477–1482. doi: 10.1038/sj.bjp.0703444.

Choudhury, S., Chainy, G. B. N. and Mishro, M. M. (2003) 'Experimentally induced hypo- and hyper-thyroidism influence on the antioxidant defence system in adult rat testis', *Andrologia*, 35(3), pp. 131–140. doi: 10.1046/j.1439-0272.2003.00548.x.

Dobrzynska, M. M., Baumgartner, A. and Anderson, D. (2004) 'Antioxidants modulate thyroid hormone- and noradrenaline-induced DNA damage in human sperm', *Mutagenesis*, 19(4), pp. 325–330. doi: 10.1093/mutage/geh037.

Drumond, A. L., Meistrich, M. L. and Chiarini-Garcia, H. (2011) 'Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: a high-resolution light microscopy approach', *Reproduction*, 142(1), pp. 145–155. doi: 10.1530/REP-10-0431.

Fan, Y., Liu, Y., Xue, K., Gu, G., Fan, W., Xu, Y. and Ding, Z. (2015) 'Diet-induced obesity in male C57BL/6 mice decreases fertility as a consequence of disrupted blood-testis barrier', *PLoS ONE*, 10(4), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0120775.

Fernandes, G. S., Arena, A. C., Campos, K. E., Volpato, G. T., Anselmo-Franci, J. a, Damasceno, D. C. and Kempinas, W. G. (2012) 'Glutamate-induced obesity leads to decreased sperm reserves and acceleration of transit time in the epididymis of adult male rats', *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), pp. 105–110. doi: 10.1186/1477-7827-10-105.

Fernandez, C. D. B., Bellentani, F. F., Fernandes, G. S. a, Perobelli, J. E., Favareto, A. P. a, Nascimento, A. F., Cicogna, A. C. and Kempinas, W. D. G. (2011) 'Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility.', *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. BioMed Central Ltd, 9(1), p. 32. doi: 10.1186/1477-7827-9-32.

Fernández, V. and Videla, L. A. (1995) 'On the mechanism of thyroid hormone-induced respiratory burst activity in rat polymorphonuclear leukocytes.', *Free radical biology & medicine*, 19(3), pp. 359–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7557550>.

Fontenelle, L. C., Feitosa, M. M., Severo, J. S., Freitas, T. E. C., Morais, J. B.

S., Torres-Leal, F. L., Henriques, G. S. and Marreiro, D. N. (2016) 'Thyroid Function in Human Obesity: Underlying Mechanisms', *Hormone and Metabolic Research*, 48(12), pp. 787–794. doi: 10.1055/s-0042-121421.

Forner, M. A., Barriga, C. and Ortega, E. (1996) 'Exercise-induced stimulation of murine macrophage phagocytosis may be mediated by thyroxine.', *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 80(3), pp. 899–903. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8964754>.

Garcia, P. V., Arrotéia, K. F., Joazeiro, P. P., de Fátima Paccola Mesquita, S., de Grava Kempinas, W. and Pereira, L. A. V. (2011) 'Orchidopexy restores morphometric-stereologic changes in the caput epididymis and daily sperm production in cryptorchidic mice, although sperm transit time and fertility parameters remain impaired', *Fertility and Sterility*, 96(3), pp. 739–744. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.06.036.

Ben Hamida, F., Troudi, A., Sefi, M., Boudawara, T. and Zeghal, N. (2013) 'The protective effect of propylthiouracil against hepatotoxicity induced by chromium in adult mice.', *Toxicology and industrial health*, pp. 1–11. doi: 10.1177/0748233713498446.

Holsberger, D. R. and Cooke, P. S. (2005) 'Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis', *Cell Tissue Res*, 322, pp. 133–140. doi: 10.1007/s00441-005-1082-z.

Hotamisligil, G. S. (2006) 'Inflammation and metabolic disorders', *Nature*, 444(1476–4687 (Electronic)), pp. 860–867. doi: 10.1038/nature05485.

Iwasaki, Y., Morishita, M., Asai, M., Onishi, A., Yoshida, M., Oiso, Y. and Inoue, K. (2004) 'Effects of Hormones Targeting Nuclear Receptors on Transcriptional Regulation of the Growth Hormone Gene in the MtT / S Rat', *Neuroendocrinology*, 79, pp. 229–236. doi: 10.1159/000078787.

Joyce, K. L., Porcelli, J. and Cooke, P. S. (1993) 'Neonatal goitrogen treatment increases adult testis size and sperm production in the mouse.', *Journal of andrology*, 14(6), pp. 448–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8294229>.

Korejo, N. A., Wei, Q., Shah, A. H. and Shi, F. (2016) 'Effects of concomitant

- diabetes mellitus and hyperthyroidism on testicular and epididymal histoarchitecture and steroidogenesis in male animals', *Journal of Zhejiang University: Science B*, 17(11), pp. 850–863. doi: 10.1631/jzus.B1600136.
- Kumar, A., Shekhar, S. and Dhole, B. (2014) 'Thyroid and male reproduction', *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 18(1), pp. 23–32. doi: 10.4103/2230-8210.126523.
- Liu, Y. U. E., Zhao, W., Gu, G., Lu, L., Feng, J., Guo, Q. and Ding, Z. (2014) 'Palmitoyl-Protein Thioesterase 1 ( PPT1 ): An Obesity-Induced Rat Testicular Marker of Reduced Fertility', *Molecular Reproduction & Development*, 81, pp. 55–65. doi: 10.1002/mrd.22281.
- Losacco, M. C., de Almeida, C. F. T., Hijo, A. H. T., Bargi-Souza, P., Gama, P., Nunes, M. T. and Goulart-Silva, F. (2018) 'High-fat diet affects gut nutrients transporters in hypo and hyperthyroid mice by PPAR- $\alpha$  independent mechanism', *Life Sciences*. Elsevier Inc, 1(202), pp. 35–43. doi: 10.1016/j.lfs.2018.03.053.
- Maia, A. L., Favaretto, A. L. V., Lamano Carvaho, T. L., Rodrigues, J. A. and Iazigi, N. (1995) 'Hypothyroidism Affects Pulsatile LH Secretion in Pubertal Orchiectomized Rats', *Archives of Physiology and Biochemistry*, 103(4), pp. 516–520. doi: 10.3109/13813459509047148.
- Mallela, M. K., Strobl, M., Poulsen, R. R., Wendler, C. C., Booth, C. J. and Rivkees, S. A. (2014) 'Evaluation of developmental toxicity of propylthiouracil and methimazole', *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology*, 101(4), pp. 300–307. doi: 10.1002/bdrb.21113.
- Manchope, M. F., Calixto-Campos, C., Coelho-Silva, L., Zarpelon, A. C., Pinho-Ribeiro, F. A., Georgetti, S. R., Baracat, M. M., Casagrande, R. and Verri, W. A. (2016) 'Naringenin Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain: Role of Oxidative Stress, Cytokines, Nrf-2 and the NO-cGMP-PKG-KATPChannel Signaling Pathway', *PLOS ONE*. Edited by B. Ryffel, 11(4), p. e0153015. doi: 10.1371/journal.pone.0153015.
- Mancini, A., Segni, C. Di, Raimondo, S., Olivieri, G., Silvestrini, A., Meucci, E. and Currò, D. (2016) 'Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation',

*Mediators of Inflammation*, 1, pp. 1–12. doi: 10.1155/2016/6757154.

Martinez, R. M., Pinho-Ribeiro, F. A., Steffen, V. S., Caviglione, C. V., Pala, D., Baracat, M. M., Georgetti, S. R., Verri, W. A. and Casagrande, R. (2016) 'Topical formulation containing hesperidin methyl chalcone inhibits skin oxidative stress and inflammation induced by ultraviolet B irradiation', *Photochemical & Photobiological Sciences*, 15(4), pp. 554–563. doi: 10.1039/C5PP00467E.

Nammi, S., Koka, S., Chinnala, K. M. and Boini, K. M. (2004) 'Obesity : An overview on its current perspectives and treatment options', 2, pp. 1–8.

Ogo, F. M., de Lion Siervo, G. E. M., Staurengo-Ferrari, L., de Oliveira Mendes, L., Luchetta, N. R., Vieira, H. R., Fattori, V., Verri, W. A., Scarano, W. R. and Fernandes, G. S. A. (2017) 'Bisphenol A Exposure Impairs Epididymal Development during the Peripubertal Period of Rats: Inflammatory Profile and Tissue Changes', *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 122(2), pp. 262–270. doi: 10.1111/bcpt.12894.

Ogo, F. M., Siervo, G. E., Gonçalves, G. D., Cecchini, R., Guarnier, F. A., Anselmo-Franci, J. A. and Fernandes, G. S. A. (2017) 'Low doses of bisphenol A can impair postnatal testicular development directly, without affecting hormonal or oxidative stress levels.', *Reproduction, fertility, and development*, pp. 1–10. doi: 10.1071/RD16432.

Ortega, E., Rodríguez, M. J., Barriga, C. and Forner, M. A. (1996) 'Corticosterone, prolactin and thyroid hormones as hormonal mediators of the stimulated phagocytic capacity of peritoneal macrophages after high-intensity exercise', *International Journal of Sports Medicine*, 17(2), pp. 149–155. doi: 10.1055/s-2007-972824.

Perrotta, C., Buldorini, M., Assi, E., Cazzato, D., De Palma, C., Clementi, E. and Cervia, D. (2014) 'The thyroid hormone triiodothyronine controls macrophage maturation and functions: Protective role during inflammation', *American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology, 184(1), pp. 230–247. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.10.006.

Punhagui, A. P. F., Vieira, H. R., Siervo, G. E. M. de L., Rosa, R. da and

Fernandes, G. S. A. (2016) 'Ethanol Exposure During Peripubertal Period Increases the Mast Cell Number and Impairs Meiotic and Spermatic Parameters in Adult Male Rats', *Microscopy Research and Technique*, 79, pp. 541–549. doi: 10.1002/jemt.22664.

Resch, U., Helsel, G., Tatzber, F. and Sinzinger, H. (2002) 'Antioxidant Status in Thyroid Dysfunction', *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 40(11), pp. 1132–1134. doi: 10.1515/cclm.2002.198.

Rotter, V., Nagaev, I. and Smith, U. (2003) 'Interleukin-6 (IL-6) Induces Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes and Is, Like IL-8 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Overexpressed in Human Fat Cells from Insulin-resistant Subjects', *Journal of Biological Chemistry*, 278(46), pp. 45777–45784. doi: 10.1074/jbc.M301977200.

Schneider, G., Kopach, K., Ohanian, H., Bonnefond, V., Mittler, J. C. and Ertel, N. H. (1979) 'The hypothalamic-pituitary-gonadal axis during hyperthyroidism in the rat', *Endocrinology*, 105(3), pp. 674–679. doi: 10.1210/endo-105-3-674.

Sharma, R. and Agarwal, A. (2013) 'Spermatogenesis : An Overview', in Zini, A. and Agarwal, A. (eds) *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*. Cleveland, USA: Springer Science+Business Media, pp. 19–44. doi: 10.1007/978-1-4614-8459-2.

Siervo, G. E. M. L., Ogo, F. M., Valério, A. D., Silva, T. N. X., Staurengo-Ferrari, L., Alvarenga, T. A., Cecchini, R., Verri, W. A., Guarnier, F. A., Andersen, M. L. and Fernandes, G. S. A. (2016) 'Sleep restriction in Wistar rats impairs epididymal postnatal development and sperm motility in association with oxidative stress', *Reproduction, Fertility and Development*, 29(9), pp. 1–8. doi: 10.1071/RD15535.

Smith, L. B. and Walker, W. H. (2015) 'Testis Hormone Signaling', in Zeleznik, A. J. and Plant, T. M. (eds) *Physiology of Reproduction*. Fourth edit. Elsevier Inc, pp. 637–690.

Staurengo-ferrari, L., Ruiz-miyazawa, K. W., Pinho-ribeiro, F. A., Domiciano, T. P., Fattori, V., Mizokami, S. S., Pelayo, J. S., Bordignon, J., Figueiredo, F., Casagrande, R., Miranda, K. M. and Jr., W. A. V. (2017) 'The nitroxyl donor

Angeli's salt ameliorates *Staphylococcus aureus* -induced septic arthritis in mice', *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier B.V., 108(11), pp. 487–499. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.016.

Stéphan, J.-P., Syed, V. and Jégou, B. (1997) 'Regulation of Sertoli cell IL-1 and IL-6 production in vitro', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 134, pp. 109–118.

Takashiba, K. S., Segatelli, T. M., de Moraes, S. M. F. and Natali, M. R. M. (2011) 'Morfologia testicular de ratos Wistar obesos sedentários e submetidos a treinamento físico', *Acta Scientiarum - Health Sciences*, 33(1), pp. 25–33. doi: 10.4025/actascihealthsci.v33i1.7698.

Valério, D. A., Georgetti, S. R., Magro, D. A., Casagrande, R., Cunha, T. M., Vicentini, F. T. M. C., Vieira, S. M., Fonseca, M. J. V., Ferreira, S. H., Cunha, F. Q. and Verri, W. A. (2009) 'Quercetin Reduces Inflammatory Pain: Inhibition of Oxidative Stress and Cytokine Production', *Journal of Natural Products*, 72(11), pp. 1975–1979. doi: 10.1021/np900259y.

Vendramini, V., Cedenho, A. P., Miraglia, S. M. and Spaine, D. M. (2014) 'Reproductive Function of the Male Obese Zucker Rats: Alteration in Sperm Productin and Sperm DNA damage', *Reproductive Sciences*, 21(2), pp. 221–229. doi: 10.1177/1933719113493511.

Vianna, C. R. and Coppari, R. (2011) 'A Treasure Trove of Hypothalamic Neurocircuitries Governing Body Weight Homeostasis', *Endocrinology*, 152(1), pp. 11–18. doi: 10.1210/en.2010-0778.

Videla, L. A., Correa, L., Rivera, M. and Sir, T. (1993) 'Zymosan-induced luminol-amplified chemiluminescence of whole blood phagocytes in experimental and human hyperthyroidism.', *Free radical biology & medicine*, 14(6), pp. 669–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8325538>.

Vigueras-Villaseñor, R. M., Rojas-Castañeda, J. C., Chávez-Saldaña, M., Gutiérrez-Pérez, O., García-Cruz, M. E., Cuevas-Alpuche, O., Reyes-Romero, M. M. and Zambrano, E. (2011) 'Alterations in the spermatic function generated by obesity in rats', *Acta Histochemica*, 113(2), pp. 214–220. doi: 10.1016/j.acthis.2009.10.004.

De Vito, P., Incerpi, S., Pedersen, J., Luly, P., Davis, F. and Davis, P. (2011) 'Thyroid hormones as modulators of immune activities at the cellular level', *Thyroid*, 21, pp. 879–890. doi: 10.1089/thy.2010.0429.

Wang, Y.-Y., Morimoto, S., Du, C.-K., Lu, Q.-W., Zhan, D.-Y., Tsutsumi, T., Ide, T., Miwa, Y., Takahashi-Yanaga, F. and Sasaguri, T. (2010) 'Up-regulation of type 2 iodothyronine deiodinase in dilated cardiomyopathy', *Cardiovascular Research*, 87(4), pp. 636–646. doi: 10.1093/cvr/cvq133.

WHO, W. H. O. (2000a) 'Diagnosis and Monitoring of Diseases of the Thyroid', *WHO Library Cataloguing*, pp. 1–20.

WHO, W. H. O. (2000b) 'Obesity: preventing and managing the global epidemic', *WHO Library Cataloguing*, p. 252. Available at: [http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO\\_TRS\\_894/en/](http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_894/en/).

WHO, W. H. O. (2014) 'Global Status Report on noncommunicable diseases', *WHO Library Cataloguing*, p. 302.

Xu, X., Grijalva, A., Skowronski, A., van Eijk, M., Serlie, M. J. and Ferrante Jr, A. W. (2013) 'Obesity Activates a Program of Lysosomal-Dependent Lipid Metabolism in Adipose Tissue Macrophages Independently of Classic Activation', *Cell Metabolism*, 18(6), pp. 816–830. doi: 10.1016/j.cmet.2013.11.001.

Zhang, J., Li, K., Yuan, M., Zhang, J., Huang, G., Ao, J., Tan, H., Li, Y., Gong, D., Li, J., Kang, L., An, N., Li, F., Lin, P. and Huang, L. (2017) 'A high-fat diet impairs reproduction by decreasing the IL1 $\beta$  level in mice treated at immature stage', *Scientific Reports*. Springer US, 7(567), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-017-00505-0.

Zhao, J. L., Zhao, Y. Y. and Zhu, W. J. (2017) 'A high-fat, high-protein diet attenuates the negative impact of casein-induced chronic inflammation on testicular steroidogenesis and sperm parameters in adult mice', *General and Comparative Endocrinology*. Elsevier Inc., 252, pp. 48–59. doi: 10.1016/j.ygcen.2017.07.013.

## Figure legends:

### Figure 1. Experimental design of this study

*wks* = weeks; *PND* = post-natal days; *LFD* = low-fat diet; *HFD* = high-fat diet; *PTU* = propylthiouracil

### Figure 2. Luteinizing hormone (LH; A), follicle stimulating hormone (FSH; B), testosterone (C) and free T4 (D) concentrations.

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM; ANOVA 2-way test with Tukey *post hoc* test. <sup>a,b,c,d</sup> indicate groups that differ statistically from the other groups ( $p < 0.05$ ).

### Figure 3. Number of macrophages (A, C, E) determined by NAG activity, and number of neutrophils (B, D, F) determined by MPO activity in the testis (A, B), caput-corporis (C, D) and cauda (E, F) epididymis regions.

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM; ANOVA 2-way test with Tukey *post hoc* test ( $p > 0.05$ ).

### Figure 4. Concentration of TNF $\alpha$ (A, B), IL1 $\beta$ (C, D) and IL10 (E) in the testis (A, C) and the epididymis (B, D, E).

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM; ANOVA 2-way test with Tukey *post hoc* test. <sup>a,b,c</sup> indicate groups that differ statistically from the other groups ( $p < 0.05$ ).

### Figure 5. Oxidative stress with lipid peroxidation (A, B), glutathione (GSH) assay (C, D), total antioxidant capacity (E, F), antioxidant activity (G, H) and superoxide anion (I, J) in the testis (A, C, E, G and I), and in the epididymis (B, D, F, H and J).

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM; Kruskal-Wallis test with Dunn *post hoc* test (A, D, E and I). ANOVA 2-way test with Tukey *post hoc* test (B, C, F, G, H and J). <sup>a,b</sup> indicate groups that differ statistically from the other groups ( $p < 0.05$ ).

### Figure 6. Qualitative histopathological analysis of the testis (A, B), and in the epididymis caput (C, D) and cauda (E, F) regions.

(A) Presence of multinucleated cells ( $\rightarrow$ ) adhered to the internal border in the germinal epithelium of the seminiferous tubule in the HFD+T3 group; (B) presence of cells detached from the germinal epithelium (\*) in the lumen of the

seminiferous tubule in the HFD+PTU group; (C) presence of immune cells (→) in the lumen of the caput region in the HFD+T3 group; (D) presence of cells detached from the epithelium (\*) in the lumen of the epididymal duct in the caput region in the HFD+T3 group; (E) presence of multinucleated cells (→) in the cauda region in the LFD+PTU group; (F) presence of inflammatory infiltrate in the stromal compartment of the cauda region in the LFP+PTU group. *L* = lumen; *Ep* = epithelium; *St* = stroma; *V* = blood vas.

**Table 1.** Body and reproductive organ weight

	SD			HFD		
	Saline	PTU	T3	Saline	PTU	T3
Testis (mg)	86.10 ± 1.10	87.40 ± 0.80	85.30 ± 0.70	88.10 ± 2.40	88.60 ± 0.70	82.60 ± 0.80
Epididymis (mg)	36.60 ± 0.70	36.00 ± 0.50	33.90 ± 0.20	35.40 ± 0.40	35.70 ± 0.40	32.80 ± 0.70
Vas deferens (mg)	11.60 ± 0.40	11.70 ± 0.30	10.30 ± 0.50	13.10 ± 0.40	12.20 ± 0.40	9.10 ± 0.30
Prostate (mg)	31.00 ± 0.80	23.50 ± 0.70	28.70 ± 1.50	41.70 ± 1.50*	43.70 ± 1.70*	19.70 ± 0.90
Full Seminal Vesicle (mg)	318.60 ± 3.60	346.80 ± 4.60	304.00 ± 6.20	334.6 ± 6.90	342.00 ± 5.40	226.00 ± 7.40*
Empty Seminal Vesicle (mg)	149.50 ± 2.80	167.00 ± 3.30	153.40 ± 2.70	168.10 ± 3.80	181.90 ± 1.90*	120.70 ± 3.50

Values expressed as mean ± SEM

ANOVA 2-way with Tukey-Kramer post hoc test

\* Indicate groups that differ statistically from the other groups (p<0.05)

**Table 2.** Sperm count in the testis and epididymis

	SD			HFD		
	Saline	PTU	T3	Saline	PTU	T3
Number of spermatids (x10 <sup>6</sup> )	9.29 ± 0.07	9.37 ± 0.11	7.91 ± 0.15*	10.87 ± 0.14*	9.44 ± 0.19	9.85 ± 0.14
DSP (x10 <sup>6</sup> )	1.92 ± 0.01	1.93 ± 0.02	1.63 ± 0.03*	2.24 ± 0.03*	1.95 ± 0.04	2.03 ± 0.03
Number of spermatozoa (x10 <sup>6</sup> )	9.82 ± 0.26	11.16 ± 0.30	8.86 ± 0.25	9.56 ± 0.22	8.68 ± 0.16	9.89 ± 0.26
Sperm transit time through caput (days)	5.12 ± 0.13	5.75 ± 0.12	5.58 ± 0.23	4.26 ± 0.09	4.54 ± 0.13	4.86 ± 0.11

Values expressed as mean ± SEM

ANOVA 2-way with Tukey-Kramer post hoc test

\* Indicate groups that differ statistically from the other groups (p<0.05)

Legend: *DSP* = daily sperm production

**Table 3.** Sperm morphology and histological testicular analysis

	SD			HFD		
	Saline	PTU	T3	Saline	PTU	T3
Normal spermatozoa (%)	62.68 ± 1.14	56.93 ± 1.96	53.37 ± 0.40	55.25 ± 1.09	57.50 ± 1.26	55.12 ± 0.94
Abnormal head (%)	16.56 ± 0.78	18.87 ± 0.79	21.06 ± 0.62	15.87 ± 0.61	15.50 ± 0.69	15.06 ± 0.72
Abnormal tail (%)	20.75 ± 0.95	24.18 ± 1.83	27.00 ± 1.11	28.87 ± 1.01	25.56 ± 0.88	29.81 ± 0.74
Stage I-VI (%)	38.80 ± 0.77	37.40 ± 0.72	41.00 ± 0.93	39.40 ± 0.37	40.20 ± 0.89	44.00 ± 0.89
Stage VII-VIII (%)	35.40 ± 1.06	34.40 ± 0.60	33.00 ± 0.70	38.20 ± 0.71	34.80 ± 0.67	31.80 ± 0.66
Stage IX-XI (%)	23.20 ± 0.58	24.20 ± 0.97	24.00 ± 0.92	16.80 ± 0.67	20.80 ± 0.61	19.60 ± 0.70
Stage XII (%)	2.60 ± 0.33	4.00 ± 0.46	2.00 ± 0.22	5.60 ± 0.37	4.20 ± 0.70	4.60 ± 0.10
Seminiferous diameter (µm)	182.87 ± 0.89	178.10 ± 1.24	180.21 ± 1.59	183.06 ± 1.11	194.75 ± 1.52	192.21 ± 1.28
Epithelium height (µm)	56.21 ± 0.41	53.31 ± 0.37	55.12 ± 0.47	58.54 ± 0.48	61.72 ± 0.70*	61.52 ± 0.62*

Values expressed as mean ± SEM

ANOVA 2-way with Tukey-Kramer post hoc test

\* Indicate groups that differ statistically from the other groups (p<0.05)

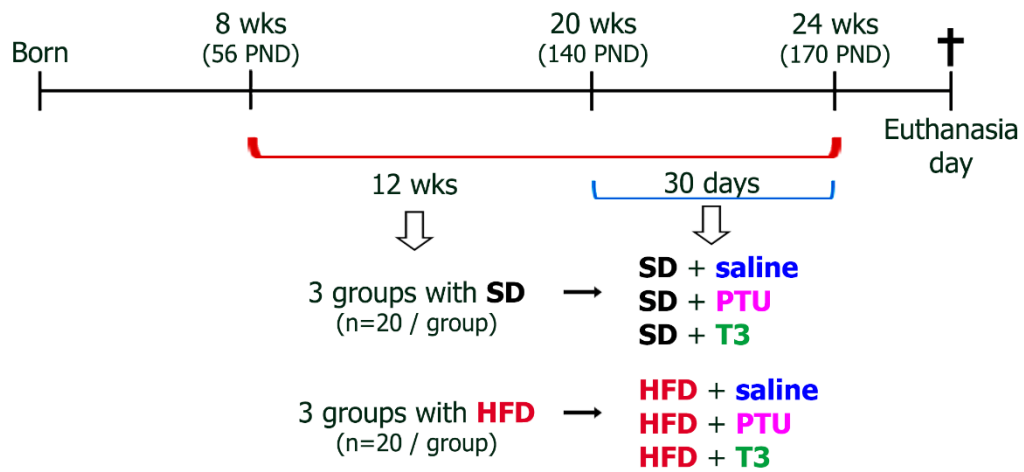
**Table 4.** Stereological analysis

	SD			HFD		
	Saline	PTU	T3	Saline	PTU	T3
Caput						
Stroma	25.0 (20.8-33.3)	22.6 (19.0-26.6)	25.6 (19.6-31.5)	25.2 (21.7-29.1)	22.6 (19.0-26.1)	20.8 (17.7-26.1)*
Epithelium	50.0 (45.1-56.5)	56.5 (52.9-59.9)*	54.1 (44.9-59.5)	53.8 (48.0-59.0)	50.5 (44.1-59.9)	53.2 (46.5-61.4)
Lumen	23.5 (18.3-28.2)	19.3 (16.2-24.8)	17.5 (14.2-27.9)	19.6 (16.0-26.3)	23.5 (17.4-29.4)	23.8 (17.2-31.2)
Cauda						
Stroma	23.2 (19.6-26.3)	23.2 (19.9-30.3)	29.7 (22.7-33.0)*	27.9 (20.5-32.7)	22.6 (20.5-28.1)	23.5 (19.0-31.1)
Epithelium	22.3 (19.5-24.4)	21.4 (18.3-25.9)	19.9 (17.4-23.6)	21.4 (18.1-30.9)	21.1 (19.4-26.3)	26.1 (20.3-32.5)
Lumen	54.7 (48.8-58.4)	53.2 (47.4-59.2)	50.5 (43.6-56.3)	49.4 (32.7-58.3)	52.9 (47.4-56.8)	49.4 (39.4-59.0)

Values expressed as median (Q1-Q3)

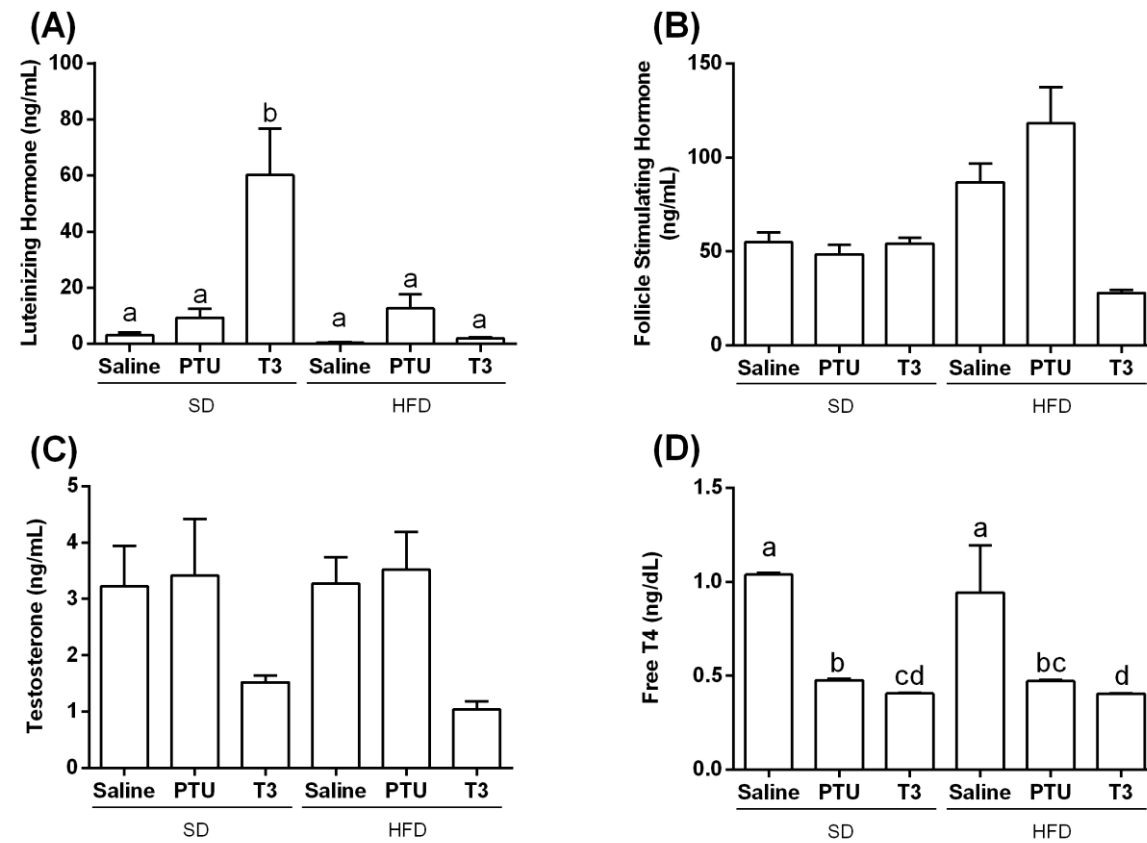
ANOVA 2-way with Tukey-Kramer post hoc test

\* Indicate groups that differ statistically from the other groups ( $p < 0.05$ )



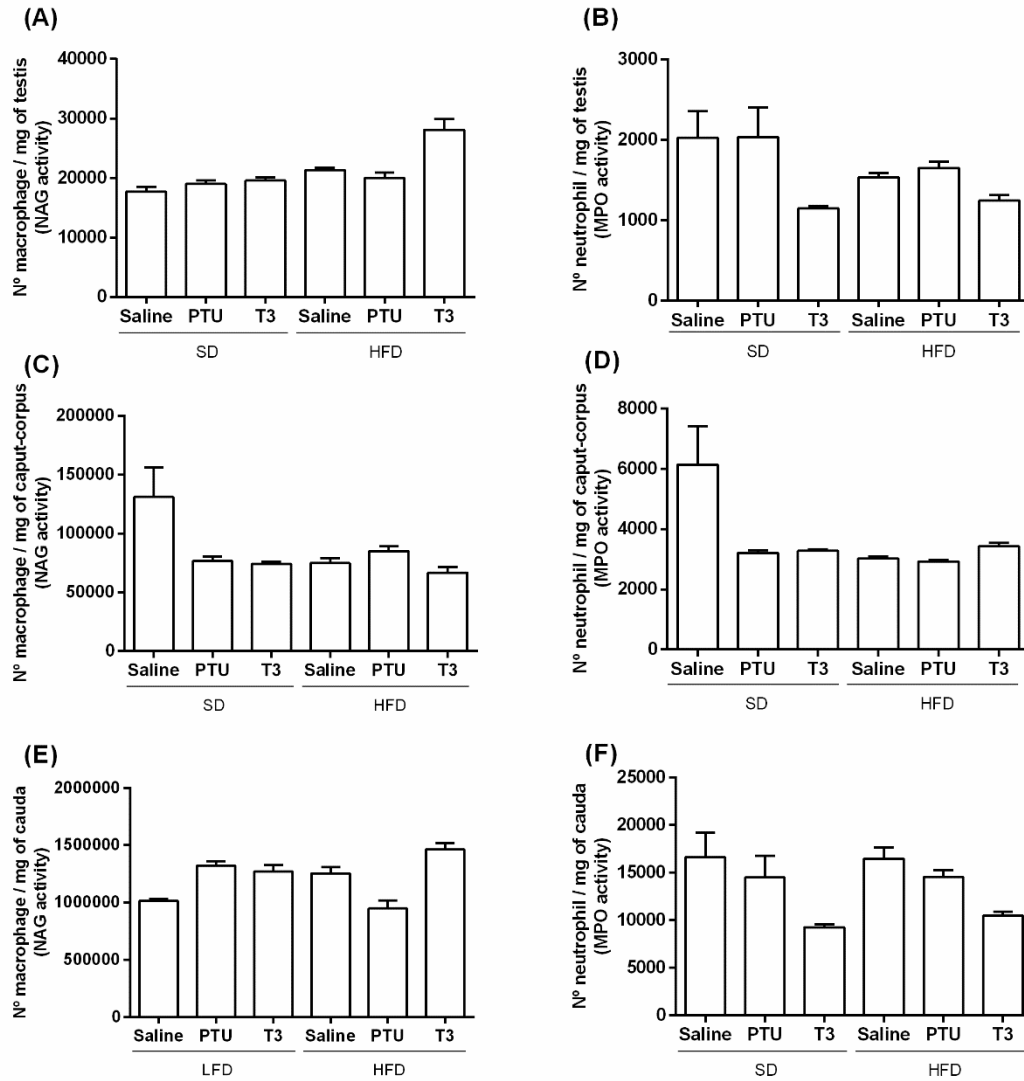
**Figure 1.** Experimental design of this study

*wks* = weeks; *PND* = post-natal days; *LFD* = low-fat diet; *HFD* = high-fat diet;  
*PTU* = propylthiouracil



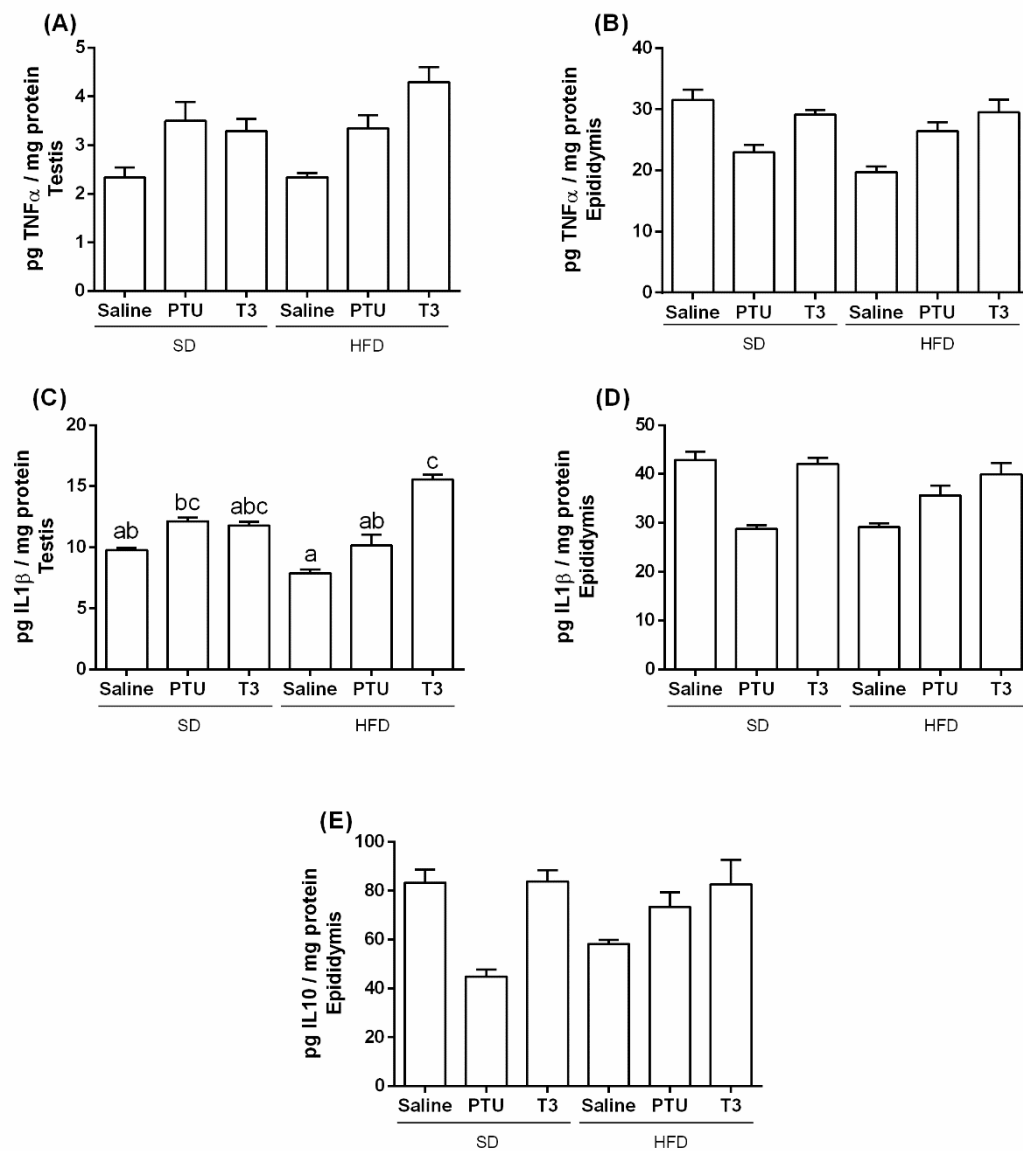
**Figure 2.** Luteinizing hormone (LH; A), follicle stimulating hormone (FSH; B), testosterone (C) and free T4 (D) concentrations.

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM; ANOVA 2-way test with Tukey *post hoc* test. <sup>a,b,c,d</sup> indicate groups that differ statistically from the other groups ( $p < 0.05$ ).



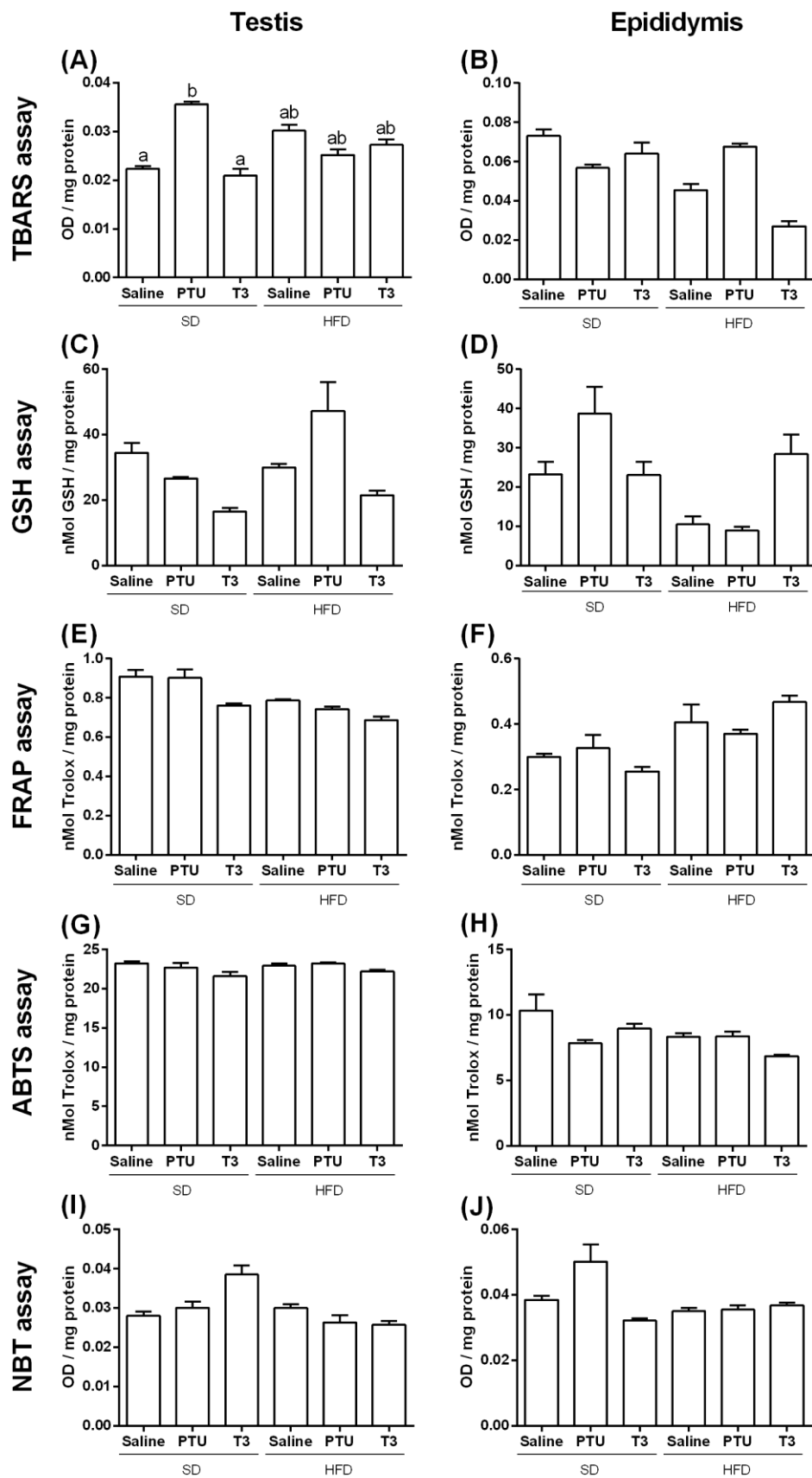
**Figure 3.** Number of macrophages (A, C, E) determined by NAG activity, and number of neutrophils (B, D, F) determined by MPO activity in the testis (A, B), caput-corporis (C, D) and cauda (E, F) epididymis regions.

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM; ANOVA 2-way test with Tukey *post hoc* test ( $p > 0.05$ ).



**Figure 4.** Concentration of TNF $\alpha$  (A, B), IL1 $\beta$  (C, D) and IL10 (E) in the testis (A, C) and the epididymis (B, D, E).

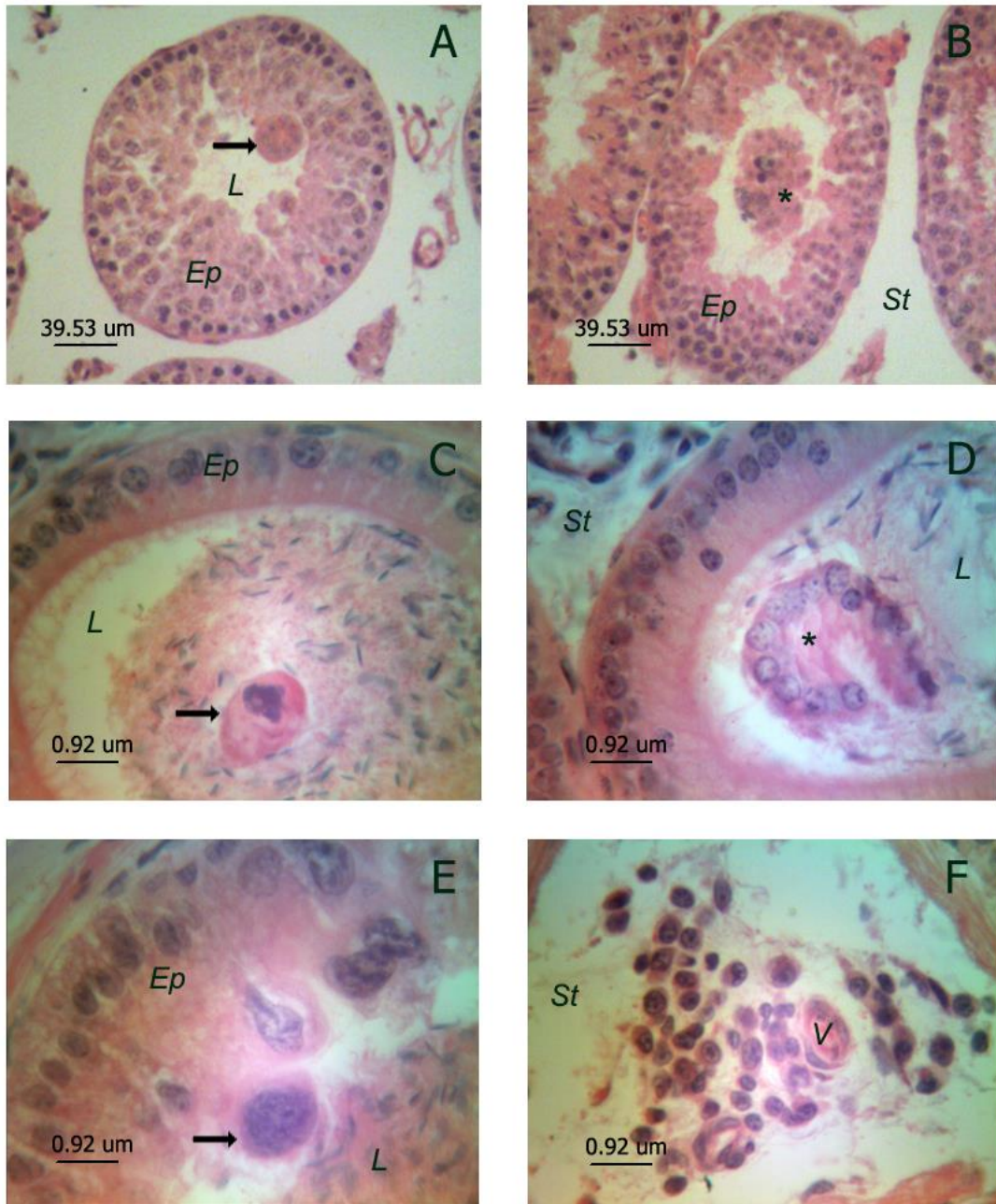
Data are expressed as mean  $\pm$  SEM; ANOVA 2-way test with Tukey *post hoc* test. <sup>a,b,c</sup> indicate groups that differ statistically from the other groups ( $p < 0.05$ ).



**Figure 5.** Oxidative stress with lipid peroxidation (A, B), glutathione (GSH) assay (C, D), total antioxidant capacity (E, F), antioxidant activity (G, H) and superoxide anion (I, J) in the testis (A, C, E, G and I), and in the epididymis (B, D, F, H and J).

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM; Kruskal-Wallis test with Dunn *post hoc* test (A, D, E and I). ANOVA 2-way test with Tukey *post hoc* test (B, C, F, G, H and J).

<sup>a,b</sup> indicate groups that differ statistically from the other groups ( $p < 0.05$ ).



**Figure 6.** Qualitative histopathological analysis of the testis (A, B), and in the epididymis caput (C, D) and cauda (E, F) regions.

(A) Presence of multinucleated cells (→) adhered to the internal border in the germinal epithelium of the seminiferous tubule in the HFD+T3 group; (B) presence of cells detached from the germinal epithelium (\*) in the lumen of the seminiferous tubule in the HFD+PTU group; (C) presence of immune cells (→) in the lumen of the caput region in the HFD+T3 group; (D) presence of cells detached from the epithelium (\*) in the lumen of the epididymal duct in the caput

region in the HFD+T3 group; (E) presence of multinucleated cells (→) in the cauda region in the LFD+PTU group; (F) presence of inflammatory infiltrate in the stromal compartment of the cauda region in the LFP+PTU group. *L* = lumen; *Ep* = epithelium; *St* = stroma; *V* = blood vas.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições experimentais do presente trabalho, concluímos que a obesidade associada ou não com o hipo ou hipertireoidismo, teve impacto negativo sobre a produção espermática e a estrutura do epitélio epididimário. Além disso, a condição de hipertireoidismo isolada mostrou causar um desbalanço no *feedback* regulatório entre os hormônios reprodutivos prejudicando a produção espermática adequada no testículo e o correto funcionamento da espermatogênese. Isto posto, a junção da obesidade com o hipertireoidismo mostrou maior prejuízo ao processo espermático com variações no perfil inflamatório, e o hipotireoidismo isolado, por sua vez, induziu maior peroxidação lipídica no tecido testicular. Este estudo mostra haver uma relação entre essas doenças.

## REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO DA INTRODUÇÃO

ATTIE, A. D.; SCHERER, P. E. Adipocyte metabolism and obesity. **Journal of Lipid Research**, v. 1, p. 395–399, 2009.

BAKOS, H. W. et al. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. **International Journal of Andrology**, v. 34, p. 402–410, 2011.

BARRIOS, B. et al. Immunocytochemical Localization and Biochemical Characterization of Two Seminal Plasma Proteins That Protect Ram Spermatozoa Against Cold Shock. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 4, p. 539–549, 2005.

BEDFORD, J. M. Male Reproductive System. In: HAMILTON, D. W.; GREEP, R. O. (Eds.). **Handbook of Physiology**. Washington DC: American Physiology Society, 1975. p. 303–318.

BIONDI, B. Thyroid and obesity: An intriguing relationship. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 8, p. 3614–3617, 2010.

BJERGVED, L. et al. Thyroid Function and Body Weight: A Community-Based Longitudinal Study. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93515, 11 abr. 2014.

BOELAERT, K.; FRANKLYN, J. A. Thyroid hormone in health and disease. **Journal of Endocrinology**, v. 187, p. 1–15, 2005.

BRASIL, P. **Obesidade atinge mais da metade da população brasileira, aponta estudo.** Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2013/08/obesidade-atinge-mais-da-metade-da-populacao-brasileira-aponta-estudo>>. Acesso em: 19 out. 2015.

BRAY, G. A. Medical Consequences of Obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2583–2589, 2014.

BRENT, G. A. Mechanisms of thyroid hormone action. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 9, p. 3035–3043, 2012.

BRENTA, G. et al. Clinical practice guidelines for the management of hypothyroidism. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, n. 4, p. 265–291, jun. 2013.

BRETON, S. et al. Postnatal development of H<sup>+</sup>ATPase (proton-pump)-rich cells in rat epididymis. **Histochem Cell Biol**, v. 111, p. 97–105, 1999.

CASTOLDI, A. et al. The Macrophage Switch in Obesity Development. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 1–11, 2016.

CHAVARRO, J. E. et al. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 7, p. 2222–2231, 2010.

CHIAO, Y.-C. et al. Direct effects of propylthiouracil on testosterone secretion in rat testicular interstitial cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 7, p. 1477–1482, ago. 2000.

CHOMARD, P. et al. Serum concentrations of total T4, T3, reverse T3 and free

T4, T3 in moderately obese patients. **Human nutrition. Clinical nutrition**, v. 39, n. 5, p. 371–378, set. 1985.

CHOUDHURY, S.; CHAINY, G. B. N.; MISHRO, M. M. Experimentally induced hypo- and hyper-thyroidism influence on the antioxidant defence system in adult rat testis. **Andrologia**, v. 35, n. 3, p. 131–140, 2003.

CHUGHTAI, B. et al. A neglected gland: a review of Cowper's gland. **International Journal of Andrology**, v. 28, p. 74–77, 2005.

CLEGG, E. D.; PERREAULT, S. D.; KLINEFELTER, G. R. Assessment of male reproductive toxicology. In: WALLACE, H. (Ed.). . **Principles and methods of toxicology**. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001. p. 1263–1299.

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiological reviews**, v. 52, n. 1, p. 198–236, 1972.

COSENTINO, M. J.; COCKETT, A. T. K. Structure and Function of the Epididymis. **Urological Research**, v. 14, p. 229–240, 1986.

COSTANZO, L. S. **Fisiologia**. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Elsevier, 2005.

DACHEUX, J.; DACHEUX, F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. **Reproduction**, v. 147, p. 27–42, 2014.

DAS, K.; CHAINY, G. B. N. Thyroid Hormone influences antioxidant defense system in adult rat brain. **Neurochemical Research**, v. 29, n. 9, p. 1755–1766, 2004.

DE VITO, P. et al. Thyroid hormones as modulators of immune activities at the cellular level. **Thyroid**, v. 21, p. 879–890, 2011.

DODSON, M. V et al. Obesity , Metabolic Syndrome , and Adipocytes. **Journal of Lipids**, v. May, p. 1–5, 2011.

ERDEMIR, F. et al. Efecto de la obesidad inducida por dieta en el tejido testicular y parámetros de estrés oxidativo en el suero. **Actas Urologicas Espanolas**, v. 36, n. 3, p. 153–159, 2012.

EZER, N.; ROBAIRE, B. Androgenic regulation of the Structure and Functions of the Epididymis. In: ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. (Eds.). . **The Epididymis: from Molecules to Clinical Practice**. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum, 2002. p. 279–316.

FEINSTEIN, R. et al. Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 35, p. 26055–26058, 1993.

FELDT-RASMUSSEN, U. Thyroid and leptin. **Thyroid : official journal of the American Thyroid Association**, v. 17, n. 5, p. 413–9, 2007.

FERNANDEZ, C. D. B. et al. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 9, n. 1, p. 32, 2011.

FERNÁNDEZ, V.; VIDELA, L. A. On the mechanism of thyroid hormone-induced

respiratory burst activity in rat polymorphonuclear leukocytes. **Free radical biology & medicine**, v. 19, n. 3, p. 359–63, set. 1995.

FOLEY, G. L. Overview of Male Reproductive Pathology. **Toxicology Pathology**, v. 29, n. 1, p. 49–63, 2001.

FORD, E. S. The metabolic syndrome and mortality from cardiovascular disease and all-causes: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey II Mortality Study. **Atherosclerosis**, v. 173, n. 2, p. 307–312, abr. 2004.

GARCIA, S. M. L.; FERNÁNDEZ, C. G. **Embriologia**. 3<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

GATTI, J.-L. et al. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 321–339, 2004.

GHANAYEM, B. I. et al. Diet-Induced Obesity in Male Mice Is Associated with Reduced Fertility and Potentiation of Acrylamide-Induced Reproductive Toxicity. **Biology of Reproduction**, v. 82, p. 96–104, 2010.

GREGORY, M.; CYR, D. G. The blood-epididymis barrier and inflammation. **Spermatogenesis**, v. 4, n. 2, p. 1–13, 2014.

GUAZZONE, V. A. et al. Cytokines and chemokines in testicular inflammation: A brief review. **Microscopy Research and Technique**, v. 72, n. 8, p. 620–628, 2009.

HALES, D. B. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, n. 1–2, p. 3–18, 2002.

HASCHEK, W.; ROUSSEAU, C. . Male reproductive system. In: HASCHEK, W.; ROUSSEAU, C. (Eds.). . **Fundamentals of toxicologic pathology**. San Diego, California: Academic Press, Inc., 1998. p. 443–484.

HEDGER, M. P.; MEINHARDT, A. Cytokines and the immune-testicular axis. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 58, p. 1–26, 2003.

HERMO, L.; ROBAIRE, B. Epididymal Cell Types and their Functions. In: ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. (Eds.). . **The Epididymis: from Molecules to Clinical Practice**. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum, 2002. p. 81–102.

HOFNY, E. R. M. et al. Semen parameters and hormonal profile in obese fertile and infertile males. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 2, p. 581–584, 2010.

HOLSBERGER, D. R.; COOKE, P. S. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. **Cell Tissue Res**, v. 322, p. 133–140, 2005.

HOLSBERGER, D. R.; KIESEWETTER, S. E.; COOKE, P. S. Regulation of Neonatal Sertoli Cell Development by Thyroid Hormone Receptor. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 396–403, 2005.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 1476–4687 (Electronic), p. 860–867, 2006.

HUH, K. et al. Role of the hepatic xanthine oxidase in thyroid dysfunction: effect of thyroid hormones in oxidative stress in rat liver. **Archives of pharmacal**

**research**, v. 21, n. 3, p. 236–40, jun. 1998.

IWASAKI, Y. et al. Effects of Hormones Targeting Nuclear Receptors on Transcriptional Regulation of the Growth Hormone Gene in the MtT / S Rat. **Neuroendocrinology**, v. 79, p. 229–236, 2004.

JOYCE, K. L.; PORCELLI, J.; COOKE, P. S. Neonatal goitrogen treatment increases adult testis size and sperm production in the mouse. **Journal of andrology**, v. 14, n. 6, p. 448–55, 1993.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KAUR, J. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. **Cardiology Research and Practice**, v. 2014, p. 1–21, 2014.

KEMPINAS, W. G.; KLINEFELTER, G. R. The epididymis as a target for toxicants. In: **Comprehensive Toxicology**. Oxford: Academic Press, Inc., 2010. p. 149–66.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular: uma Introdução à Patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier Ltd, 2008.

KIRBY, J. D. et al. Effects of transient prepubertal 6-N-propyl-2-thiouracil treatment on testis development and function in the domestic fowl. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 4, p. 910–6, out. 1996.

KNUDSEN, N. et al. Small Differences in Thyroid Function May Be Important for Body Mass Index and the Occurrence of Obesity in the Population. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 7, p. 4019–4024, jul. 2005.

KOMÁREK, V. et al. Synopsis of the organ anatomy. In: KRINKE, G. J. (Ed.). . **The laboratory rat – The Handbook of Experimental Rats**. London: Academic Press, Inc., 2000. p. 283–322.

KRASSAS, G. E.; PERROS, P. Thyroid disease and male reproductive function. **Journal of endocrinological investigation**, v. 26, n. 4, p. 372–80, abr. 2003.

KUMAR, A.; SHEKHAR, S.; DHOLE, B. Thyroid and male reproduction. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 18, n. 1, p. 23–32, 2014.

LEE, M.-J.; WU, Y.; FRIED, S. K. Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 13, n. 4, p. 371–376, 2010.

LEMOINE, A. Y.; LEDOUX, S.; LARGER, E. Adipose tissue angiogenesis in obesity. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 110, p. 661–669, 2013.

LONGHI, S.; RADETTI, G. Thyroid function and obesity. **JCRPE Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology**, v. 5, n. SUPPL.1, p. 40–44, 2013.

MAIA, A. L. et al. Hypothyroidism Affects Pulsatile LH Secretion in Pubertal Orchiectomized Rats. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 103, n. 4, p. 516–520, 25 jan. 1995.

MANN, T. Secretory Function of the Prostate, Seminal Vesicle and Other Male Accessory Organs of Reproduction. **J Reprod Fert**, v. 37, p. 179–188, 1972.

MENEGAZ, D. et al. Rapid responses to thyroxine in the testis: Active protein synthesis-independent pathway. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 246, p. 128–134, 2006.

MENENDEZ, C. et al. **TSH stimulates leptin secretion by a direct effect on adipocytes** *Journal of Endocrinology*, 2003.

MOSSADEGH-KELLER, N.; SIEWEKE, M. H. Testicular macrophages: Guardians of fertility. **Cellular Immunology**, n. November 2017, abr. 2018.

NAMMI, S. et al. Obesity : An overview on its current perspectives and treatment options. v. 2, p. 1–8, 2004.

NANNIPIERI, M. et al. Expression of thyrotropin and thyroid hormone receptors in adipose tissue of patients with morbid obesity and/or type 2 diabetes: effects of weight loss. **International Journal of Obesity**, v. 33, n. 9, p. 1001–1006, 28 set. 2009.

NOGUEIRAS, R. et al. Novel expression of resistin in rat testis : functional role and regulation by nutritional status and hormonal factors. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 3247–3257, 2004.

NORMAN, A. W.; LITWACK, G. Thyroid Hormones. In: NORMAN, A. W.; LITWACK, G. (Eds.). . **Hormones**. 2 edition ed. San Diego: Academic Press, Inc., 1997. p. 169–191.

OGE, A. et al. TSH influences serum leptin levels independent of thyroid hormones in hypothyroid and hyperthyroid patients. **Endocrine journal**, v. 52, n. 2, p. 213–7, 2005.

OPPENHEIMER, J. H.; SCHWARTZ, H. L.; SURKS, M. I. Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat: liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen, and testis. **Endocrinology**, v. 95, n. 3, p. 897–903, set. 1974.

ORGBIN-CHRIST, M. C.; DANZO, B. J.; DAVIES, J. Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. In: GREEP, R. O.; ASTWOOD, E. B. (Eds.). . **Handbook of Physiology**. volume 5 ed. Washington DC: American Physiology Society, 1975. p. 319–338.

ORTIGA-CARVALHO, T. M.; SIDHAYE, A. R.; WONDISFORD, F. E. Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 10, p. 582–591, 19 out. 2014.

PASQUALI, R. et al. Obesity and reproductive disorders in women. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 4, p. 359–372, 2003.

PASQUALI, R. Obesity , fat distribution and infertility. **Maturitas**, v. 54, p. 363–371, 2006.

PEROBELLI, J. E. **Morfofisiologia do Sistema Genital Masculino de Ratos Púberes e Adultos após Privação Androgênica durante a Pré-Puberdade**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2012.

PIETREMENT, C. et al. Distinct Expression Patterns of Different Subunit Isoforms of the V-ATPase in the Rat Epididymis. **Biology of Reproduction**, v.

74, p. 185–194, 2006.

RAFF, H.; LEVITZKY, M. G. **Fisiologia Médica**. 1ª ed. Porto Alegre: McGraw Hill Brasil, 2012.

RAMLAU-HANSEN, C. H. et al. Subfecundity in overweight and obese couples. **Human Reproduction**, v. 22, n. 6, p. 1634–1637, 2007.

REID, B. L.; CLELAND, K. W. The structure and Function of the Epididymis: The histology of the rat epididymis. **Australian Journal of Zoology**, v. 5, n. 3, p. 223–251, 1957.

REINEHR, T. **Obesity and thyroid function** **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2010.

REINEHR, T.; DE SOUSA, G.; ANDLER, W. Hyperthyrotropinemia in Obese Children Is Reversible after Weight Loss and Is Not Related to Lipids. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 8, p. 3088–3091, ago. 2006.

RIBEIRO, R. C. J. et al. The Molecular Biology of Thyroid Hormone Action. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 30, p. 366–389, 1995.

ROBAIRE, B.; HERMO, L. Efferent ducts, epididymis, and Vas deferens: structure, functions, and their regulation. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. (Eds.). . **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1988. p. 82.

ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. The epididymis. In: ZELEZNIK, A. J.; PLANT, T. M. (Eds.). . **Physiology of Reproduction**. Fourth edi ed. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 691–771.

ROBERTS, K. P. What are the components of male reproductive system? In: THE AMERICAN SOCIETY OF ANDROLOGY (Ed.). . **Handbook of Andrology**. 2 edition ed. Lawrence: Allen Press, 2010. p. 1–5.

ROSENBAUM, M. et al. Effects of changes in body weight on carbohydrate metabolism, catecholamine excretion, and thyroid function. **The American journal of clinical nutrition**, v. 71, n. 6, p. 1421–32, jun. 2000.

ROTTER, V.; NAGAEV, I.; SMITH, U. Interleukin-6 (IL-6) Induces Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes and Is, Like IL-8 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Overexpressed in Human Fat Cells from Insulin-resistant Subjects. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 46, p. 45777–45784, 2003.

RUSSELL, L. D. et al. Histological and histopathological evaluation of the testis. **International Journal of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 83, 1993.

RUWANPURA, S. M.; MCLACHLAN, R. I.; MEACHEM, S. J. Hormonal regulation of male germ cell development. **Journal of Endocrinology**, v. 205, p. 117–131, 2010.

SABOYA, P. P. et al. Metabolic syndrome and quality of life: a systematic review. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 24, n. e2848, p. 1–8, 2016.

SANTINI, F. et al. Acute exogenous TSH administration stimulates leptin secretion in vivo. **European Journal of Endocrinology**, v. 163, n. 1, p. 63–67, 2010.

SANYAL, D.; RAYCHAUDHURI, M. Hypothyroidism and obesity: An intriguing link. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 20, n. 4, p. 554, 2016.

SAÚDE, M. DA; CRUZ, F. O. Pesquisa nacional de saúde : 2013 : percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas : Brasil, grandes regiões e unidades da federação. **IBGE**, p. 181, 2014.

SBEM, S. B. DE E. E M. **Hipertireoidismo e Hipotireoidismo**. Disponível em: <<https://www.endocrino.org.br/hipertireoidismo-e-hipotireoidismo/>>.

SHARMA, R.; AGARWAL, A. Spermatogenesis : An Overview. In: ZINI, A.; AGARWAL, A. (Eds.). . **Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**. Cleveland, USA: Springer Science+Business Media, 2013. p. 19–44.

SHARPE, R. M. Declining sperm counts in men - is there an endocrine cause? **Journal of Endocrinology**, v. 136, p. 357–360, 1993.

SHINOHARA, R. et al. Lipid peroxidation levels in rat cardiac muscle are affected by age and thyroid status. **The Journal of endocrinology**, v. 164, n. 1, p. 97–102, 2000.

SHIVARAJ, G. et al. Thyroid function tests: a review. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 13, n. 5, p. 341–349, 2009.

SILVA, D. et al. Propylthiouracil-induced hypothyroidism delays apoptosis during the first wave of spermatogenesis. **Biological Research**, v. 44, n. 2, p. 181–188, 2011a.

SILVA, F. R. M. B. et al. Effect of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of the rat testis. **Life Sciences**, v. 69, p. 977–986, 2001.

SILVA, F. R. M. B.; LEITE, L. D.; WASSERMANN, G. F. Rapid signal transduction in Sertoli cells. **European Journal of Endocrinology**, v. 147, p. 425–433, 2002.

SILVA, A. S. DA et al. Principais distúrbios tireoidianos e suas abordagens na atenção primária à saúde. **Revista da AMRIGS**, v. 55, n. 4, p. 380–388, 2011b.

SMITH, L. B.; WALKER, W. H. Testis Hormone Signaling. In: ZELEZNIK, A. J.; PLANT, T. M. (Eds.). . **Physiology of Reproduction**. Fourth edit ed. [s.l.] Elsevier Inc, 2015. p. 637–690.

SPEK, A. H. VAN DER; FLIERS, E.; BOELEN, A. Thyroid hormone metabolism in innate immune cells. **Journal of Endocrinology**, v. 232, n. 2, p. R67–R81, 2017.

SPICER, L. J. Leptin : a possible metabolic signal affecting reproduction. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 21, p. 251–270, 2001.

SRIKANTHAN, K. et al. Systematic Review of Metabolic Syndrome Biomarkers: A Panel for Early Detection, Management, and Risk Stratification in the West Virginian Population. **International Journal of Medical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 25–38, 2016.

TAKASHIBA, K. S. et al. Morfologia testicular de ratos Wistar obesos sedentários

e submetidos a treinamento físico. **Acta Scientiarum - Health Sciences**, v. 33, n. 1, p. 25–33, 2011.

TERADA, N. et al. Involvement of a membrane skeletal protein, 4.1G, for Sertoli/germ cell interaction. **Reproduction**, v. 139, p. 883–892, 2010.

TUNG, K. S. K.; FUSI, F.; TEUSCHER, C. Autoimmune disease of spermatozoa, ovary and testis. In: THEOFILOPOULOS, A. N.; BOMA, A. C. (Eds.). . **The molecular pathology of autoimmune diseases**. Second ed. USA: Routledge, 2002. p. 1031–1045.

VENDITTI, P.; DI MEO, S. Thyroid hormone-induced oxidative stress. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 4, p. 414–434, 2006.

VIANNA, C. R.; COPPARI, R. A Treasure Trove of Hypothalamic Neurocircuitries Governing Body Weight Homeostasis. **Endocrinology**, v. 152, n. 1, p. 11–18, 2011.

VIDELA, L. A. et al. Zymosan-induced luminol-amplified chemiluminescence of whole blood phagocytes in experimental and human hyperthyroidism. **Free radical biology & medicine**, v. 14, n. 6, p. 669–75, jun. 1993.

VIGUERAS-VILLASEÑOR, R. M. et al. Alterations in the spermatic function generated by obesity in rats. **Acta Histochemica**, v. 113, n. 2, p. 214–220, fev. 2011.

VOLPATO, K. C. et al. Involvement of K<sup>+</sup> channels and calcium-dependent pathways in the action of T3 on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of immature rat testis. **Life Sciences**, v. 74, p. 1277–1288, 2004.

WALKER, W. H. Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. **Spermatogenesis**, v. 1, n. 2, p. 116–120, 2011.

WHO, W. H. O. Obesity: preventing and managing the global epidemic. **WHO Library Cataloguing**, p. 252, 2000a.

WHO, W. H. O. Diagnosis and Monitoring of Diseases of the Thyroid. **WHO Library Cataloguing**, p. 1–20, 2000b.

WHO, W. H. O. Global Status Report on noncommunicable diseases. **WHO Library Cataloguing**, p. 302, 2014.

YANG, Y.; GORDON, C. J. Regulated hypothermia in the hypothyroid rat induced by administration of propylthiouracil. **Am J Physiol**, v. 272, n. 5 Pt 2, p. R1390–5, 1997.

YEN, P. M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. **Physiological reviews**, v. 81, n. 3, p. 1097–142, jul. 2001.

ZIMMERMANN-BELSING, T. et al. **Circulating leptin and thyroid dysfunction** *European Journal of Endocrinology*, 2003.

ZOELLER, R. T.; CROFTON, K. M. Mode of action: Developmental thyroid hormone insufficiency - Neurological abnormalities resulting from exposure to propylthiouracil. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 35, n. 8–9, p. 771–781, 2005.