



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Verônica Aiceles de Medeiros Pinto

**O hipotireoidismo congênito transitório programa redução de
hormônios tireoidianos, hiperleptinemia e hipogonadismo na vida
adulta de ratos wistar machos**

Rio de Janeiro

2015

Verônica Aiceles de Medeiros Pinto

O hipotireoidismo congênito transitório programa redução de hormônios tireoidianos, hiperleptinemia e hipogonadismo na vida adulta de ratos wistar machos

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Cristiane da Fonte Ramos

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

P659 Pinto, Verônica Aiceles de Medeiros.

O hipotireoidismo congênito transitório programa redução de hormônios tireoidianos, hiperleptinemia e hipogonadismo na vida adulta de ratos wistar machos / Verônica Aiceles de Medeiros Pinto. – 2015.

78 f.

Orientadora: Cristiane da Fonte Ramos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Hipotireoidismo - Teses. 2. Leptina - Teses. 3. Tireóide - Teses. 4. Testículo – Teses. 5. Epidídimo. I. Ramos, Cristiane da Fonte. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.441-008.64

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Verônica Aiceles de Medeiros Pinto

**O hipotireoidismo congênito transitório programa redução de hormônios
tireoidianos, hiperleptinemia e hipogonadismo na vida adulta de ratos
wistarmachos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 31 de julho de 2015.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Cristiane da Fonte Ramos (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Elaine de Oliveira

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Rejane Maira Goes

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

A minha mãe Marize, pela sua determinação na vida me estimular a ser melhor a cada dia e me motivar a querer ir mais além, acreditando que é possível.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, por todos os dias me motivar, apoiar e acreditar que eu fosse capaz. Cada gesto de carinho, cada “marmitta” adiantada, roupa lavada e compreensão das minhas ausências e impaciência, foram fundamentais. Você é a chave de todo o resto ocorrer.

À minha orientadora, Professora Doutora Cristiane da Fonte Ramos, por confiar no meu trabalho, dividir seus conhecimentos comigo nesses últimos anos e não medir esforços para o êxito e finalização desta pesquisa.

Ao Professor Doutor Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda e à Professora Doutora Márcia Barbosa Águila Mandarin-de-Lacerda pelo brilhante trabalho em contribuição à pesquisa e organização da pós graduação.

À doutoranda Flávia Gombar, por ter compartilhado desses dois anos de desafios comigo. Pelas semanas, e principalmente, pelos fins de semana e feriados, em que estávamos juntas trabalhando. Pelos áudios, e-mails, milhões de planilhas... Sua ajuda fez toda a diferença para a realização e conclusão desta etapa.

Aos amigos Francielle Graus, Helder Gonçalves e Thatiany Marinho pela disponibilidade em me auxiliar das menores às maiores tarefas diárias. Pelo apoio, incentivo, carinho, broncas. Pelos prazos estabelecidos, pelas companhias e esperas do “Coesa”, pelas gordices quase que diárias, por todos os dias garantirem o sorriso e a leveza e por permitirem que tudo isso se estenda além do trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de morfometria, metabolismo e doença cardiovascular, pelo dia-a-dia de trabalho e pela forma que me acolhem e apoiam.

Aos Laboratórios de ciências Radiológicas, de cirurgia experimental, de microbiologia da UFRJ, de endócrino do HUPE e ao bioterista Claudio Laupela ajuda em diferentes momentos, indispensáveis para a obtenção dos resultados.

Às minhas 7 escudeiras, por fazerem todo o possível para me ajudar a concluir as tarefas propostas, por me lembrarem diariamente que é possível se houver persistência e por me permitirem continuar sonhando com o futuro.

À Fernanda Cavalcante, Gabriel Ramalho e Mariana Manhães por serem os amigos que todo mundo devia ter. Pelo amor e cuidado, pelo ombro oferecido nesses anos, pelas palavras ditas ainda que no silêncio, por acreditarem mais do que eu

mesma, por compreenderem cada momento vivido e se fazerem presentes, mesmo nas minhas maiores ausências.

À Capes, pela bolsa concedida nos dois anos do mestrado.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.

Marthin Luther King

RESUMO

PINTO, Verônica Aiceles de Medeiros. *O hipotireoidismo congênito transitório programa redução de hormônios tireoidianos, hiperleptinemia e hipogonadismo na vida adulta de ratos wistar machos*. 2015. 78f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

É sabido que além de gonadotropinas e testosterona, outros hormônios, como leptina e hormônios tireoidianos (HT) são importantes para o controle do sistema reprodutivo masculino. Distúrbios no status endócrino durante o período de vida neonatal podem afetar a susceptibilidade a doenças crônicas na vida adulta. Neste estudo utilizamos o hipotireoidismo congênito (HC) como modelo para estudar a influência do hipotireoidismo na função testicular e sua relação com a leptina, e objetivamos avaliar se ratos adultos com HC apresentam mudanças nos parâmetros de fertilidade (número de espermatozoides, morfologia, viabilidade espermática e produção espermática diária pelos testículos, e o tempo de trânsito espermático no epidídimo) e nas concentrações séricas de leptina, testosterona, tiroxina (T4), triiodotironina (T3), hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). Nove ratas gestantes foram divididas em três grupos de acordo com o tempo de administração da droga antitireoidiana. Grupo G: livre acesso à água contendo 0,03% de metimazol (MMI) do dia 9 de gestação até o dia do parto (D0); grupo GL: livre acesso à água contendo 0,03% de MMI do dia 9 de gestação ao dia 8 de lactação e grupo C: livre acesso à água sem MMI durante todo o experimento. Após a lactação os filhotes machos (n=8) tiveram livre acesso à água e a ração comercial e foram mantidos em grupos de até três animais por caixa até os 90 dias de idade quando foram mortos por inalação de CO₂. Os animais submetidos ao HC apresentaram na vida adulta em relação ao grupo Controle nas concentrações de T3 livre (G=10,79% e GL=31,16% p=0,0005), T4 livre (G=18,69% e GL=20,57%, p=0,0200), LH (G=10,65% e GL=41,28%, p=0,0103), FSH (G=34,24% e GL=44,51%, p=0,0033) e testosterona (G=57,1% e GL=71,17%, p=0,0053) enquanto os níveis séricos de leptina foram aumentados (G=17,40% e GL=24,40%, p=0,0093). Foi observada redução na expressão proteica da StAR (G=27,03% e GL=22,73%, p=0,0111) e do receptor de leptina no testículo (G=50,79% e GL=52,92%, p=0,0169), embora este tenha sido aumentado no epidídimo (G=37,90% e GL=40,60%, p=0,0011). CH resultou ainda em redução na produção espermática diária (G=38,77% e GL=45,03%, p=0,0178), número de espermátides no testículo (G=43,17% e GL=48,97%, p=0,0042), de espermatozoides na cauda do epidídimo (G=29,28% e GL=42,02%, p=0,0320) e na viabilidade espermática (G=11,94% e GL=9,61%, p=0,0031). Não foram observadas diferenças estatísticas no tempo de trânsito na morfologia dos espermatozoides. Em síntese, nossos resultados mostram que o CH programou a função tireoidiana, desencadeou um quadro de hiperleptinemia e a redução na concentração de FSH e LH dos animais adultos. Portanto, os animais apresentam uma condição de hipotireoidismo congênito na vida adulta associada a uma redução na esteroidogênese e altos níveis de leptina sérica que culminam em alteração do potencial de fertilidade.

Palavras-chaves: Hipotireoidismo congênito. Fertilidade. Leptina. Hormônio tireoidiano. Testículo. Epidídimo.

ABSTRACT

PINTO, Verônica Aiceles de Medeiros. *The transient congenital hypothyroidism program reduction of thyroid hormones, hyperleptinemia and hypogonadism in adulthood of male Wistar rats*. 2015. 78f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

It is known that addition gonadotropins and testosterone, other hormones are also important to control the reproductive system. Evidences support a pivotal role for both leptin and thyroid hormones (TH) in reproduction. Knowing that disturbances in endocrine status during the neonatal period of life may affect the susceptibility to chronic diseases in adulthood, in this study we used the congenital-neonatal hypothyroidism (CH) as an experimental model to study the influence of hypothyroidism on the adult testicular function and its relation with leptin. So, the aim of this study was to evaluate if adult rats with congenital-neonatal hypothyroidism presented changes in fertility parameters (sperm number, sperm morphology and viability, daily sperm production per testis, and transit time in the epididymis) and in the serum levels of leptin, testosterone, thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3), follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH). Nine pregnant rats were divided in 3 groups according to the time they received the drug. Group G: free access to water containing 0.03% methimazole (MMI) from day 9 until parturition (D0); group GL: free access to water containing 0.03% MMI from day 9 until 8 days (D8) after parturition and group C: free access to water containing no MMI during all the experimental time. After weaning all male pups (n=8) had free access to pelleted rodent chow and tap water and maintained in groups of up to three/cage until 90 days of age when they were killed by CO₂ inhalation. In the adulthood, animals submitted to congenital hypothyroidism presented in relation to C group low levels of T3 (G=10.79% e GL=31.16% p=0.0005), T4 (G=18.69% e GL=20.57%, p=0.0200), LH (G=10.65% e GL=41.28%, p=0.0103), FSH (G=34.24% e GL=44.51%, p=0.0033) and testosterone (G=57.10% e GL=71.17%, p=0.0053) while leptin serum levels (G=17.40% e GL=24.40%, p=0.0093) were high. StAR expression (G=27.03% e GL=22.73%, p=0.0111) and leptin receptors expression in the testis (G=50.79% e GL=52.92%, p=0.0169) was reduced, although it was increased in the epididymis (G=37.90% e GL=40.60%, p=0.0011). Congenital hypothyroidism resulted in a decrease in daily sperm production (G=38.77% e GL=45.03%, p=0.0178), number of spermatid in testis (G=43.17% e GL=48.97%, p=0.0042) and spermatozoa in epididymis cauda (G=29.28% e GL=42.02%, p=p=0.0320) and in the sperm viability (G=11.94% e GL=9.61%, p<0.0031). No statistical difference was seen in the sperm transit time and morphology. In summary, the results reported herein show that congenital hypothyroidism programmed the thyroid function, synthesis and secretion of leptin by adipose tissue and LH secretion by pituitary in the adult animals. Therefore, the animals presented a hypothyroidism condition in adult life associated with reduced steroidogenesis, high leptin serum levels and altered fertility.

Keywords: Congenital hypothyroidism. Fertility. Leptin. Thyroid hormone. Testis. Epididymis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Principais núcleos hipotalâmicos.....	17
Figura 2 –	Ilustração de uma secção de túbulo seminífero, contendo as células da linhagem espermatogênica, células de Sertoli, camada de células mióides, conjuntivo, vasos sanguíneos e células intersticiais.....	19
Figura 3 –	Esquema representativo da regulação por mecanismo de <i>feedback</i> negativo do eixo hipotálamo-hipófise-testículo.....	21
Figura 4 –	Esquema representativo do mecanismo de síntese e secreção dos hormônios tireoidianos, dependente do iodo, pelas células foliculares da tireoide.....	23
Figura 5 –	Ação central da leptina no balanço energético.....	27
Figura 6 –	Isoformas do receptor de leptina.....	28
Figura 7 –	Representação esquemática da natureza pleiotrópica da leptina.....	29
Figura 8 –	Grade da câmara de <i>Neubauer</i> com os quatro quadrantes utilizados na contagem dos espermatozoides marcados em vermelho.....	37
Tabela 1 –	Tabela de anticorpos primários e secundários utilizados na técnica de western blot.....	40
Tabela 2 –	Concentrações séricas hormonais das progenitoras e da prole dos grupos controle (C), gestação (G) e gestação + lactação (GL) nos dias 0 e 8 de lactação.....	42
Figura 9 –	Evolução da massa corporal (g) do dia 1-21 (A) e do comprimento linear do dia 1-21 (B) dos animais do grupo controle (C), gestação (G) e gestação + lactação (GL).....	43
Figura 10 –	Evolução da massa corporal (g) do dia 22-90 (A), comprimento linear do dia 22-90 (B); ingestão alimentar do dia 22-90 (B) e percentual de ganho de peso (D) dos animais do grupo controle (C), gestação (G) e gestação + lactação (GL).....	44
Figura 11 –	Peso testicular (A), epididimário (B) e da gordura	

	epididimária(C) dos animais do grupo controle (C), gestação (G) e gestação + lactação (GL) aos 90 dias de idade.....	45
Figura 12 –	Concentrações séricas de TSH (A), T3 livre (B) e T4 livre (C) dos animais do grupo controle (C), gestação (G) e gestação + lactação (GL) aos 90 dias de idade.....	46
Figura 13 –	Concentrações séricas de FSH (A), LH (B), testosterona (C) e leptina (D) dos animais do grupo controle (C), gestação (G) e gestação + lactação (GL) aos 90 dias de idade.....	47
Figura 14 –	Expressão proteica de OBR (A), de StAR (B) no testículo, de OBR na cauda do epidídimo (C) e bandas representativas das marcações pela técnica de <i>western blot</i> (D), dos animais do grupo controle (C), gestação (G) e gestação + lactação (GL) dos animais aos 90 dias de idade.....	48
Figura 15 –	Número de espermátides testiculares (A), Produção espermática diária (B), número de espermatozoides na cauda do epidídimo (C), tempo de trânsito espermático (D), Morfologia (E) e Viabilidade dos espermatozoides (F) dos animais do grupo controle (C), gestação (G) e gestação + lactação (GL) aos 90 dias de idade.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgRP	Peptídeo relacionado ao gene agouti
AR	Receptor de androgênio
ARC	Núcleo hipotalâmico arqueado
FIII	Domínio fibronectina tipo III
MIT	Resíduos monoiodinados
DIT	Resíduos diiodinados
TRH	Hormônio liberador de tireotropina
D1	Desiodase tipo 1
D2	Desiodase tipo 2
D3	Desiodase tipo 3
GSTs	Transportadores aniônicos específicos
MCT	Transportador celular de membrana
Oatp1c1	Transportador polipeptídico para ânions orgânicos 1c1
DHT	Dihidrotestosterona
SHBG	Globulina Carreadora de Hormônios Sexuais
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina bovina sérica
C	Controle
CART	Fator de transcrição cocaína-anfetamina dependente
CR	Receptor de citocinas
DIT	Diiidotironina
DSP	Produção espermática diária
ELISA	Ensaio de imuno-absorção enzimática
ERT	elementos responsivos do hormônio tireoidiano
FSH	Hormônio folículo estimulante
G	Gestação
GL	Gestação + Lactação
GnRH	Hormônio liberador de gonadotropinas
HCG	Gonadotrofina coriônica humana
HPB	Hiperplasia prostática benigna
HT	Hormônio tireoidiano

IMC	Índice de massa corporal
LH	Hormônio luteinizante
MIT	Monoiodotironina
MMI	Metimazol
MSH α	Peptídeo de melanocortina α
NPY	Neuropeptídeo Y
OBR	Receptor de leptina
OBRa	Receptor de leptina isoforma a
OBRb	Receptor de leptina isoforma b
OBRc	Receptor de leptina isoforma c
OBRd	Receptor de leptina isoforma d
OBRe	Receptor de leptina isoforma e
OBRf	Receptor de leptina isoforma f
OMS	Organização mundial da saúde
POMC	Pró-opiomelanocortina
PTU	Propiltiouracil
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RPM	Rotações por minuto
RPS	Tampão fosfato de Ringer
SDS	Dodecil sulfato de sódio
StAR	Proteína reguladora da esteroidogênese ativa
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TR	Receptor nuclear de hormônio tireoidiano
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
TR α	Receptor nuclear de hormônio tireoidiano isoforma α
TR β	Receptor nuclear de hormônio tireoidiano isoforma β
TSH	Hormônio estimulante da tireóide

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	Micrômetro
μg	Micrograma
mg	Miligrama
g	Gramma
Kg	Quilograma
μL	Microlitro
mL	Mililitro
pg	Picograma
$\%$	Porcentagem
\pm	Mais ou menos
β	Beta
α	Alfa
$<$	menor
$>$	maior
$=$	igual

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1	O hipotálamo	17
1.2	Função testicular e epididimária	19
1.3	Hormônios tireoidianos	22
1.3.1	<u>Hormônios tireoidianos e a função testicular</u>	25
1.4	Leptina	26
1.4.1	<u>Leptina e isoformas dos receptores</u>	28
1.4.2	<u>Leptina no sistema reprodutor</u>	29
1.5	Interação Leptina e hormônio tireoidiano	31
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivos gerais	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Desenho experimental	34
3.2	Obtenção dos espermatozoides totais	36
3.3	Contagem dos espermatozoides totais	36
3.4	Produção espermática diária (DSP) e tempo de trânsito	38
3.5	Viabilidade	38
3.6	Morfologia	38
3.7	Determinação das concentrações séricas hormonais	39
3.8	Western Blot	39
3.9	Análise estatística	40
4	RESULTADOS	42
5	DISCUSSÃO	51
	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59
	ANEXO- Comitê de ética em pesquisa	77

INTRODUÇÃO

Definida clinicamente pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como ausência de concepção após um ano de relações sexuais regulares sem o uso de métodos contraceptivos, a infertilidade apresenta aumento da taxa de prevalência nas últimas décadas (1). Estudos epidemiológicos apontam que 8-12% dos casais nas diferentes sociedades são inférteis¹ e apesar de não encontrarmos dados epidemiológicos exclusivos da população brasileira, autores afirmam que cerca de 20-30% dos casais nos grandes centros urbanos brasileiros apresentam algum problema para engravidar (2). A infertilidade conjugal pode ser ocasionada por ambos os sexos, individual ou simultaneamente. A infertilidade por causas masculinas está associada a patologias que podem ter causas genéticas diversas (3), criptorquia (4), falência na produção de gonadotrofinas hipofisárias ou testosterona (hipogonadismo), dentre outras (5, 6).

A deficiência de hormônio tireoidiano (HT), denominada hipotireoidismo, recentemente reconhecida como importante causa de infertilidade em humanos e outros mamíferos (7-9), é uma patologia caracterizada por redução da taxa metabólica e consequente redução do gasto energético e temperatura corporal (10). O hipotireoidismo durante o período fetal constitui o distúrbio endócrino congênito mais frequente, com incidência de 1:1660 nascidos vivos (11). Apresenta cerca de 20% dos casos assintomáticos ao nascimento, evidenciando a importância para seu diagnóstico da realização do teste do pezinho em todos os recém-nascidos nas primeiras 48 horas de vida.

O tratamento consiste na reposição dos hormônios tireoidianos deficitários e deverá perdurar até o restabelecimento da função tireoidiana normal, ou por toda a vida, quando esse não ocorre livremente. Se não tratados precocemente, os neonatos portadores de hipotireoidismo congênito apresentam sério

¹ World Health Organization. Infertility: A tabulation of available data on the prevalence of primary and secondary infertility. Programme on maternal and child health and family planning. Division of family health. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/59769/1/WHO_MCH_91.9.pdf?ua=1>. Acesso em: 02 de junho de 2015.

comprometimento do crescimento e desenvolvimento mental, dentre uma série de outros sintomas (12, 13).

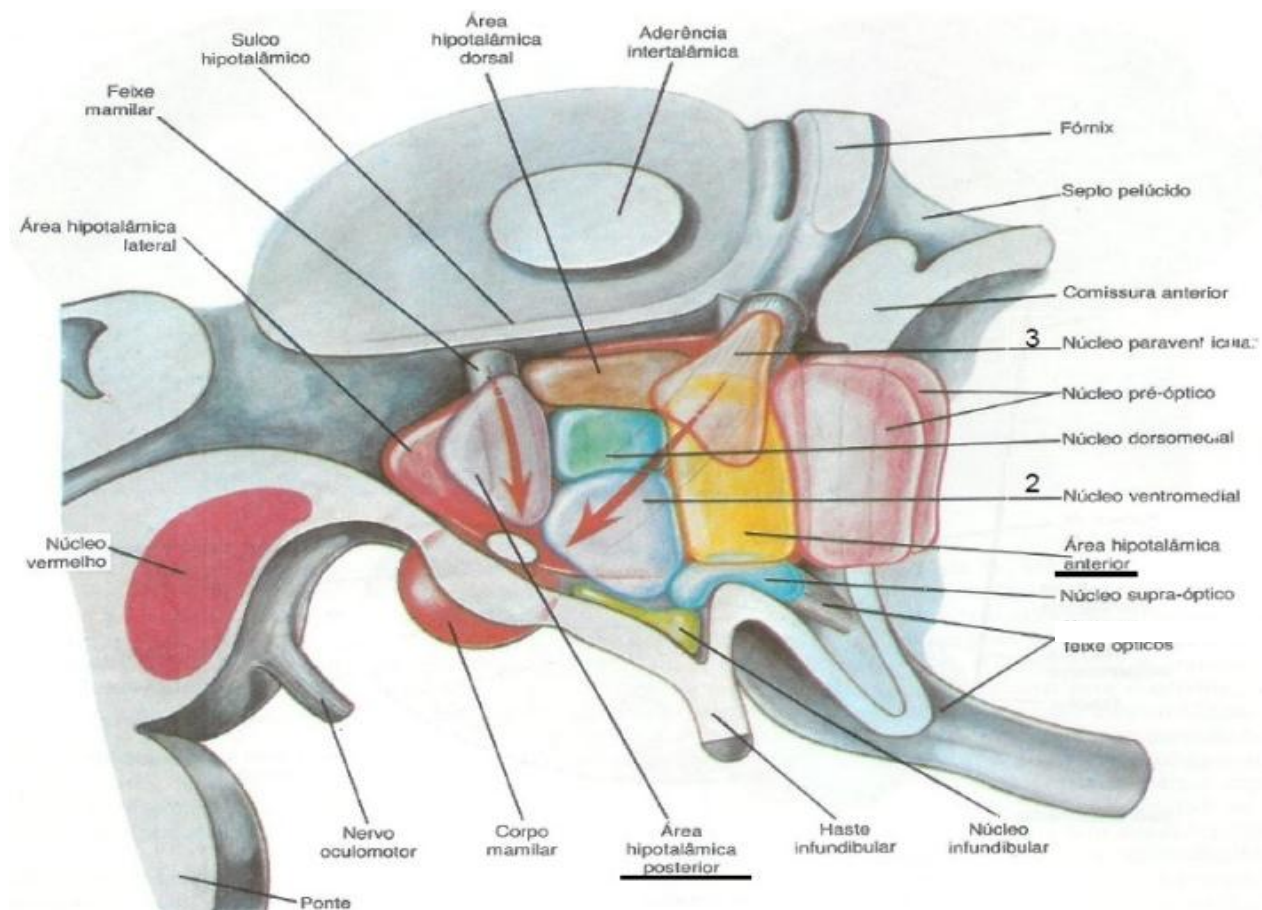
A leptina, considerada o principal hormônio responsável pela manutenção do balanço energético e peso corporal e que também é requerida para um processo reprodutivo normal (14), tem sido associada às alterações metabólicas decorrentes do hipo e hipertireoidismo. Nessas disfunções do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide são observadas inúmeras alterações como no ganho de peso, associadas à ação dos HT sobre a taxa metabólica basal, o gasto energético e o apetite (Aysin Oge 2005) e mais recentemente no sistema reprodutivo (15). Entretanto ainda não se sabe completamente como a leptina e os HT interagem, principalmente a nível de sistema reprodutor, ou como a desregulação no eixo pode afetar e/ou ser afetado pela leptina. Neste trabalho, objetivamos demonstrar se o hipotireoidismo congênito transitório programa os parâmetros reprodutivos e a expressão proteica da leptina no testículo e na cauda do epidídimo da prole machos na vida adulta.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 O hipotálamo

O hipotálamo é o principal integrador das funções viscerais e límbicas, funcionando como elo entre o sistema nervoso e o sistema endócrino. Constitui parte do diencefalo que por sua vez forma a região encefálica central. Está localizado ventralmente ao sulco hipotalâmico e forma o assoalho do terceiro ventrículo. O fórnice divide o hipotálamo em zona lateral e medial que se diferencia pela maior intensidade de mielina na zona lateral. A zona medial é constituída pela substância cinzenta, formada por um aglomerado de núcleos com funções fisiológicas específicas, organizados rostrocaudalmente em quatro grupos: pré-óptico, supraquiasmático, tuberal e mamilar (16) (figura 1).

Figura 1 - Principais núcleos hipotalâmicos



Fonte: Haymaker W, 1969 (17).

No núcleo pré-óptico estão dispostos os neurônios responsáveis pela síntese do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) (18). Já a área tuberal, maior e mais bem delimitada região hipotalâmica, é composta por três diferentes grupamentos nucleares: ventromedial, dorsomedial e arqueado (ARC). Ao núcleo ventromedial, constituído por pequenos neurônios, credita-se a existência de um centro responsável pelo controle da saciedade (19). No ARC são encontrados os neurônios orexígenos e anorexígenos, responsáveis pelo estímulo e inibição da ingestão alimentar respectivamente, sendo este núcleo o principal alvo de ação da leptina na supressão da ingestão alimentar (20, 21).

O hipotálamo recebe estímulos oriundos de diversas regiões do sistema nervoso e faz conexão com outras estruturas anatômicas, que confere a ele a diversidade de ações que pode desempenhar no organismo. Dentre estas, destacamos a conexão realizada com a hipófise anterior, que constitui a via hipotálamo-hipofisária, de grande importância na regulação da função endócrina e reprodutiva (22).

A função sexual masculina é majoritariamente controlada pela via hipotálamo-hipofisária. Tem seu início com a secreção de GnRH, um peptídeo composto por 10 aminoácidos e sintetizado pelos neurônios que possuem os corpos celulares localizados no núcleo pré óptico hipotalâmico e suas terminações na eminência mediana do hipotálamo, onde o hormônio será liberado (23, 24). Através do sistema vascular porta hipotalâmico-hipofisário, o GnRH será transportado até a hipófise anterior, onde vai agir sobre os gonadotropos, estimulando a secreção das gonadotropinas, denominadas: hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH). Na reprodução masculina, especificamente nos testículos, FSH age nas células de Sertoli estimulando o processo da espermatogênese enquanto LH funciona como sinal primário para a síntese de testosterona nas células de *Leydig* (25).

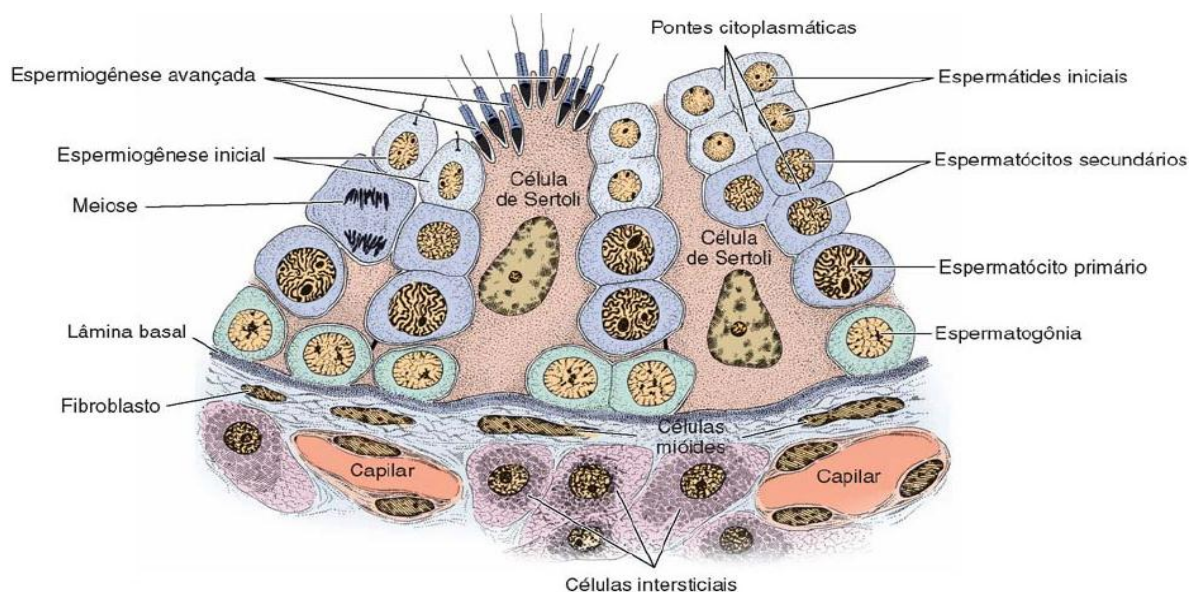
A secreção dos hormônios reguladores da função sexual é cíclica, controlados pela liberação pulsátil de GnRH em intervalos de 1 a 3 horas, que culmina em uma liberação semelhante das gonatropinas pela hipófise. Esta regulação é importante para manter a secreção de FSH e LH constante, já que a liberação desses hormônios seria reduzida em caso de continuidade de estímulo do GnRH sobre os gonadotropos (26).

1.2 Função testicular e epididimária

O testículo desempenha funções endócrinas e exócrinas que apresentam como eventos principais a síntese de espermatozoides e esteróides (25). É um órgão par, que apresenta desenvolvimento inicial dentro da cavidade abdominal e descida para a bolsa escrotal ao final da gestação, a fim de manter a temperatura inferior à temperatura corporal, requerida para a produção das células reprodutivas. Anatomicamente apresenta um polo superior e um inferior, duas margens (medial e lateral), bem como uma face anterior e uma posterior, recoberta pelo epidídimo (27).

Cada testículo é revestido por uma camada de tecido conjuntivo, a túnica albugínea, que por sua vez, apresenta em sua região externa lateral e anterior, a túnica vaginal. A túnica albugínea emite projeções para o interior do órgão, formando o mediastino do testículo, de onde partem septos fibrosos que dividem o testículo em aproximadamente 300 lóbulos de formato piramidal, constituídos primordialmente por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células intersticiais e entre 1 a 4 túbulos seminíferos (27), como representado na figura 2.

Figura 2 - Ilustração de uma secção de túbulo seminífero, contendo as células da linhagem espermatogênica, células de Sertoli, camada de células mióides, conjuntivo, vasos sanguíneos e células intersticiais



Fonte: Junqueira & Carneiro, 2004 (28).

As células intersticiais também conhecidas como células de *Leydig*, apresentam como função principal a síntese e secreção de testosterona (25, 27). No compartimento dos túbulos seminíferos são encontradas as células peritubulares mióides, lâmina basal, epitélio seminífero e lume, sendo o epitélio seminífero predominantemente formado por células de Sertoli (componente somático) e pelas células espermatogênicas (componente germinativo) (25, 28).

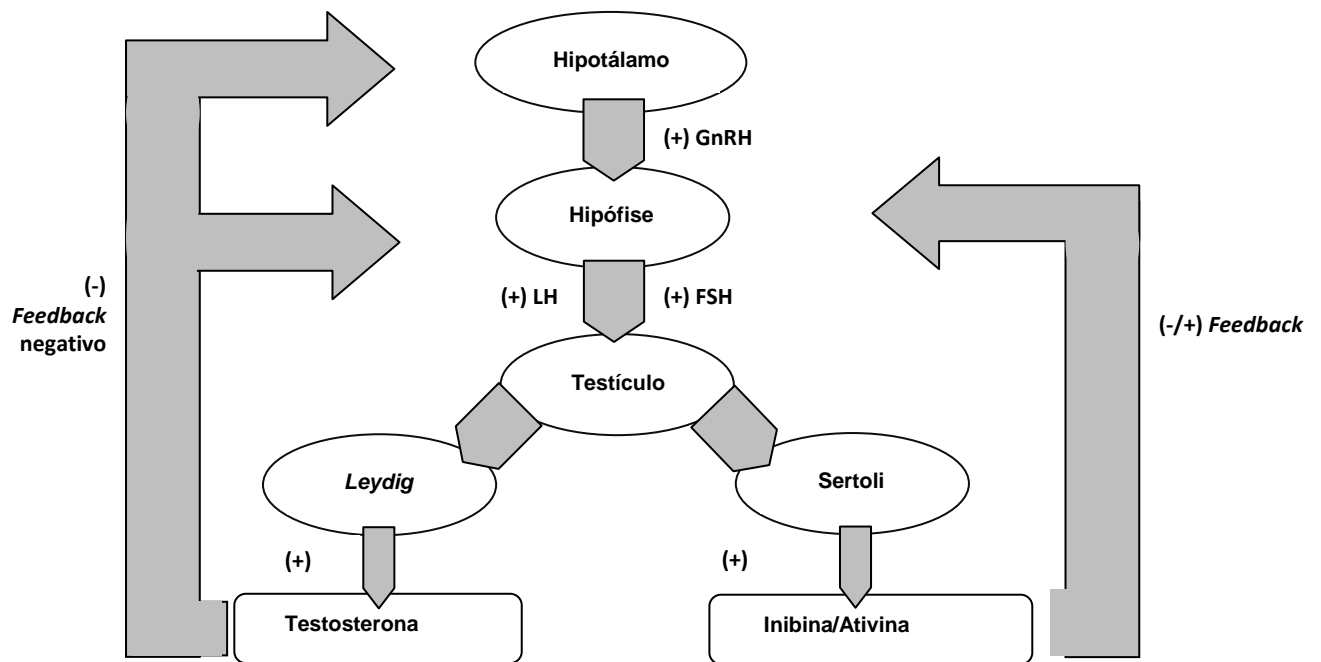
O LH e o FSH secretados pela hipófise desempenham suas funções no testículo através de sua interação com seus receptores transmembranares presentes nos diferentes tipos celulares do órgão. As gonadotropinas são formadas por duas subunidades, α e β , sendo a primeira compartilhada com a tireotrofina (TSH – hormônio estimulante da tireóide) e com a gonadotrofina coriônica (HCG), enquanto a segunda é específica e, portanto, responsável pelas características de cada hormônio (29).

LH induz a secreção de testosterona através de sua ação sobre as células intersticiais de *Leydig*, enquanto FSH se liga a seus receptores específicos nas células de Sertoli nos túbulos seminíferos, estimulando o crescimento destas células e a liberação de várias substâncias espermatogênicas. Estas substâncias, unidas à testosterona difundida das células de *Leydig*, funcionam como importantes estimuladores da espermatogênese (25, 30).

Testosterona, principal hormônio sintetizado e secretado pelos testículos, age a partir da ligação aos seus receptores (AR) pertencentes à família dos esteróides e que atuam no núcleo como fatores de transcrição de genes-alvo (31, 32). No início da vida, a função primordial da testosterona está vinculada ao controle da masculinização do trato reprodutivo e da genitália, enquanto sua secreção na vida adulta é essencial para os eventos reprodutivos, como a espermatogênese (33-35).

A testosterona secretada pelos testículos é capaz de regular o processo de síntese e secreção de LH e conseqüentemente sua própria secreção. Quando seus níveis encontram-se aumentados, através do mecanismo de *feedback* negativo, ela atua sobre o hipotálamo inibindo a secreção de GnRH, com conseqüente depleção da secreção de LH pela hipófise, e portanto, da produção de testosterona pelos testículos. De forma oposta, a secreção testicular de testosterona diminuída, induz o aumento da secreção hipotalâmica de GnRH, com aumento correspondente na secreção de LH hipofisário, terminando com elevação na secreção de testosterona pelos testículos (36, 37) (figura 3).

Figura 3 - Esquema representativo da regulação por mecanismo de *feedback* negativo do eixo hipotálamo-hipófise-testículo



Fonte: A autora, 2015.

Outro mecanismo similar de *feedback*, que apresenta ação direta sobre a hipófise anterior e que também objetiva o controle da espermatogênese, é realizado por dois importantes hormônios secretados pelas células de Sertoli. Quando há aumento da velocidade de produção de espermatozoides ocorre redução da secreção de FSH, e em ocasião de redução na velocidade da espermatogênese, a secreção de FSH é aumentada, por ação dos hormônios inibina e ativina respectivamente, que também podem agir de forma mais discreta sobre a secreção de GnRH pelo hipotálamo (38) (figura 3).

A maior parte da testosterona presente no plasma é sintetizada a partir do colesterol pelos testículos, que por sua vez é capaz de sintetizar outros andrógenos como dihidrotestosterona (DHT), dehidro-epiandrosterona e androstenediona. A glândula adrenal também possui capacidade de produzir uma porção menor de testosterona pela conversão periférica de androstenediona. Na circulação a testosterona é transportada ligada à Globulina Carreadora de Hormônios Sexuais (SHBG) com afinidade elevada, ou ligada à albumina com baixa afinidade podendo ainda ser encontrada na forma livre. Sabe-se que a testosterona ligada à albumina

torna-se biodisponível durante a sua passagem pelos tecidos. Tanto esta fração, quanto a testosterona livre constituem as formas capazes de se difundir passivamente pelas membranas celulares das células-alvo e interagir com receptor de androgênio específico (AR), sendo consideradas biologicamente ativas (39, 40).

Contudo, a DHT é o andrógeno mais potente devido à maior afinidade e especificidade de ligação aos receptores específicos que os demais andrógenos. É sintetizado tanto a nível testicular, como principalmente a partir da conversão periférica da testosterona ou androstenediona pela ação da enzima 5 α -redutase. Cabe ressaltar ainda que órgãos do sistema reprodutor, com exceção do testículo tem seu controle androgênico regulado principalmente pela DHT (41-43).

Outros tecidos do sistema reprodutor também estão sobre o controle hormonal tanto das gonadotropinas hipofisárias quanto dos andrógenos (44, 45). Destacaremos aqui o epidídimo que é um dos tecidos alvo deste estudo.

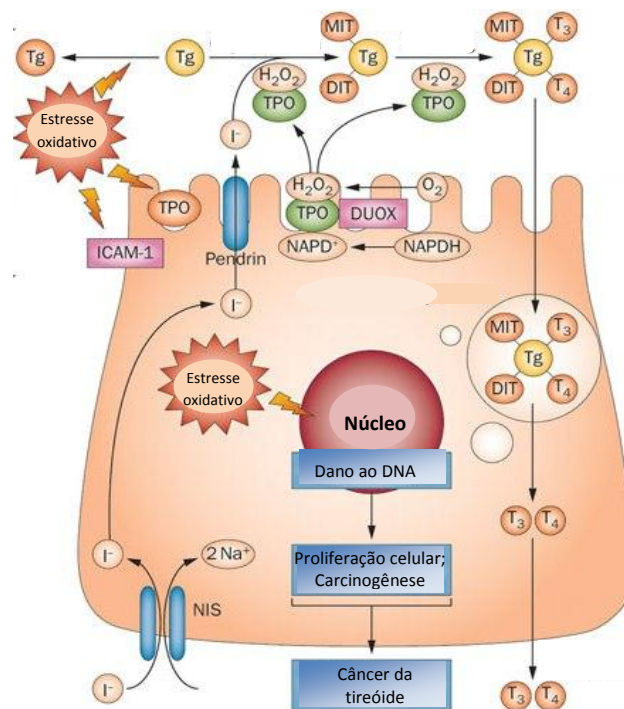
O epidídimo é um órgão androgênio-dependente, regulado primariamente pela DHT (46). É um ducto altamente enovelado que se estende longitudinalmente na face póstero-lateral testicular. Promove a ligação entre o ducto eferente e o deferente e em humanos apresenta três segmentos: um superior dilatado denominado cabeça, um central, o corpo e uma extremidade inferior afilada chamada cauda (47-49). Roedores apresentam também um segmento inicial, anterior à cabeça. Cada segmento apresenta cinco tipos celulares epiteliais, denominadas células principal, estreita, apical, clara e basal. A célula principal é a mais frequente dentre elas, correspondendo a cerca de 65 a 80% do total das células epiteliais (50). Cada tipo celular apresenta estrutura e função distintas, resultando num padrão complexo de expressão gênica e regulação ao longo do comprimento do órgão (49, 51, 52).

Após a sua síntese a nível testicular, os espermatozoides continuarão seu percurso chegando ao epidídimo através da passagem pelo ducto eferente. O trânsito dos espermatozoides por toda a extensão epididimária permite a maturação das células reprodutivas, incluindo os eventos de aquisição da motilidade e capacidade de fertilização do óvulo (53).

1.3 Hormônios tireoidianos

Os hormônios, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), são essenciais para o equilíbrio dos processos metabólicos e para o crescimento e desenvolvimento normal do organismo, estando seus níveis diretamente relacionados ao peso corporal e gasto energético (54-56). Sua síntese ocorre no interior das células foliculares tireoidianas a partir da iodação da tireoglobulina que é uma molécula proteica formada por 2 subunidades, de elevado peso molecular (660 KDa), precursora dos HT (57). O processo de síntese de T3 e T4 compreende o transporte ativo de iodo, oriundo principalmente da dieta, para o interior do folículo tireoidiano, através de um transportador transmembranar específico, o NIS, e a sua inserção nos resíduos de tirosina disponíveis no pró-hormônio tireoglobulina (58). Como resultado da iodação da tireoglobulina, ocorre a formação de resíduos monoiodinados (MIT) e diiodinados (DIT), que se associam enzimaticamente, originando T3 e T4, armazenados como polipeptídeo no colóide localizado no lume das células foliculares (58, 59). A figura 4 apresenta o mecanismo de síntese desses hormônios pela tireoide.

Figura 4 - Esquema representativo do mecanismo de síntese e secreção dos hormônios tireoidianos, dependente do iodo, pelas células foliculares da tireoide



Fonte: Adaptado de Vitale G *et al.*, 2013 (60).

O hormônio liberador de tireotropina (TRH) é o principal regulador dos níveis de HT circulantes. Sua síntese ocorre nos núcleos hipotalâmicos paraventriculares, sendo projetado até a eminência mediana, liberado nos capilares hipotálamo-hipofisários e transportado para os tireotrofos na adeno-hipófise (61). Nessas células, devido à interação do TRH com receptores de membrana específicos, ocorre estímulo da secreção do TSH pela hipófise anterior, que por sua vez, é capaz de estimular a tireoide a produzir seus produtos hormonais (62). Os HT regulam sua concentração através de mecanismo clássico de *feedback* negativo envolvendo o eixo hipotálamo-hipófise e exercendo controle principal sobre a resposta dos tireotrofos (61-63). É importante ressaltar, que este *feedback* sofre influência de outros fatores, internos e externos, como a projeção dos neurônios hipotalâmicos contendo POMC (pro-opiomelanocortina) e NPY (neuropeptídeo Y) sobre os neurônios secretores de TRH (64-68).

O principal produto de secreção da tireóide é o T4, contudo T3 constitui a forma biologicamente mais ativa. A desiodação compreende a conversão periférica de T4, devido à remoção do iodo da molécula. Este mecanismo realizado pelas selenoenzimas desiodases ativam ou inativam o HT dependendo do sítio de remoção do iodo (69), produzindo T3 ou seus metabólitos inativos rT3 ou T2 (57, 70). Já foram identificadas três desiodases: tipo I, II e III (D1, D2 e D3 respectivamente). D1 e D2 são responsáveis por gerar a forma ativa do HT, catalisando a conversão de T4 em T3, enquanto D3 age em outro sítio, estando relacionada à inativação do HT, pela formação de T3 reverso (rT3). As três desiodases são expressas nos testículos em todos os momentos da vida. Quando são comparadas D1 e D2, há indícios de que D2 é o tipo predominante (71-73).

Na corrente sanguínea, HT são majoritariamente transportados ligados a proteínas plasmáticas, e sua captação pelos tecidos e células é dependente de carreadores transmembranares específicos, como o transportador celular de membrana (MCT) 8 e 10 e o transportador polipeptídico para ânions orgânicos 1c1 (Oatp1c1) (74), o qual teve sua expressão gênica e/ou proteica identificada nas células do interstício testicular (75-77). Estudo recente identificou nas células de Sertoli, *Leydig*, espermatogônias e espermatócitos, durante toda a vida, uma nova classe de transportadores aniônicos específicos (GSTs) e de alta afinidade para T3 e T4 (78).

No interior celular, T3 se liga aos receptores nucleares tireoidianos (TR) membros da superfamília dos receptores esteróides, que se encontram associados aos genes alvo presentes em regiões gênicas específicas, as TREs (elementos responsivos do hormônio tireoidiano). Foram descritas duas isoformas principais de TR, α e β , codificadas pelos genes *c-erbA α* e *c-erbA β* , as quais, por splicing alternativo dão origem a nove isoformas (TR α 1, α 2, α 3, $\Delta\alpha$ 1, $\Delta\alpha$ 2, β 1, β 2, β 3 e $\Delta\beta$ 3), sendo apenas TR α 1, TR β 1 e TR β 2 funcionais, por apresentarem domínio de ligação ao ligante e ao DNA e portanto capazes de induzir a transcrição gênica (8). As demais, não possuem papel totalmente definido, mas parecem atuar como antagonista dos receptores funcionais (79). Duas isoformas do receptor do HT já foram identificadas nos testículos, TR α 1 e TR β 1 (80), sendo TR α 1 a isoforma predominante nas células de Sertoli principalmente no período fetal tardio e neonatal inicial, enquanto TR β 1 predomina nas células intersticiais e germinativas até a vida adulta, sugerindo que tanto testículos adultos quanto em desenvolvimento são alvos para a ação de T3 (81-84).

1.3.1 Hormônios tireoidianos e a função testicular

Os HT tem um papel importante no desenvolvimento e função testicular. T3 é responsável pela maturação dos testículos através do controle da proliferação e diferenciação das células de Sertoli e *Leydig* durante o desenvolvimento testicular, além de serem importantes reguladores da espermatogênese e esteroidogênese em ratos e outras espécies de mamíferos (8, 85).

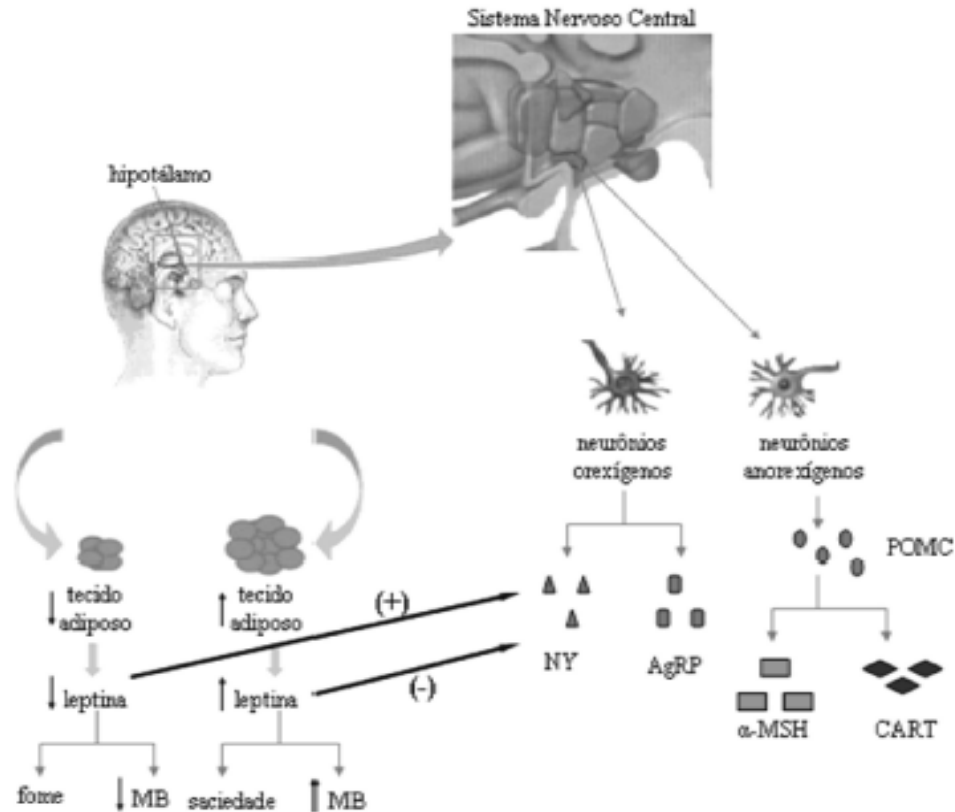
Foi demonstrado que o número de sítios de ligação ao T3 nos núcleos da célula de Sertoli é maior durante a vida fetal, reduzindo gradualmente ao longo da vida (82). T3 é responsável por reduzir a proliferação e estimular a diferenciação de Sertoli (7, 81, 86), que apresenta número diretamente relacionado ao tamanho testicular e espermatogênese (7, 9). Desta forma, HT parecem fundamentais para espermatogênese, compartilhando com FSH a responsabilidade da regulação do desenvolvimento tubular e epididimário (41, 87). Acredita-se que através da ação sobre o fator anti-mulleriano, T3 é capaz de promover alteração na diferenciação das células mesenquimais em células de *Leydig* (88).

Disfunções tireoidianas são associadas a alterações da função reprodutiva masculina. Hipotireoidismo, caracterizado pela redução dos níveis circulantes de HT, quando induzido no período fetal, leva a um atraso na maturação sexual (85, 89, 90), pela sua capacidade de afetar o desenvolvimento testicular culminando em número aumentado de células de Sertoli e de *Leydig*, apesar do menor tamanho desta última (88). Apesar de controversos, alguns trabalhos mostram redução na secreção de testosterona devido à diminuição da resposta das células intersticiais às gonadotropinas, que por sua vez podem estar inalteradas, reduzidas ou aumentadas (91) nesta disfunção metabólica em diferentes modelos experimentais. Além disso, T3 parece agir diretamente sobre os gonadotrofos hipofisários, alterando a secreção dos hormônios gonadotróficos e então afetando a produção de testosterona pelas células de *leydig* (8).

1.3 Leptina

Codificada pelo gene da obesidade e sintetizada principalmente no tecido adiposo, a leptina é um hormônio de natureza proteica (92-94), composto por 167 aminoácidos e peso molecular de 16 KDa. Como ação principal controla o metabolismo energético e o consumo alimentar, através de uma cascata de eventos regulatórios disparados pela interação da leptina com seus receptores no hipotálamo. A ligação da leptina ao seu receptor nos neurônios orexígenos inibe a atividade dessas células e reduz a liberação de NPY e AgRP (peptídeo relacionado ao gene *agouti*). Por outro lado, a leptina estimula a atividade dos neurônios anorexígenos, aumentando a liberação de MSH- α (Hormônio estimulador do melanócito α) e CART (Transcrito regulado por cocaína-anfetamina). Dessa forma, situações que aumentam a concentração plasmática de leptina levam à inibição dos neurônios NPY/AgRP e à estimulação dos neurônios α -MSH/CART, causando diminuição da ingestão alimentar. Já situações em que ocorre diminuição na concentração de leptina, os neurônios anorexígenos não estão suficientemente estimulados e os neurônios orexígenos deixam de ser inibidos, levando ao aumento da ingestão alimentar (20). A figura 5 esquematiza esses mecanismos:

Figura 5 - Ação central da leptina no balanço energético. MB (metabolismo basal); NY (neuropeptídeo Y); AgRP (Peptídeo relacionado ao gene agouti); POMC (pro-opiomelanocortina); MSH- α (Hormônio estimulador do melanócito α); CART (Transcrito regulado por cocaína-anfetamina)



Fonte: Duclos M, 2001 (95).

Outras ações da leptina também incluem estímulo ao sistema nervoso simpático, aumentando a pressão sanguínea, a pulsação e a termogênese (produção de calor pelo gasto de energia metabólica) acoplada à cadeia de transporte de elétrons e produção de ATP (adenosina trifosfato) pelas mitocôndrias dos adipócitos (96). Além desses, tem sido demonstrada a capacidade da leptina em modular vários eixos neuroendócrinos, incluindo o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide e o eixo reprodutivo, apesar de ainda não completamente compreendidos os mecanismos pelos quais essas ações são desempenhadas (97-99).

A leptina apresenta relação mais estreita com a massa de gordura absoluta, de um indivíduo com peso corporal normal, do que com o IMC (índice de massa corpórea) (100). Os níveis de leptina circulantes parecem estar diretamente relacionados com a quantidade de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) para

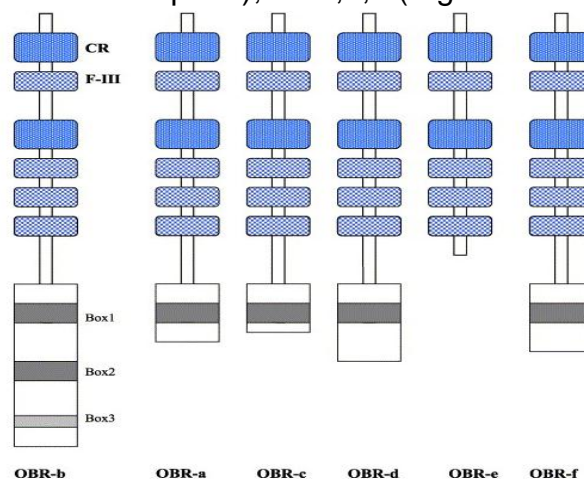
leptina no tecido adiposo. Além disso, vários fatores metabólicos e endócrinos, incluindo insulina, glicocorticoides e citocinas pró-inflamatórias, contribuem para regular a transcrição dos genes da leptina em adipócitos (101-103).

1.4.1 Leptina e isoformas de seus receptores

A leptina age nas células através de seus receptores (OBR) que são membros da família dos receptores de classe I da citocina, cujo gene é transcrito e clivado por *splicing alternativo* em seis diferentes isoformas, esquematizadas na figura 6 (104-106), classificadas em três categorias: longa (Ob-Rb), curta (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Rf) e solúvel (Ob-Re) (104, 106). É sabido ainda que a OB-Re circula sistemicamente acoplada a proteínas transportadoras e é responsável pelo controle dos níveis de leptina circulante (107).

As seis isoformas, têm em comum um domínio extracelular de mais de 800 aminoácidos e um domínio transmembranar com 34 aminoácidos. Contudo, o domínio intracelular é variável, característico a cada uma delas. Neste contexto, apenas a isoforma longa, expressa principalmente nos núcleos hipotalâmicos ventro-medial, dorso-medial e ARC, devido à presença de domínio intracelular completo, revela adequação para ativar todas as vias de sinalização intracelular do hormônio (108), sendo considerada a isoforma biologicamente ativa (105, 109-111) e capaz de responder às ações centrais da leptina (111).

Figura 6 - Isoformas do receptor de leptina. CR (domínio receptor de citocina); FIII (domínio fibronectina tipo III); Box 1,2,3 (região de domínio intracelular)

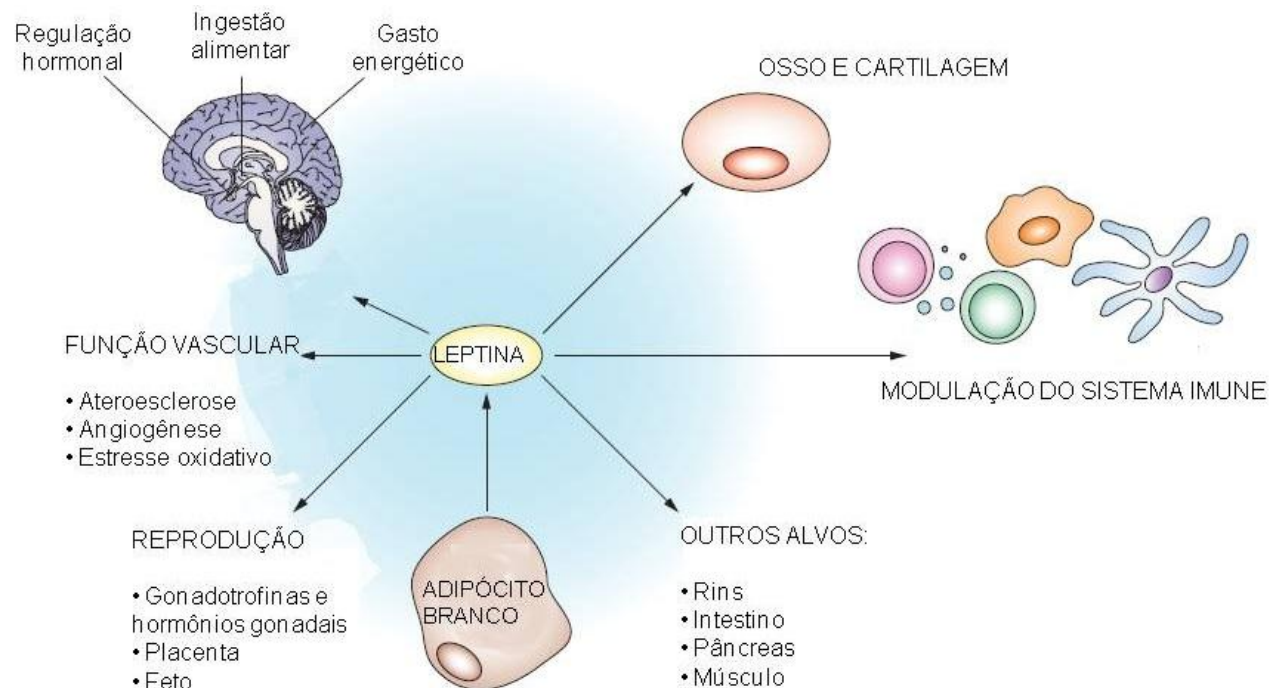


Fonte: Hegyi K et al., 2004 (112).

1.4.2 Leptina no sistema reprodutor

Inicialmente, as ações diretas da leptina estavam relacionadas apenas ao sistema nervoso central. No entanto, a ampla distribuição das isoformas dos receptores de leptina reflete a multiplicidade de efeitos biológicos deste hormônio (figura 7), incluindo o papel no sistema reprodutor através da estimulação de GnRH, fornecendo evidências para a extrema funcionalidade da leptina (113).

Figura 7 - Representação esquemática da natureza pleiotrópica da leptina



Fonte: Lago F *et al.*, 2007 (114).

Tecidos como testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal, dentre outros, se mostraram capazes de produzir pequenas quantidades de leptina (94, 115-120), que apresenta um papel fundamental como sinalizador metabólico para o sistema reprodutivo, informando que as reservas calóricas e de gordura estão disponíveis para a demanda exigida na reprodução (121-123).

Evidências indicam que o hipotálamo é o alvo primário para a maioria das ações deste hormônio sobre o eixo reprodutivo (14). Baseado na caracterização da distribuição dos receptores e nos efeitos da leptina em sistema *in vivo*, locais adicionais para a ação do OBR têm sido sugeridos, incluindo a hipófise (124), os testículos (125-129), epidídimos (128), próstata e vesícula seminal (130-134).

A correlação negativa entre os níveis de testosterona e leptina tem sido descrita em humanos e animais, sendo atribuída ao efeito direto dos andrógenos, regulando negativamente a síntese e secreção de leptina pelos adipócitos (135). Especula-se que exista um complexo modo de ação da leptina em múltiplos locais do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Leptina é capaz de estimular a secreção de GnRH a nível hipotalâmico, enquanto a nível gonadal age inibindo a esteroidogênese (15, 136). Evidências têm indicado que a leptina utiliza diversos neuromoduladores para de forma indireta controlar a secreção de GnRH, já que esses neurônios não expressam OBR (14). Este controle é realizado via interneurônios aferentes, localizados no núcleo paraventricular anteroventral e produzidos em regiões influenciadas pela leptina, por neurônios que co-expressam o OB-Rb e que se projetam diretamente para os neurônios produtores de GnRH ou para áreas hipotalâmicas importantes na regulação do sistema reprodutivo (137, 138).

No testículo, a expressão de RNAm das diferentes isoformas de OBR foi observada nas células de *Leydig* (129, 139, 140), células de Sertoli (141, 142) e células germinativas (125), em todos os estágios da vida. Diversos trabalhos indicam que o OBR é regulado e responde à mudanças nos níveis séricos de hormônios esteróides (121, 143, 144), leptina (145, 146) e gonadotropinas (145).

Além dos efeitos no eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, já foi demonstrado que leptina adianta o início da puberdade em roedores (118) e estimula a aromatase nas células da granulosa (117) e na glândula mamária (147). Trabalhos publicados pelo nosso grupo demonstram que a leptina atua na regulação de genes importantes para a fisiologia da próstata (130-132). Embora muitos trabalhos mostrem que a leptina desempenha um papel importante na reprodução de roedores e humanos, os mecanismos pelos quais a leptina regula a função reprodutiva ainda não foram esclarecidos (135, 148).

1.4 Interação Leptina e hormônio tireoidiano

Leptina parece modular a função tireoidiana por atuar sobre o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, além de agir sobre a atividade das desidases (149-153). Agindo de forma direta sobre o núcleo paraventricular e indireta sobre o ARC, leptina atua positivamente sobre o TRH (66, 154-156), que funciona como principal integrador metabólico do eixo e conseqüentemente estimula a secreção de TSH pelos tireotrofos. O TSH apresenta relação positiva com leptina e com o IMC (157), enquanto a leptina é negativamente regulada pelos HT. Além disso, através de um mecanismo adicional direto, a leptina exerce efeito inibitório local da secreção de TSH (152, 153).

No hipotálamo, os núcleos ARC e paraventricular integralizam os sinais periféricos sobre a quantidade de energia disponível, respondendo à leptina através de sua interação com OBR expressos nesses sítios neuronais (158, 159). Esses neurônios também apresentam células neuroendócrinas que expressam o TRH. Em situação de jejum sua expressão é reduzida resultando na redução dos níveis circulantes de T_3 . Isso indica que este neuropeptídeo possui propriedade anorexígena e que o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide é influenciado pelo estoque energético (160, 161).

Encontramos na literatura resultados controversos sobre os níveis séricos de leptina no hipotireoidismo, podendo apresentar-se inalterado (162), aumentado (163) ou diminuído (164). O hipotireoidismo tem sido relacionado ainda com redução da expressão de proteínas chave da via de sinalização da leptina no hipotálamo basomedial e na hipófise, corroborando com a ideia de associação entre HT e leptina (97).

Estudos sugerem que ação da leptina sobre este eixo é capaz de modular os efeitos dos HT no sistema reprodutor, sendo os níveis adequados destes hormônios fundamentais para uma função reprodutiva normal (165). Entretanto, ainda não estão completamente entendidos os mecanismos pelo quais a leptina é capaz de atuar sobre o metabolismo dos HT no testículo e epidídimo, sendo necessários trabalhos adicionais para sua determinação.

Sabendo-se da ação de ambos os hormônios, HT e leptina, na regulação do sistema reprodutor quando estudados de forma independente, nós hipotetizamos

que a depleção dos níveis de HT é capaz de promover distúrbios reprodutivos decorrentes à alteração da expressão da leptina no sistema reprodutor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar o impacto do hipotireoidismo congênito sobre HT, leptina, hormônios reprodutivos e parâmetros da fertilidade de ratos *wistar* machos na vida adulta.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar em animais que sofreram hipotireoidismo congênito transitório, os seguintes parâmetros:

- a) Massa corporal, ingestão alimentar, taxa de crescimento e comprimento linear;
- b) Concentrações hormonais séricas de leptina, FSH, LH, testosterona, TSH e HT;
- c) Morfologia, viabilidade e número total de espermatozoides;
- d) Produção espermática diária (DSP);
- e) Tempo de trânsito espermático;
- f) Peso testicular e epididimário;
- g) Expressão proteica do receptor da leptina no testículo e cauda do epidídimo.
- h) Expressão proteica da enzima StAR (proteína reguladora da esteroidogênese ativa) no testículo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de morfometria, metabolismo e doença cardiovascular do departamento de Anatomia IBRAG/UERJ, seguindo-se os princípios descritos em “The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” para os cuidados no uso e manuseio com os animais. Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (em anexo).

Machos e Fêmeas *Wistar* de 30 dias foram obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal/Fiocruz), para o acasalamento e geração da prole, e mantidas em biotério setorial do Laboratório de Ciências Radiológicas, ciclo claro-escuro (12h/12h), com temperatura constante (22°C), livre acesso à água e a ração Nuvilab com 23% de proteína, obtida de Nuvital (Curitiba, PR, Brasil), até atingirem os 90 dias de idade, quando as fêmeas foram colocadas para acasalamento com os machos, na proporção de duas fêmeas para cada macho. O sucesso do acasalamento foi confirmado pela presença de plugue vaginal visualizado por esfregaço vaginal realizado a cada 24h de acasalamento, definindo-se o dia 0 de gestação.

O hipotireoidismo em animais é um modelo experimental conseguido pela adição de drogas antitireoideanas na água de beber, sendo as drogas geralmente utilizadas o propiltiouracil (PTU) e o metilmazole (MMI) (97, 166, 167). Neste estudo, optamos pelo MMI por ser a droga mais indicada para ser utilizada a partir do segundo trimestre de gestação (168) e assim a de melhor escolha para induzir o hipotireoidismo congênito.

O hipotireoidismo congênito foi induzido acrescentando-se 0,03% de metimazol (MMI; Tapazol - Biolab) na água de beber ofertada livremente às mães, por ser eficiente na redução dos níveis de hormônios tireoidianos nas progenitoras e suas proles oriundas (169). Nove ratas *Wistar* fêmeas foram divididas em três grupos

experimentais de acordo com o período de tratamento com MMI, conforme descrito a seguir:

- a) Controle (C): com livre acesso à água pura filtrada durante todo o experimento;
- b) Gestação (G): com livre acesso à água acrescida de MMI a 0,03%, do 9º dia de gestação até o dia do nascimento da prole;
- c) Gestação + Lactação (GL): com livre acesso à água acrescida de MMI a 0,03%, do 9º dia de gestação até o 8º dia de lactação;

A escolha de iniciar o tratamento a partir do dia 9 de gestação se deu pelo fato de se tratar do período imediatamente anterior à diferenciação do testículo (170) e por relatos de trabalhos da literatura de que a exposição materna ao MMI num período anterior ao dia 9 resulta em maior perda fetal (42).

A partir do 18º dia de gestação, as progenitoras foram monitoradas diariamente para a observação da data do parto, considerada como dia 0 (D0). Proles com número inferior a oito animais nascidos ou àquelas em que houve canibalismo materno foram descartadas. A prole, preferencialmente formada por machos, foi ajustada em seis filhotes por mãe para a manutenção do potencial lactotrófico máximo (171). Nas proles em que o número de machos não chegava a seis, o ajuste foi realizado completando-se o n com filhotes fêmeas. Durante todo o período experimental tanto a massa corporal quanto a ingestão alimentar das mães foram avaliadas.

A fim de confirmar a condição de hipotireoidismo foi realizado outro experimento com o mesmo modelo, paralelamente. Três progenitoras de cada grupo foram sacrificadas no dia do nascimento da prole (dia 0) e no 8º dia de lactação, cursando com os períodos de administração de MMI. O sangue foi coletado por punção cardíaca para posterior dosagem dos níveis de HT e TSH. O hipotireoidismo nos filhotes foi confirmado pela quantificação dos níveis séricos de TSH nos dias 0 e 8º de lactação de seis filhotes por grupo.

Ao desmame, oito filhotes de cada grupo tiveram acesso à ração comercial padrão e água pura até os 90 dias de idade quando foram mortos por inalação de CO₂. A partir do dia do nascimento da prole, massa corporal, crescimento linear (naso-anal), taxa de crescimento e ingestão alimentar foram avaliados diariamente

até o término da lactação e a cada três dias do desmame até o sacrifício, aos 90 dias de vida. A taxa de ganho de peso foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: $[(\text{massa corporal (g) do dia} - \text{massa corporal (g) do dia anterior}) / \text{massa corporal do dia anterior}] \times 100$ (166).

No momento do sacrifício, o sangue foi coletado por punção cardíaca e o soro armazenado a -20°C para posterior dosagem hormonal de TSH, FSH, LH, T3, T4, leptina e testosterona. Os testículos e epidídimos localizados do lado direito e a gordura epididimária total foram excisados e pesados. Testículos e a cauda do epidídimo foram então imediatamente congelados a -80°C para posterior processamento para a quantificação da expressão proteica por western blot, enquanto seus contralaterais foram imediatamente processados para a coleta dos espermatozoides.

3.2 Obtenção dos espermatozoides totais

No momento do sacrifício, os epidídimos coletados foram segmentados de acordo com suas regiões e a cauda foi isolada em placas de Petri, cortada em fragmentos menores com uma tesoura, e seu conteúdo disperso em tampão fosfato de Ringer (RPS): (glicose 10 mM, NaCl 119 mM, KCl 5 mM, MgSO_4 1,2 mM, fosfato de potássio monobásico 16,3 mM; pH 6.9). Foram realizadas 7 lavagens sucessivas de cada fragmento do tecido em RPS pré-aquecido (37°C). O número total de lavagens foi determinando por ser o mais eficiente para a retirada total dos espermatozoides.

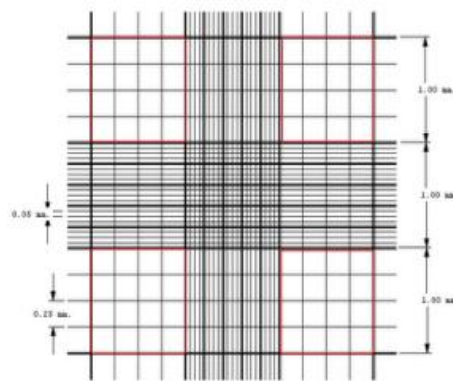
Para a obtenção dos espermatozoides totais nos testículos, imediatamente após a sua excisão, os tecidos foram desencapsulados, fragmentados e homogeneizados em 5 mL de tampão RPS para a dispersão de seu conteúdo (172).

3.3 Contagem dos espermatozoides totais

Para a determinação da concentração de espermatozoides na amostra, foram transferidas alíquotas da amostra diluída para a câmara de *Neubauer* e contadas as espermátides finais em microscópio de luz, em um aumento de 200x.

Foram analisados quatro quadrantes, onde apenas os espermatozoides que se encontravam no limite interno foram contados, conforme representado na figura 8.

Figura 8 - Grade da câmara de *Neubauer* com os quatro quadrantes utilizados na contagem dos espermatozoides marcados em vermelho



Fonte: Silva TA, 2007 (173).

Além disso, estabelecemos contar apenas as cabeças dos espermatozoides para evitar dupla contagem e um mínimo de 200 células por amostra, para diminuir a margem de erro.

Para determinar o número de espermatozoides em células/ml da amostra original e conseqüentemente o número total de células foram utilizadas as seguintes fórmulas:

- a) Número de células/mL: média do número de células (média dos quadrantes contados) X inverso da diluição X 10000.
- b) Número total de células: células/mL X volume original da suspensão celular.

A determinação do número total de células é importante por ser utilizado como parâmetro de medida da capacidade de produção de espermatozoides dos testículos e a obstrução do trato genital masculino (174, 175).

3.4 Produção espermática diária (DSP) e tempo de trânsito

Para calcular a produção espermática diária (DSP), o número total de espermátides no estágio final da espermatogênese foi contada no testículo e este valor dividido por 6,1, que reflete o número de dias que estas espermátides ficam presentes no epitélio seminífero. Após processamento semelhante ao testículo como descrito acima, o tempo de trânsito espermático através do epidídimo foi determinado pela razão entre o número total de espermatozoides na cauda do órgão pelo DSP (174).

3.5 Viabilidade

A maturação do espermatozoide dentro do epidídimo tem sido mostrado pela maior habilidade de espermatozoides coletados da cauda do epidídimo em relação àqueles da cabeça, em fertilizar o óvulo após a inseminação no útero (176). Desta forma, utilizamos neste estudo espermatozoides coletados da cauda do epidídimo para avaliar o número e viabilidade dos espermatozoides e morfologia espermática.

Uma alíquota da amostra de espermatozoides foi incubada com tampão hiposmótico (citrato 2,5 mM e frutose 7,5 mM) e mantidos por 30 minutos a 37°C. Para a observação do resultado foram feitos esfregaços em lâmina e analisadas 200 células por animal, em microscopia de luz em um aumento de 200x (Microscópio Marca: Olympus, modelo: BX51 - Infinity 1–5c digital câmera, formato TIFF, 36-bit Color, 1280 × 1024 pixels). As alterações visualizadas na cauda do espermatozoide são baseadas na semipermeabilidade da membrana, que provoca aumento do volume da célula em condições hipo-osmóticas devido ao influxo de água, o que leva a alterações morfológicas que mostram a integridade de suas membranas e determina a viabilidade dos espermatozoides (177).

3.6 Morfologia

Uma alíquota da amostra de espermatozoides foi incubada com Eosina Y 0,5%. A partir de esfregaço em lâmina, um total de 200 células por animal foi analisada por microscopia de luz, em aumento de 400x (Microscópio Marca: Olympus, modelo: BX51 - Infinity 1–5c digital câmera, formato TIFF, 36-bit Collor, 1280 × 1024 pixels). Alterações de cabeça, de peça intermediária e de cauda foram identificadas (178) e os espermatozoides classificados como normais ou anormais. Os resultados são apresentados como percentual de células normais em relação ao total de células analisadas.

3.7 Determinação das concentrações séricas hormonais

As concentrações séricas de T3 e T4 livres e testosterona total foram determinadas no soro através de quimioluminescência específica para cada hormônio (ICN Pharmaceuticals, Inc., CA, USA). O coeficiente de variação intra e inter ensaio foi respectivamente 5,0 e 8,2 para T3, 3,5 e 5,4 para T4 e <20% para testosterona. A Sensibilidade analítica dos ensaios foi de 0,260pg/mL para T3, 0,023ng/dL para T4 livre e 0,02ng/mL para testosterona. O nível sérico de leptina foi mensurado por método de ELISA (Rat/Mouse *Leptin* ELISA Cat. #EZML- 82K, Millipore, Missouri, USA), sendo o coeficiente de variação intra e inter ensaio de 1,88% e 3,93% respectivamente e a sensibilidade de 0,08 ng/mL. Os níveis séricos de TSH, LH e FSH foram dosados no soro dos animais através de painel Multiplex (Rat Pituitary Magnetic Bead Panel Cat #RPTMAG-86K, Millipore, Missouri, USA), com coeficiente de variação inter e intra ensaio de 2,8% e 12,8% respectivamente e sensibilidade de 0,87 pg/mL para TSH, 7,62 pg/mL para FSH e 3,28 pg/mL para LH.

3.8 *Western Blot*

Os tecidos previamente congelados foram divididos ao meio e homogeneizados em 500 μ L de tampão RIPA (TRIS 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, NP-40%, 1mM EDTA, 1mM Na₃VO₄, 1mM NaF, 1 mM PMSF, pH 7,8) acrescido de coquetel contendo inibidores de proteases. O homogenato resultante foi centrifugado a 12000 RPM em microcentrífuga refrigerada (Cientec CTR15000) por 30 minutos e o sobrenadante separado e congelado a -80°C. A concentração total de proteínas foi determinada pelo método de BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Quarenta microgramas de proteína foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) por duas horas em cuba úmida (BioRad Mini-PROTEAN Tetra System). A membrana de nitrocelulose foi posteriormente incubada com anticorpos específicos para OBR, StAR e β -actina (tabela 1), acrescidos de albumina sérica bovina (BSA) a 3% e seguida de incubação com anticorpos secundários respectivos (tabela 1) por 1 hora. A detecção das bandas foi realizada pelo sistema de quimioluminescência (Kit Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) e fotodocumentada pelo sistema ChemiDoc (MPsystem Bio-Rad, Life Science Research, USA). A análise densitométrica das bandas foi realizada através do software Image J versão 1.45 e normalizado pela expressão da proteína β -actina.

Tabela 1 - Tabela de anticorpos primários e secundários utilizados na técnica de *western blot*

Anticorpo primário	Diluição	Fabricante
Beta actina (sc 81178)	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA.
OBR (SC 8391)	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA.
StAR (ab58013)	1:500	Abcam, Cambridge, Reino Unido.
Anticorpo secundário	Diluição	Fabricante
Goat anti-mouse (sc 2005) - Conjugated HRP	1:5000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA.
Rabbit anti-goat (sc 2768) - Conjugated HRP	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA.
Goat anti-rabbit (12-348) - Conjugated HRP	1:2000	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA.

3.9 Análise estatística

Foi utilizado o programa Graphpad Prism® 6.03. Após análise de normalidade pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*, os dados foram analisados utilizando-se ANOVA univariada com pós teste Holm- Sidak. Dados são expressos como média \pm erro padrão e o nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

As concentrações séricas de TSH, T3 e T4 das progenitoras, e o TSH da prole nos dias 0 e 8 de lactação estão apresentados na tabela 2. Os resultados mostram que no dia 0 as concentrações de T3 e T4 das progenitoras foram significativamente reduzidas ($p=0,0075$ e $p=0,0234$, respectivamente) e TSH aumentado ($p=0,0283$) em ambos os grupos de progenitoras submetidas ao tratamento, enquanto no dia 8 essas alterações apenas foram observadas no grupo GL (T3 $p=0,0011$; T4 $p=0,0007$ e TSH $p=0,0007$). A concentração sérica de TSH da prole no dia 0 mostrou um aumento significativo ($p=0,0128$) deste parâmetro nos dois grupos com hipotireoidismo congênito quando comparados ao grupo controle, enquanto apenas o grupo GL apresentou concentrações séricas aumentadas de TSH no dia 8 ($p=0,0036$).

Tabela 2 - Concentrações séricas hormonais das progenitoras e da prole dos grupos controle (C), gestação (G) e gestação + lactação (GL) nos dias 0 e 8 de lactação. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de três animais

		C	G	GL
Progenitoras	TSH D0 (pg/mL)	1617 \pm 819,50	25399 \pm 3771*	14871 \pm 3764*
	T3 D0 (pg/mL)	1990 \pm 0,17	0,96 \pm 0,05*	0,83 \pm 0,08*
	T4 D0 (ng/dL)	0,65 \pm 0,10	0,16 \pm 0,14*	0,01 \pm 0,00*
	TSH D8 (pg/mL)	1193 \pm 102,20	3027 \pm 1756	15513 \pm 1502*#
	T3 D8 (pg/mL)	1933 \pm 0,10	2165 \pm 0,13	1117 \pm 0,04*#
	T4 D8 (ng/dL)	0,71 \pm 0,06	0,67 \pm 0,11	0,02 \pm 0,01*#
Filhotes	TSH D0 (pg/mL)	1273 \pm 193,7	7595 \pm 1239*	8256 \pm 1990*
	TSH D8 (pg/mL)	1315 \pm 219	4101 \pm 369,70	17747 \pm 3704*#

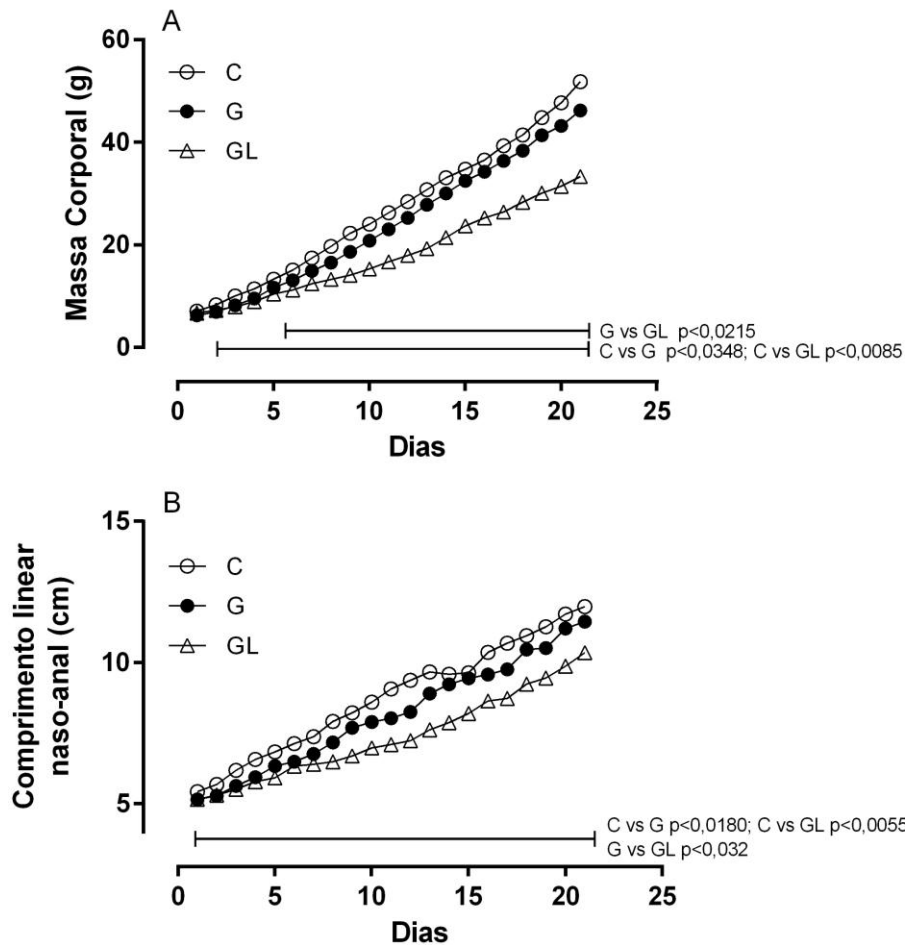
*Diferença significativa entre C e G ou GL.

#Diferença significativa entre G e GL.

A evolução da massa corporal e do crescimento linear da prole do dia do nascimento até o término da lactação está apresentada na figura 9. Podemos observar que a prole de ambos os grupos submetida ao hipotireoidismo congênito apresentou uma diminuição significativa (G $p<0,0348$; GL $p<0,0085$) da massa corporal em relação ao controle a partir da primeira semana de vida dos animais.

Resultados semelhantes foram observados em relação ao comprimento linear no mesmo período (G $p < 0,0180$; GL $p < 0,0055$).

Figura 9 - Evolução da massa corporal (g) do dia 1-21 (A) e do comprimento linear do dia 1-21 (B) dos animais do grupo controle (C), gestação (G) e gestação + lactação (GL). Valores expressos como média \pm erro padrão de 8 animais por grupo

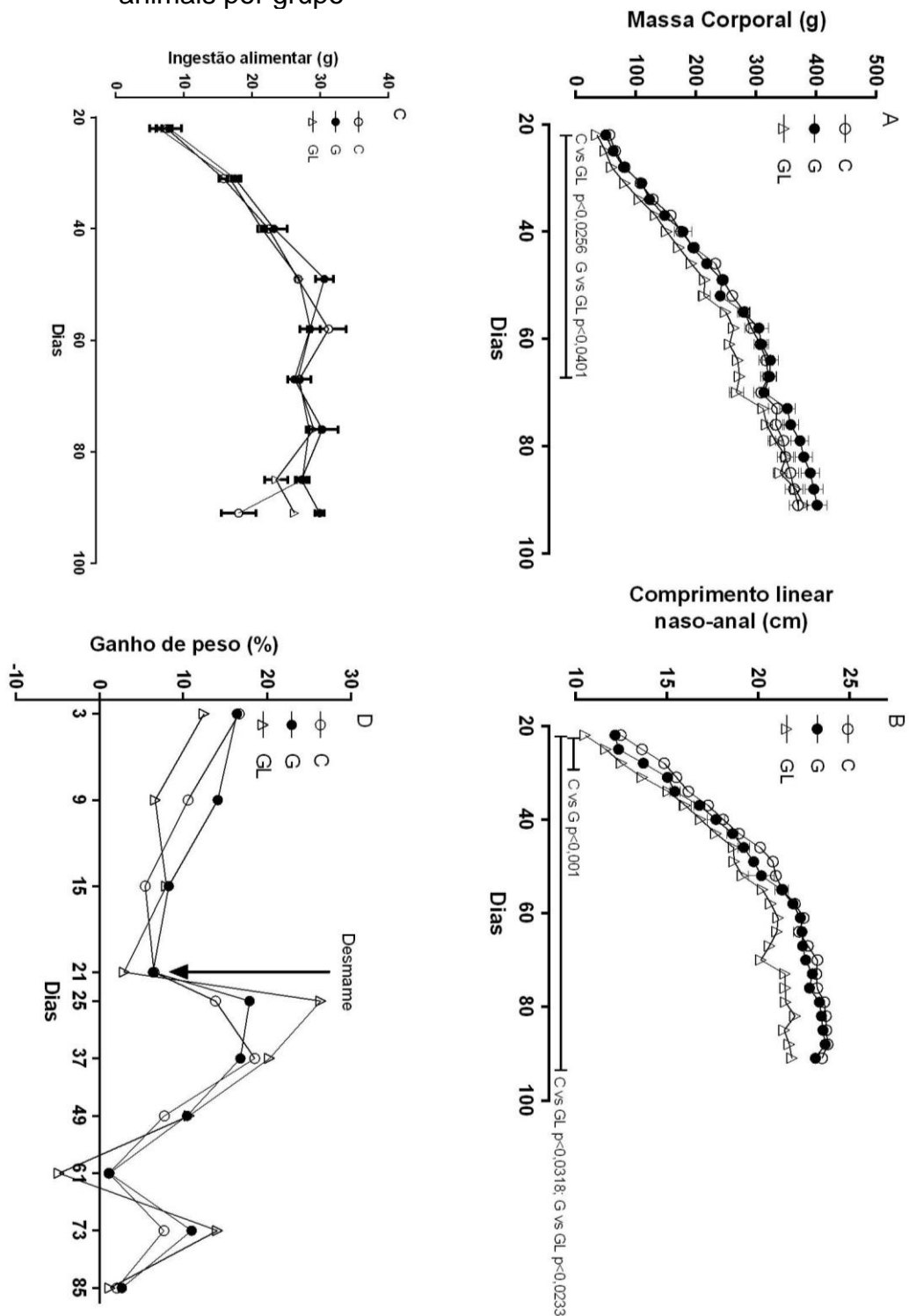


Fonte: A autora, 2015.

A figura 10 apresenta os dados de massa corporal, comprimento linear, ingestão alimentar e taxa de ganho de peso da prole após a lactação até a idade adulta. A massa corporal permaneceu reduzida apenas no grupo GL em relação aos grupos C e G até o 67º dia de vida dos animais ($p < 0,0256$). Quanto ao comprimento linear do grupo GL, observamos que este continuou reduzido em relação ao C até a idade adulta ($p < 0,0318$), enquanto o grupo G apresentou um reestabelecimento

deste parâmetro a partir do 30º dia de vida dos animais. Não foi observada alteração na ingestão alimentar e no ganho de peso.

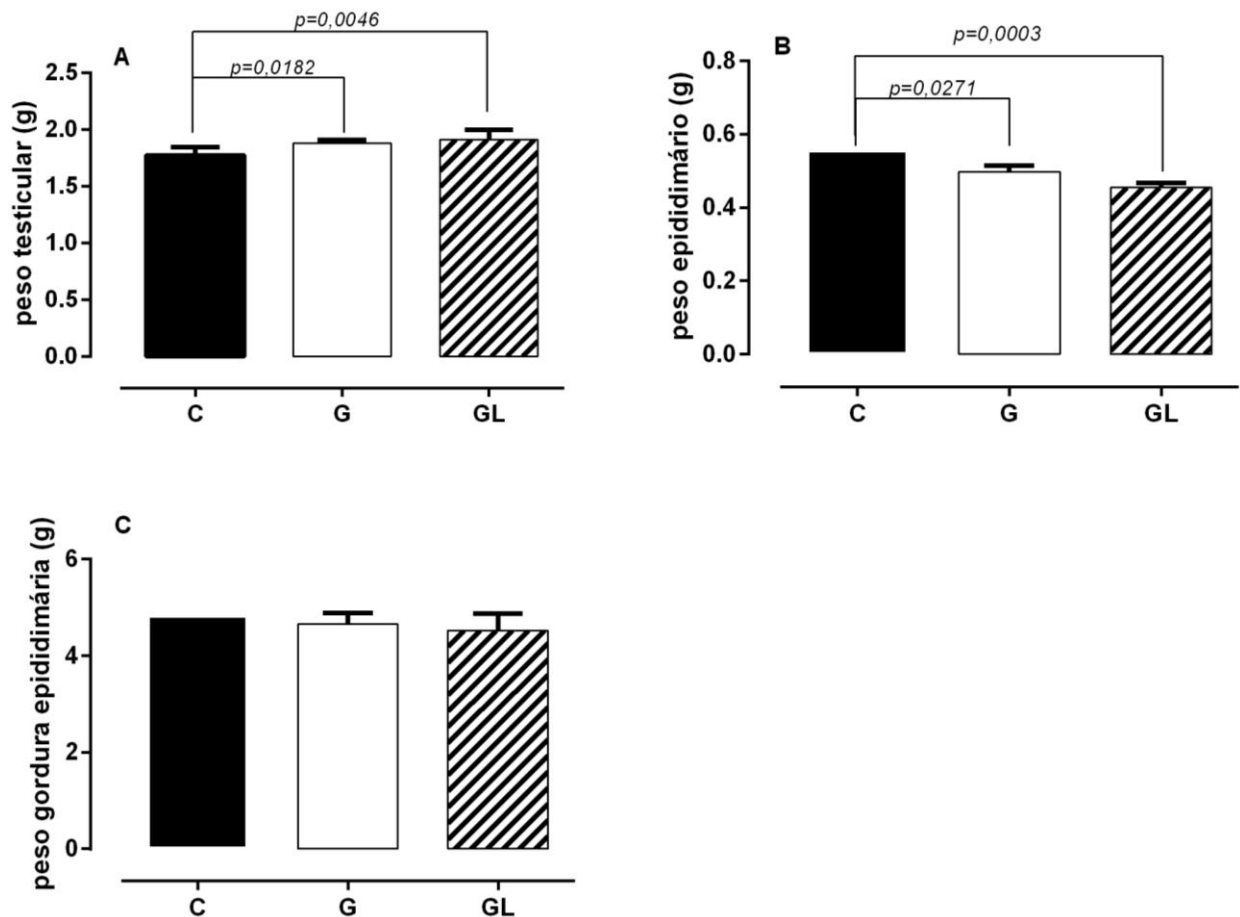
Figura 10 - Evolução da massa corporal (g) do dia 22-90 (A), comprimento linear do dia 22-90 (B); ingestão alimentar do dia 22-90 (C) e percentual de ganho de peso (D) dos animais do grupo controle (C), gestação (G) e gestação + lactação (GL). Valores expressos como média ± erro padrão de 8 animais por grupo



Fonte: A autora, 205.

Na vida adulta, o peso testicular dos animais foi significativamente aumentado ($p=0,0038$) enquanto o peso epididimário sofreu redução significativa ($p=0,0004$) em ambos os grupos que sofreram hipotireoidismo congênito quando comparados ao grupo controle. Em relação à gordura epididimária não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais. Esses dados estão apresentados na figura 11.

Figura 11 - Peso testicular (A), epididimário (B) e da gordura epididimária (C) dos animais do grupo controle (C), gestação (G) e gestação + lactação (GL) aos 90 dias de idade. Valores expressos como média \pm erro padrão de 8 animais por grupo

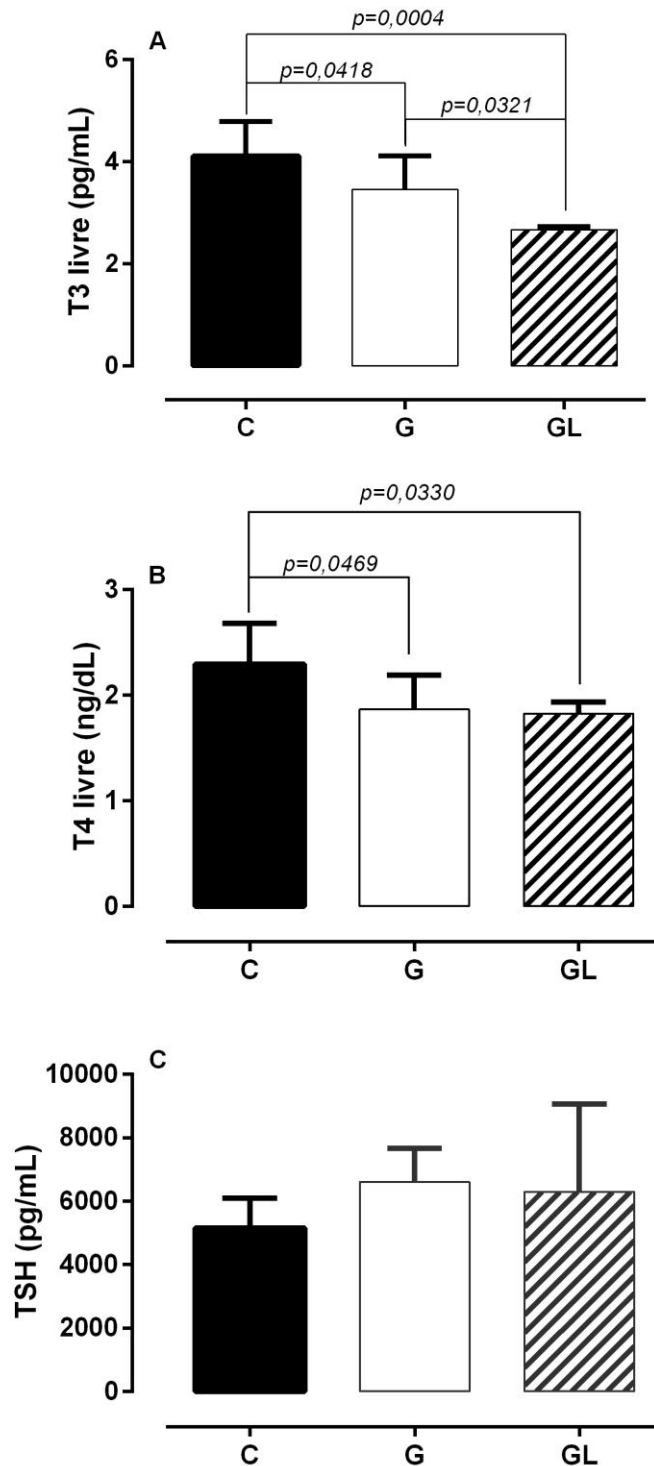


Fonte: A autora, 2015.

Na figura 12 são observados os resultados das concentrações séricas de hormônios tireoidianos e TSH da prole na vida adulta. O hipotireoidismo congênito levou a uma redução significativa nos níveis séricos de T3 ($p=0,0005$) e T4

($p=0,0200$) nos animais adultos de ambos os grupos, G e GL, enquanto TSH se manteve inalterado neste período.

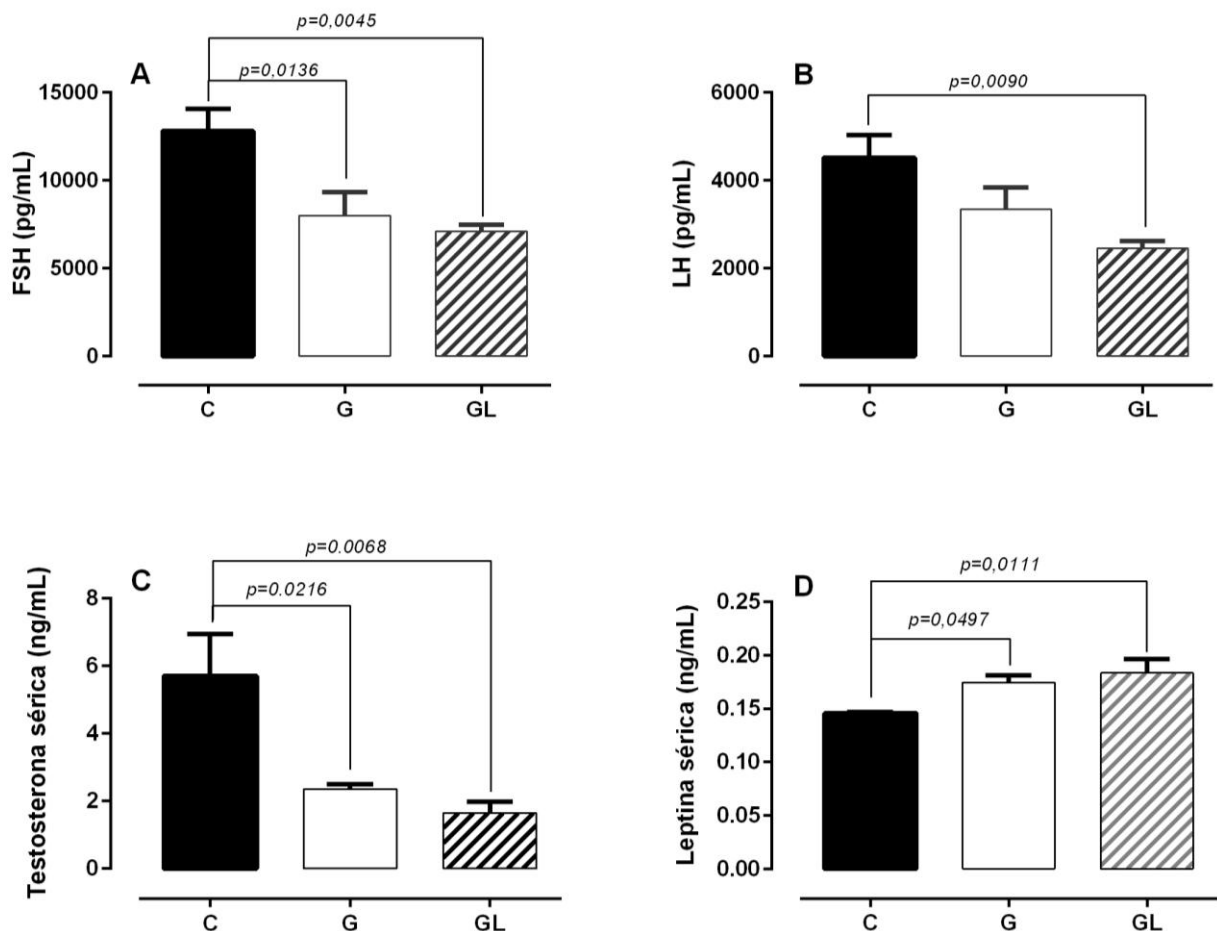
Figura 12 - Concentrações séricas de TSH (A), T3 livre (B) e T4 livre (C) dos animais do grupo controle (C), gestação (G) e gestação + lactação (GL) aos 90 dias de idade. Valores expressos como média \pm erro padrão de 6-8 animais por grupo



Fonte: A autora, 2015.

A figura 13 apresenta as concentrações séricas de testosterona, leptina e gonadotropinas dos animais do grupo C, G e GL aos 90 dias de idade. Em relação às gonadotropinas, observamos que o hipotireoidismo congênito levou a uma redução significativa das concentrações séricas de FSH em ambos os grupos, G e GL ($p=0,0033$). Porém, em relação ao LH, essa redução foi significativa apenas no grupo GL quando comparado ao C ($p=0,0103$). Quanto à testosterona, podemos observar uma redução significativa nos grupos submetidos hipotireoidismo congênito em relação ao controle ($p=0,0053$), enquanto a leptina sérica foi significativamente aumentada em ambos os grupos, G e GL quando comparados ao grupo controle ($p=0,0093$).

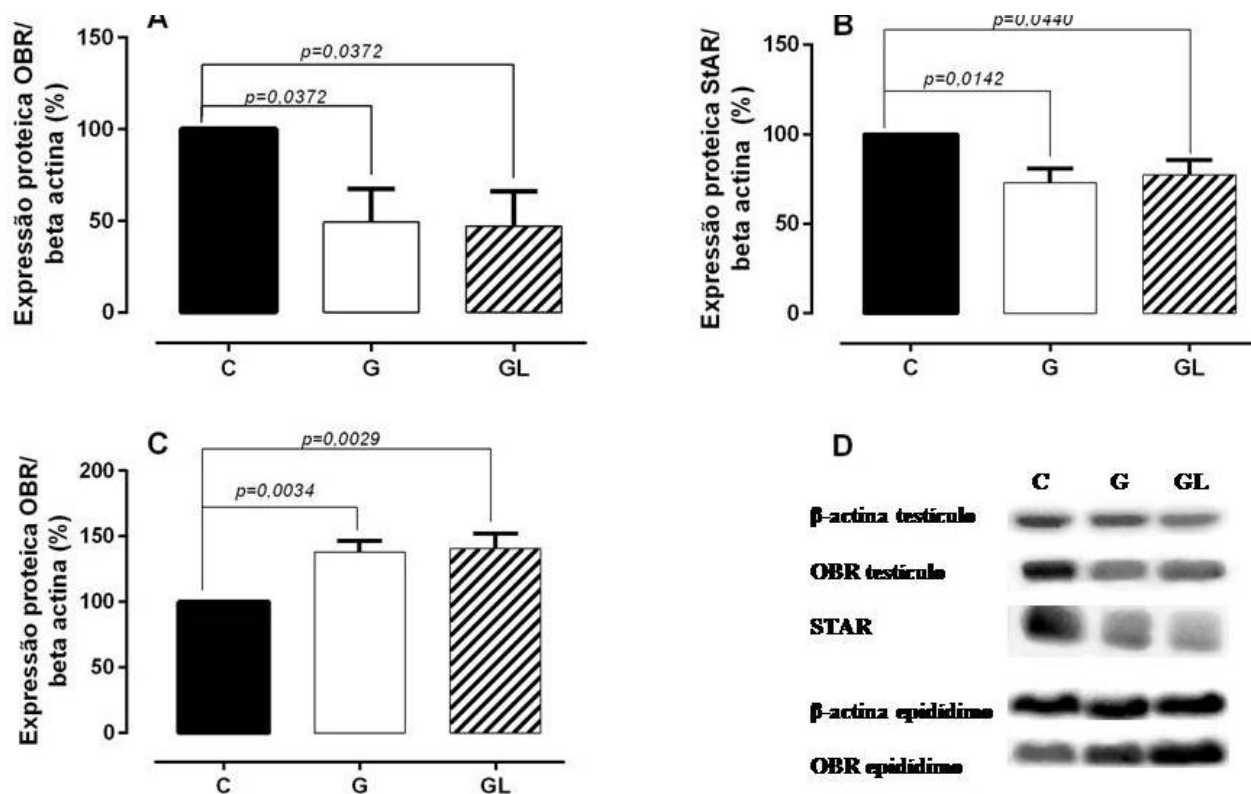
Figura 13 - Concentrações séricas de FSH (A), LH (B), testosterona (C) e leptina (D) dos animais do grupo controle (C), gestação (G) e gestação + lactação (GL) aos 90 dias de idade. Valores expressos como média \pm erro padrão de 6-8 animais por grupo



Fonte: A autora, 2015.

A figura 14 apresenta a expressão proteica do receptor da leptina e da proteína StAR no testículo, e do receptor de leptina na cauda do epidídimo dos animais aos 90 dias de idade. Os resultados mostram uma redução da expressão de OBR e STAR no testículo em ambos os grupos G e GL ($p=0,0169$ e $p=0,0111$, respectivamente) quando comparados ao C. No entanto na cauda do epidídimo foi observado um aumento na expressão proteica de OBR em ambos os grupos G e GL ($p=0,0011$) quando comparados ao C.

Figura 14 - Expressão proteica de OBR (A), de StAR (B) no testículo, de OBR na cauda do epidídimo (C) e bandas representativas das marcações pela técnica de *western blot* (D), dos animais do grupo controle (C), gestação (G) e gestação + lactação (GL) dos animais aos 90 dias de idade. Valores calculados como % do C e expressos como média \pm erro padrão de 8 animais por grupo

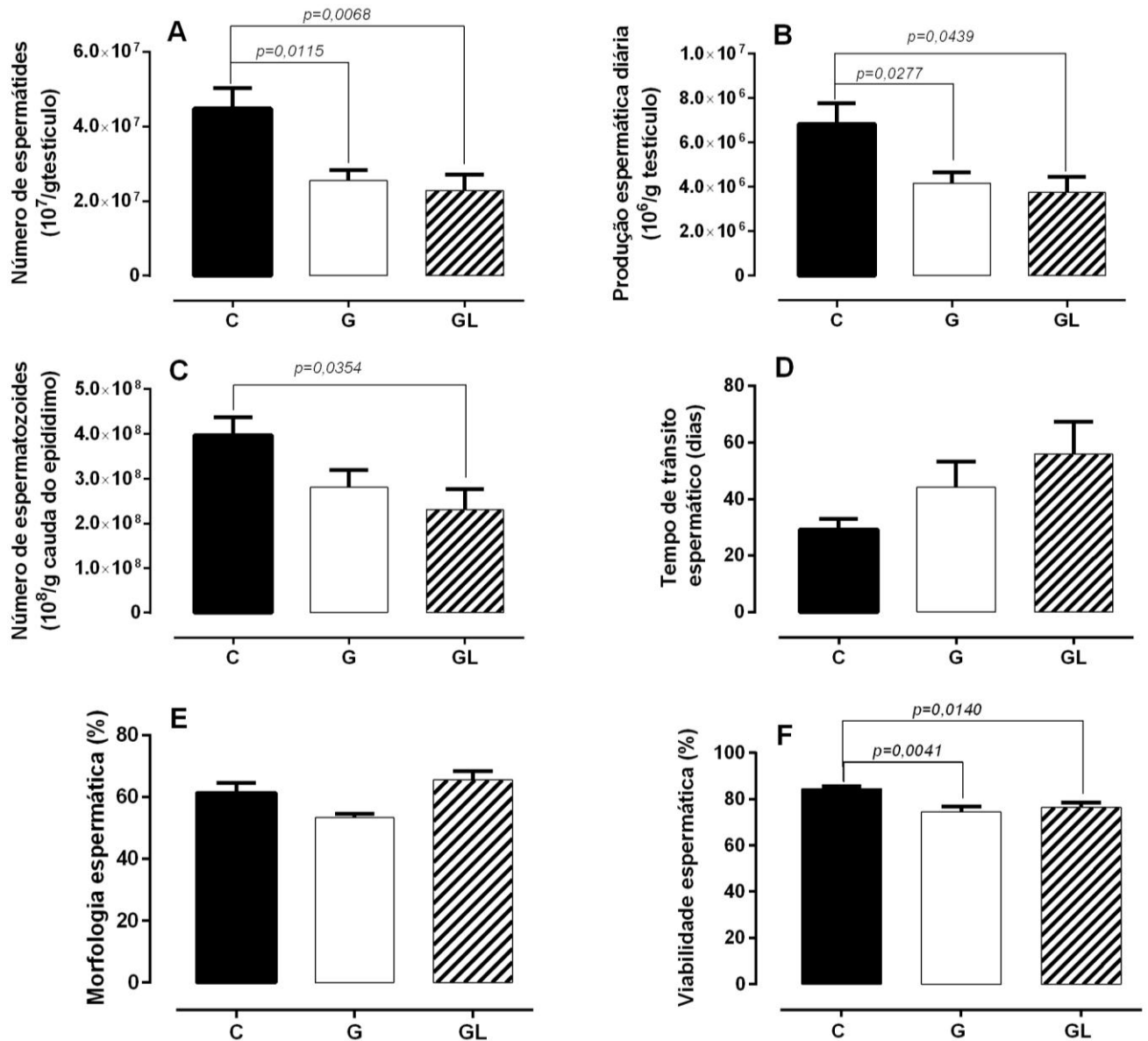


Fonte: A autora, 2015.

A contagem do número de espermátides totais no estágio 19 no testículo e de espermatozoides no epidídimo, a produção espermática diária, o tempo de trânsito espermático, bem como a viabilidade e morfologia dos espermatozoides na cauda

epididimária dos animais aos 90 dias de vida estão representados na figura 15. Pode ser observado que o hipotireoidismo congênito transitório induzido no início da vida reduziu significativamente o número das espermatídes no testículo ($p=0,0042$), bem como a produção espermática diária ($p=0,0178$). O número de espermatozoides totais na cauda do epidídimo foi significativamente reduzido apenas no grupo GL em relação ao grupo C ($p=0,0320$). Em relação à viabilidade dos espermatozoides, ambos os grupos G e GL, apresentaram porcentagem significativamente menor de células espermáticas viáveis ($p=0,0031$). A análise da morfologia dos espermatozoides e do tempo de trânsito espermático não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais estudados.

Figura 15 - Número de espermátides testiculares (A), Produção espermática diária (B), número de espermatozoides na cauda do epidídimo (C), tempo de trânsito espermático (D), Morfologia (E) e Viabilidade dos espermatozoides (F) dos animais do grupo controle (C), gestação (G) e gestação + lactação (GL) aos 90 dias de idade. Valores expressos como média \pm erro padrão de 8 animais por grupo



Fonte: A autora, 2015.

5 DISCUSSÃO

Devido ao efeito que as drogas antitireoidianas têm durante o período fetal-neonatal, PTU e MMI tem sido extensivamente utilizadas para induzir o hipotireoidismo congênito transitório (179-182). Neste estudo avaliamos os níveis de HT para confirmar a eficiência do tratamento com MMI. Nossos resultados mostram que no dia 0, progenitoras de ambos os grupos G e GL, apresentaram T3 e T4 reduzidos e níveis de TSH aumentados confirmando o quadro de hipotireoidismo. No dia 8, essas alterações só estavam presentes no grupo GL, devido à continuidade do tratamento nesse grupo e o retorno da tireóide na síntese de HT no grupo G. Esses dados confirmam a efetividade do MMI em induzir uma condição de hipotireoidismo nas progenitoras. O metimazol pode atravessar a barreira placentária (183) e também pode ser secretado no leite das progenitoras (184). Desta forma, os filhotes também são afetados pelo MMI. Neste trabalho confirmamos o hipotireoidismo pela análise da concentração sérica de TSH na prole. Ambos os grupos, G e GL, apresentaram altos níveis de TSH no dia 0, enquanto, conforme era esperado, este parâmetro estava aumentado no dia 8 somente no grupo GL. Com isso, podemos assegurar que o tratamento com MMI também foi eficiente em induzir o hipotireoidismo congênito transitório nos filhotes.

Hipotireoidismo congênito induzido do dia 9 de gestação e continuado até o dia 0 ou 8 pós-natal, resultou em alterações no peso corporal e crescimento linear da prole. Uma redução significativa na massa corporal e comprimento linear foi observada em ambos os grupos com hipotireoidismo congênito quando comparados ao controle, desde o nascimento da prole, persistindo até o período lactacional. Esses dados estão de acordo com a literatura (88, 166, 167, 185-187). Contudo, após o desmame, a massa corporal e o comprimento linear foram rapidamente normalizados no grupo G, enquanto no GL as alterações de massa corporal permaneceram até o dia 67 e o comprimento linear não foi normalizado até o momento do sacrifício. Essas alterações são dependentes da duração do tratamento, como sugerido por trabalhos prévios (179, 188-190).

É bem sabido que hormônios tireoidianos são essenciais para o crescimento e o desenvolvimento (191, 192). Podemos assumir que a redução da massa corporal e o comprimento linear são uma resposta direta à condição de hipotireoidismo

apresentada por esses animais (baixos níveis séricos de TSH). Podemos supor que as diferenças na massa corporal e no comprimento linear após o desmame entre os grupos G e GL sejam consequência da duração do tratamento com MMI, e que os animais do grupo GL, necessitaram de um tempo maior para alcançar o peso do grupo controle desde que o tratamento com MMI foi descontinuado no dia 8 de lactação. Alterações de peso corporal dependentes da duração do tratamento já foram sugeridas por outros autores (166, 184).

Embora, os hormônios tireoidianos sejam importantes determinantes da regulação do apetite, não foram observadas diferenças significativas na ingestão alimentar entre os grupos. A taxa de crescimento também foi a mesma para todos os grupos, o que provavelmente é um reflexo da ingestão alimentar. Esses dados sugerem que uma taxa de crescimento normal pode ter sido responsável pela recuperação gradual e normalização da massa corporal e comprimento linear de ambos os grupos com hipotireoidismo congênito. Em mamíferos, a administração periférica de T3 resulta em diminuição da massa corporal. Contudo, quando o hormônio tireoidiano é injetado no hipotálamo ocorre um aumento no apetite, resultando em ganho de massa corporal. Já foi descrito na literatura que em camundongos, jejum aumenta a produção local de T3 no ARC, levando à estimulação de neurônios orexígenos NPY/AgRP (193). Além disto, T3 exerce um *feedback* negativo na expressão hipotalâmica do MC4R (194), um mediador chave dos efeitos anoréticos da leptina (195).

Na vida adulta, os animais de ambos os grupos G e GL apresentaram uma condição de hipotireoidismo evidenciada por baixos níveis de hormônios tireoidianos, e níveis de TSH normais. Esses animais também apresentaram altos níveis séricos de leptina. Estudos prévios sugerem que a regulação da massa corporal na vida adulta é determinada em estágios iniciais da gestação e/ou lactação e poderia ser mediada por mudanças nos níveis séricos de hormônios tireoidianos e leptina. Esses hormônios poderiam regular um ponto chave para ingestão energética e a taxa metabólica em animais adultos (184, 196-198). Nossos dados mostram que neste modelo de hipotireoidismo, os mecanismos fundamentais para regulação do apetite e a taxa de crescimento dos animais adultos não são regulados pelos HT e leptina presentes na vida adulta. Nossos dados sugerem a possibilidade de uma programação metabólica no hipotálamo desses animais pelo insulto hormonal sofrido nos primeiros dias de vida. Acreditamos que possa estar ocorrendo um

mecanismo de resistência a leptina no hipotálamo desses animais na vida adulta tendo em vista que a massa corporal e ingestão alimentar dos animais se encontram normais independente das altas concentrações séricas de leptina.

Mudanças nos níveis séricos de hormônios tireoidianos durante o período perinatal podem afetar permanentemente a sensibilidade do eixo hipotálamo-hipófise a esses hormônios (199-201). Tem sido mostrado que animais submetidos ao hipertireoidismo durante os primeiros dias de vida apresentaram baixos níveis séricos de TSH e hormônios tireoidianos sugerindo uma programação metabólica (99, 201). Corroborando esses achados, nossos dados de baixos níveis séricos de T3 e T4 e níveis normais de TSH em ambos os grupos G e GL na vida adulta, sugerem que o hipotireoidismo congênito programou a glândula tireoide desses animais. Devido à incapacidade da hipófise em aumentar a secreção de TSH em resposta às baixas concentrações séricas de HT (feedback) podemos supor que o insulto hormonal no início da vida possa ter programado esta glândula.

Em modelos similares de hipotireoidismo congênito (42, 166, 184) ou neonatal (188) não são observados os mesmos resultados. Nesses estudos, apesar da função tireoidiana se mostrar afetada pelo hipotireoidismo induzido nos primeiros dias de vida, ela é normalizada antes do animal chegar na vida adulta. É possível que o período de indução do hipotireoidismo, a duração do tratamento e a dose de MMI usada para induzir o hipotireoidismo possam ter influenciado para as diferenças observadas entre os estudos.

Apesar de haver uma relação direta entre leptina sérica e massa de gordura absoluta, no modelo utilizado neste estudo observamos aumento de leptina sérica, sem alteração da massa de gordura. A falta de relação entre a massa de gordura epididimária e a concentração sérica de leptina poderia estar relacionada ao fato da massa de gordura epididimária não representar a massa total de gordura corporal responsável pela síntese de leptina. Outra hipótese seria a programação da síntese e secreção da leptina pelo insulto hormonal no início da vida.

Existe uma correlação inversa entre leptina e hormônios tireoidianos já descrita na literatura (152, 153). Podemos hipotetizar que em nosso modelo o aumento dos níveis séricos de leptina podem ter resultado de uma regulação direta dos baixos níveis de hormônios tireoidianos presentes nos animais adultos submetidos ao hipotireoidismo congênito. Outra explicação poderia ser que a síntese

e secreção da leptina pelo tecido adiposo possa ter sido programada pelo hipotireoidismo nos primeiros dias de vida.

Em relação ao eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, a leptina pode estimular a secreção de GnRH no hipotálamo (202), inibir a secreção de gonadotropinas pela hipófise (165, 203), além de ter um efeito negativo sobre a esteroidogênese no testículo (204). Portanto, nós poderíamos assumir que a leptina atuando negativamente em nível hipofisário poderia ser a responsável pelos baixos níveis séricos de FSH e LH nos animais submetidos ao hipotireoidismo congênito quando comparados ao grupo controle. Nossos achados de baixos níveis séricos de FSH e LH estão de acordo com alguns estudos que usaram modelos similares de hipotireoidismo neonatal (180, 205).

LH e FSH são os estímulos primários para a função testicular. Células de *Leydig*, sob a influência de LH, estimulam a esteroidogênese para produzir testosterona e estradiol, que tem um papel essencial na regulação da espermatogênese (8). No modelo de hipotireoidismo congênito usado neste estudo, houve uma redução significativa dos níveis séricos de testosterona. Para um melhor entendimento do processo de esteroidogênese, a expressão da proteína StAR foi também avaliada por *western blot*. Animais submetidos ao hipotireoidismo congênito apresentaram uma menor expressão desta proteína, o que, associada a baixos níveis de testosterona, sugere uma redução no processo de esteroidogênese possivelmente por menor estímulo de LH. Efeitos modulatórios dos hormônios tireoidianos na esteroidogênese testicular são bem compreendidos (91). Desta forma, baixos níveis de hormônios tireoidianos observados nos animais com hipotireoidismo congênito na vida adulta pode também ser responsáveis pela falta de estímulo na esteroidogênese, resultando em uma baixa expressão da proteína StAR e nos níveis séricos de testosterona.

No entanto, cabe ressaltar que níveis séricos de testosterona reduzidos levariam a um aumento na produção e secreção de LH, pelo mecanismo de *feedback* negativo. A falha nesse mecanismo associado à falha do *feedback* em resposta aos HT sugere uma programação da hipófise pelo insulto hormonal no início da vida. É possível que as baixas concentrações de gonadotropinas hipofisárias nos animais adultos estejam mais relacionadas a essa programação do que a possível resposta inibitória da leptina.

A leptina tem um papel chave na homeostase da massa corporal (20) e esta emergiu recentemente como um relevante mediador neuroendócrino em diferentes tipos celulares, incluindo células testiculares (204). Este hormônio parece agir inibindo a esteroidogênese testicular por inibir a secreção de testosterona (91, 206) e a expressão da enzima StAR (207). Assim, altos níveis de leptina associado com baixos níveis séricos de T3 e LH no hipotireoidismo congênito poderiam ser responsáveis pelo baixo estímulo da esteroidogênese que resultou em baixos níveis de testosterona sérica.

Membro da família das citocinas, OBR é conhecido por ser internalizado após a ligação aos sítios em endossomos iniciais, ser processado para a degradação ou reciclado para retornar a superfície celular (208). Apesar de não termos evidências diretas para provar nossa hipótese, poderíamos especular que os altos níveis de leptina presentes nos animais submetidos ao hipotireoidismo congênito podem ter causado *down regulation* dos receptores de leptina. Contudo, este processo regulatório não parece ocorrer a nível epididimário, uma vez que observamos um aumento na expressão proteica de OBR em ambos os grupos G e GL.

Apesar de não apresentarem diferença na massa corporal, no momento do sacrifício, observou-se alteração significativa no peso do epidídimo e do testículo em ambos os grupos com hipotireoidismo congênito. Esses achados estão de acordo com a literatura apesar da diferença dos modelos experimentais (188-190). Além disto, situações adversas no período inicial da vida, podem promover mudanças na programação original dos órgãos, especialmente aqueles em fase de desenvolvimento, podendo resultar em modificações no metabolismo a longo prazo. (126, 209-212).

Mudança no peso dos órgãos reprodutivos pode resultar em alterações da fertilidade. FSH, LH e testosterona são importantes hormônios que estimulam e mantêm a espermatogênese (8, 91). O número de espermátides presentes no testículo e a eficiência da produção espermática diária são importantes indicadores do potencial de fertilidade masculina (213). Nossos resultados sugerem que a diminuição dos níveis séricos de FSH, LH e testosterona poderiam ser responsáveis pelo número reduzido de espermátides presentes no testículo e DSP exibidos nos animais adultos submetidos ao hipotireoidismo no início da vida e que esses animais poderiam apresentar um potencial de fertilidade reduzido.

Espermatozoides que saem dos testículos são altamente diferenciados, mas funcionalmente imaturos. Essas células necessitam ainda de uma maturação dentro do epidídimo para adquirir a capacidade de fertilizar o ovócito (214). Os epidídimos são altamente dependentes de androgênios (215, 216) e apresentam redução de 25% no seu peso após a castração. Esta alteração é revertida pela administração de testosterona (217). O epidídimo também está sob regulação de gonadotropinas e andrógenos (44, 218-220). Este fato sugere que a redução nos níveis séricos de testosterona e gonadotropinas nos animais submetidos ao hipotireoidismo congênito poderiam afetar diretamente o peso epididimário e o número de espermatozoides. Além disso, como a região da cauda do epidídimo funciona como um sítio de estocagem para espermatozoides funcionalmente maduros, podemos sugerir que esta função é reduzida pelo hipotireoidismo congênito já que o número de espermatozoides na cauda do epidídimo está reduzido nestes animais.

Embora o tempo de trânsito espermático através do epidídimo tenha um papel importante na maturação dos espermatozoides, a qualidade do esperma e potencial de fertilidade parecem não ser prejudicados quando o tempo de trânsito através do epidídimo é modificado (221, 222). Durante a migração dos espermatozoides da região proximal para a distal do epidídimo, estes passam por uma série de mudanças morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, que resultam na aquisição progressiva da motilidade e habilidade para fertilizar o ovócito (223). Neste estudo observamos que o hipotireoidismo congênito levou a redução da viabilidade dos espermatozoides sem, no entanto, alterar sua morfologia. A redução da viabilidade resulta na falência do espermatozoide em conseguir regular seu volume em condições hipo-osmóticas, o que o torna não apto para fertilização (224). Apesar do hipotireoidismo congênito não ter alterado a morfologia dos espermatozoides, acreditamos que o número reduzido de espermatozoides, associado a menor produção diária e menor viabilidade, sejam fatores suficientes para contribuir negativamente para o potencial de fertilidade desses animais.

Alguns estudos tem mostrado que o epidídimo, bem como o testículo, apresenta receptores para a leptina (126, 128), embora o papel fisiológico deste hormônio não tenha sido ainda determinado. Nossos resultados mostram que o hipotireoidismo congênito leva a um aumento na expressão de OBR na cauda do epidídimo. Poderíamos especular que os efeitos observados na fertilidade, relativos a esse órgão (estoque de espermatozoide e DSP) são consequentes à ação da

leptina e da testosterona no tecido. No entanto, mais estudos são necessários para se determinar qual o papel efetivo da leptina no epidídimo.

Em suma, no modelo utilizado nesse estudo, o insulto hormonal no início da vida (hipotireoidismo congênito) parece ter programado diversos órgãos. As baixas concentrações séricas de HT associado à TSH normal sugere programação do eixo hipotálamo-hipofise-tireóide da mesma forma que baixas concentrações de LH e FSH associadas à baixa testosterona sérica sugerem programação do eixo hipotálamo-hipofise-gônada. Além disto, a hiperleptinemia presente nesses animais sugere programação do tecido adiposo. A falha no mecanismo de feedback em resposta aos HT e testosterona sugere uma programação direta da hipófise da mesma forma que a falência na síntese dos HT sugere uma programação direta da tireoide. No entanto, não podemos afirmar que a gônada tenha sido programada diretamente pelo insulto hormonal no início da vida visto que a falta de estímulo pelos HT e de gonadotropinas associada ao efeito inibitório da leptina podem justificar a redução da função testicular que culminou em menor potencial de fertilidade. No entanto, esses dados não permitem isolar os efeitos de cada hormônio na função gonadal e assim determinar a importância de cada um isoladamente na alteração da fertilidade.

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que o hipotireoidismo congênito transitório programou a função tireoidiana, evidenciada pela redução das concentrações de HT, associado a um quadro de hiperleptinemia e depleção de LH e FSH pela hipófise nos animais na vida adulta, que culminam em um potencial de fertilidade alterado.

REFERÊNCIAS

1. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS medicine*. 2012;9(12):e1001356.
2. Mesquita RAS, Cedinho AP, Haddad Filho J, Freitas V, Sakai AT. Infertilidade conjugal: histerossalpingografia, avaliação hormonal e ultrassonografia nas mulheres com ciclo menstrual regular. *A Folha Médica da UNIFESP*. 2000;119(2):5.
3. Plotton I, Giscard d'Estaing S, Cuzin B, Brosse A, Benchaib M, Lornage J, et al. Preliminary results of a prospective study of testicular sperm extraction in young versus adult patients with nonmosaic 47,XXY Klinefelter syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100(3):961-7.
4. Caroppo E, Niederberger C, Elhanbly S, Schoor R, Ross L, D'Amato G. Effect of cryptorchidism and retractile testes on male factor infertility: a multicenter, retrospective, chart review. *Fertility and sterility*. 2005;83(5):1581-4.
5. Crosnoe-Shipley LE, Elkelany OO, Rahnema CD, Kim ED. Treatment of hypogonadotropic male hypogonadism: Case-based scenarios. *World journal of nephrology*. 2015;4(2):245-53.
6. Samplaski MK, Loai Y, Wong K, Lo KC, Grober ED, Jarvi KA. Testosterone use in the male infertility population: prescribing patterns and effects on semen and hormonal parameters. *Fertility and sterility*. 2014;101(1):64-9.
7. Jannini EA, Ulisse S, D'Armiento M. Thyroid hormone and male gonadal function. *Endocrine reviews*. 1995;16(4):443-59.
8. Mendis-Handagama SM, Siril Ariyaratne HB. Leydig cells, thyroid hormones and steroidogenesis. *Indian J Exp Biol*. 2005;43(11):939-62.
9. Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*. 1988;122(3):787-94.
10. Duntas LH. Thyroid disease and lipids. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2002;12(4):287-93.
11. Mitchell ML, Hsu HW, Sahai I, Massachusetts Pediatric Endocrine Work G. The increased incidence of congenital hypothyroidism: fact or fancy? *Clinical endocrinology*. 2011;75(6):806-10.
12. Delahunty C, Falconer S, Hume R, Jackson L, Midgley P, Mirfield M, et al. Levels of neonatal thyroid hormone in preterm infants and

- neurodevelopmental outcome at 5 1/2 years: millennium cohort study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(11):4898-908.
13. Raymond J, LaFranchi SH. Fetal and neonatal thyroid function: review and summary of significant new findings. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2010;17(1):1-7.
 14. Quennell JH, Mulligan AC, Tups A, Liu X, Phipps SJ, Kemp CJ, et al. Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. *Endocrinology*. 2009;150(6):2805-12.
 15. Ramos CF, Zamoner A. Thyroid hormone and leptin in the testis. *Frontiers in endocrinology*. 2014;5:198.
 16. Afifi AK, Bergman RA. *Neuroanatomia funcional*. 2ª ed2008. 536 p.
 17. Haymaker W, Anderson E, Nauta WJH. *The hypothalamus*. Springfield: Charles C Thomas; 1969.
 18. Campbell RE, Gaidamaka G, Han SK, Herbison AE. Dendro-dendritic bundling and shared synapses between gonadotropin-releasing hormone neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(26):10835-40.
 19. Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nature neuroscience*. 2003;6(7):736-42.
 20. Bouret SG, Simerly RB. Minireview: Leptin and development of hypothalamic feeding circuits. *Endocrinology*. 2004;145(6):2621-6.
 21. Patterson CM, Bouret SG, Park S, Irani BG, Dunn-Meynell AA, Levin BE. Large litter rearing enhances leptin sensitivity and protects selectively bred diet-induced obese rats from becoming obese. *Endocrinology*. 2010;151(9):4270-9.
 22. Jin JM, Yang WX. Molecular regulation of hypothalamus-pituitary-gonads axis in males. *Gene*. 2014;551(1):15-25.
 23. Rangaraju NS, Xu JF, Harris RB. Pro-gonadotropin-releasing hormone protein is processed within hypothalamic neurosecretory granules. *Neuroendocrinology*. 1991;53(1):20-8.
 24. Wetsel WC, Srinivasan S. Pro-GnRH processing. *Progress in brain research*. 2002;141:221-41.
 25. Sharpe RM. Local control of testicular function. *Quarterly journal of experimental physiology*. 1983;68(3):265-87.

26. Weiss J, Cote CR, Jameson JL, Crowley WF, Jr. Homologous desensitization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-stimulated luteinizing hormone secretion in vitro occurs within the duration of an endogenous GnRH pulse. *Endocrinology*. 1995;136(1):138-43.
27. Alan J Wein, Louis R Kavoussi, Andrew C Novick, Alan W Partin, Peters. CA. *Campbell's Urology*. ed, editor. Philadelphia: Elsevier; 2012. 4320 p.
28. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. ed., editor. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. 540 p.
29. Griffin JE. Androgen resistance--the clinical and molecular spectrum. *The New England journal of medicine*. 1992;326(9):611-8.
30. Sharpe R. Regulation of spermatogenesis. In: Press R, editor. *The Physiology of Reproduction*: Knobil E Neill JD; 1994. p. 1363–434.
31. Hughes IA, Lim HN, Martin H, Mongan NP, Dovey L, Ahmed SF, et al. Developmental aspects of androgen action. *Molecular and cellular endocrinology*. 2001;185(1-2):33-41.
32. Sultan C, Poujol N, Gobinet J. [Acne. The molecular action of androgens]. *Annales de dermatologie et de venerologie*. 2001;128 Supp 1:S7-9.
33. Hill CM, Anway MD, Zirkin BR, Brown TR. Intratesticular androgen levels, androgen receptor localization, and androgen receptor expression in adult rat Sertoli cells. *Biology of reproduction*. 2004;71(4):1348-58.
34. Sharpe RM. Phthalate exposure during pregnancy and lower anogenital index in boys: wider implications for the general population? *Environmental health perspectives*. 2005;113(8):A504-5.
35. Sharpe RM, Kerr JB, McKinnell C, Millar M. Temporal relationship between androgen-dependent changes in the volume of seminiferous tubule fluid, lumen size and seminiferous tubule protein secretion in rats. *Journal of reproduction and fertility*. 1994;101(1):193-8.
36. Akingbemi BT. Estrogen regulation of testicular function. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2005;3:51.
37. Tilbrook AJ, Clarke IJ. Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. *Biology of reproduction*. 2001;64(3):735-42.
38. de Kretser DM, Buzzard JJ, Okuma Y, O'Connor AE, Hayashi T, Lin SY, et al. The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. *Molecular and cellular endocrinology*. 2004;225(1-2):57-64.
39. Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS, et al. Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes:

- an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(6):2536-59.
40. Mohr BA, Guay AT, O'Donnell AB, McKinlay JB. Normal, bound and nonbound testosterone levels in normally ageing men: results from the Massachusetts Male Ageing Study. *Clinical endocrinology*. 2005;62(1):64-73.
 41. Russell LD, Kershaw M, Borg KE, El Shennawy A, Rulli SS, Gates RJ, et al. Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: FSH maintenance of cellular viability during pubertal spermatogenesis. *Journal of andrology*. 1998;19(3):308-19; discussion 41-2.
 42. Kala N, Ravisankar B, Govindarajulu P, Aruldas MM. Impact of foetal-onset hypothyroidism on the epididymis of mature rats. *International journal of andrology*. 2002;25(3):139-48.
 43. Silver RI, Wiley EL, Davis DL, Thigpen AE, Russell DW, McConnell JD. Expression and regulation of steroid 5 alpha-reductase 2 in prostate disease. *The Journal of urology*. 1994;152(2 Pt 1):433-7.
 44. Cabrera-Sharp V, Mirczuk SM, Shervill E, Michael AE, Fowkes RC. Regulation of glucocorticoid metabolism in the boar testis and caput epididymidis by the gonadotrophin-cAMP signalling pathway. *Cell and tissue research*. 2013;352(3):751-60.
 45. Mariani S, Salvatori L, Basciani S, Arizzi M, Franco G, Petrangeli E, et al. Expression and cellular localization of follicle-stimulating hormone receptor in normal human prostate, benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *The Journal of urology*. 2006;175(6):2072-7; discussion 7.
 46. Avram C, Yeung CH, Nieschlag E, Cooper TG. Regulation of the initial segment of the murine epididymis by dihydrotestosterone and testicular exocrine secretions studied by expression of specific proteins and gene expression. *Cell and tissue research*. 2004;317(1):13-22.
 47. Cosentino MJ, Cockett AT. Structure and function of the epididymis. *Urological research*. 1986;14(5):229-40.
 48. Hamilton DW. Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymidis and ductus deferens in the rat. *American Physiological Society*. 1975; Vol 5.(7):42.
 49. Dacheux JL, Belghazi M, Lanson Y, Dacheux F. Human epididymal secretome and proteome. *Molecular and cellular endocrinology*. 2006;250(1-2):36-42.
 50. Joseph A, Shur BD, Hess RA. Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. *Biology of reproduction*. 2011;84(2):207-17.

51. Cornwall GA, Hsia N. [Cres (cystatin-related epididymal spermatogenic) gene regulation and function]. *Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology*. 2002;8(5):313-8.
52. Hermo L, Jacks D. Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. *Molecular reproduction and development*. 2002;63(3):394-410.
53. Damm OS, Cooper TG. Maturation of sperm volume regulation in the rat epididymis. *Asian journal of andrology*. 2010;12(4):578-90.
54. Fox CS, Pencina MJ, D'Agostino RB, Murabito JM, Seely EW, Pearce EN, et al. Relations of thyroid function to body weight: cross-sectional and longitudinal observations in a community-based sample. *Archives of internal medicine*. 2008;168(6):587-92.
55. Iwen KA, Schroder E, Brabant G. Thyroid hormones and the metabolic syndrome. *European thyroid journal*. 2013;2(2):83-92.
56. Knudsen N, Laurberg P, Rasmussen LB, Bulow I, Perrild H, Ovesen L, 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 and metabolism*. 2005;90(7):4019-24.
57. Smith JW, Evans AT, Costall B, Smythe JW. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2002;26(1):45-60.
58. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological reviews*. 2001;81(3):1097-142.
59. Friesema EC, Jansen J, Visser TJ. Thyroid hormone transporters. *Biochemical Society transactions*. 2005;33(Pt 1):228-32.
60. Vitale G, Salvioli S, Franceschi C. Oxidative stress and the ageing endocrine system. *Nature reviews Endocrinology*. 2013;9(4):228-40.
61. Fekete C, Gereben B, Doleschall M, Harney JW, Dora JM, Bianco AC, et al. Lipopolysaccharide induces type 2 iodothyronine deiodinase in the mediobasal hypothalamus: implications for the nonthyroidal illness syndrome. *Endocrinology*. 2004;145(4):1649-55.
62. Smith JC, Bennett S, Evans LM, Kynaston HG, Parmar M, Mason MD, et al. The effects of induced hypogonadism on arterial stiffness, body composition, and metabolic parameters in males with prostate cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(9):4261-7.
63. Nussey S, Whitehead S. *Endocrinology: An Integrated Approach*. Oxford 2001.

64. Fekete C, Legradi G, Mihaly E, Huang QH, Tatro JB, Rand WM, et al. alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(4):1550-8.
65. Fekete C, Mihaly E, Luo LG, Kelly J, Clausen JT, Mao Q, et al. Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(24):9224-34.
66. Harris M, Aschkenasi C, Elias CF, Chandrankunnel A, Nillni EA, Bjoorbaek C, et al. Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(1):111-20.
67. Perello M, Friedman T, Paez-Espinosa V, Shen X, Stuart RC, Nillni EA. Thyroid hormones selectively regulate the posttranslational processing of prothyrotropin-releasing hormone in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology*. 2006;147(6):2705-16.
68. Toni R, Jackson IM, Lechan RM. Thyrotropin-releasing-hormone-immunoreactive innervation of thyrotropin-releasing-hormone-tuberoinfundibular neurons in rat hypothalamus: anatomical basis to suggest ultrashort feedback regulation. *Neuroendocrinology*. 1990;52(5):422-8.
69. Kuiper GG, Kester MH, Peeters RP, Visser TJ. Biochemical mechanisms of thyroid hormone deiodination. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2005;15(8):787-98.
70. Bianco AC, Kim BW. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(10):2571-9.
71. Menegaz D, Royer C, Rosso A, Souza AZ, Santos AR, Silva FR. Rapid stimulatory effect of thyroxine on plasma membrane transport systems: calcium uptake and neutral amino acid accumulation in immature rat testis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2010;42(6):1046-51.
72. Zanatta AP, Zanatta L, Goncalves R, Zamoner A, Silva FR. Rapid responses to reverse T(3) hormone in immature rat Sertoli cells: calcium uptake and exocytosis mediated by integrin. *PLoS one*. 2013;8(10):e77176.
73. Zanatta AP, Zanatta L, Goncalves R, Zamoner A, Silva FR. Integrin participates in the effect of thyroxine on plasma membrane in immature rat testis. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1830(3):2629-37.

74. Visser WE, Friesema EC, Jansen J, Visser TJ. Thyroid hormone transport in and out of cells. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2008;19(2):50-6.
75. Hardy MP, Sharma RS, Arambepola NK, Sottas CM, Russell LD, Bunick D, et al. Increased proliferation of Leydig cells induced by neonatal hypothyroidism in the rat. *Journal of andrology*. 1996;17(3):231-8.
76. Pizzagalli F, Hagenbuch B, Stieger B, Klenk U, Folkers G, Meier PJ. Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter. *Molecular endocrinology*. 2002;16(10):2283-96.
77. Tagami T, Nakamura H, Sasaki S, Mori T, Yoshioka H, Yoshida H, et al. Immunohistochemical localization of nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptor proteins in rat tissues studied with antiserum against C-ERB A/T3 receptor. *Endocrinology*. 1990;127(4):1727-34.
78. Suzuki T, Onogawa T, Asano N, Mizutamari H, Mikkaichi T, Tanemoto M, et al. Identification and characterization of novel rat and human gonad-specific organic anion transporters. *Molecular endocrinology*. 2003;17(7):1203-15.
79. O'Shea PJ, Williams GR. Insight into the physiological actions of thyroid hormone receptors from genetically modified mice. *The Journal of endocrinology*. 2002;175(3):553-70.
80. Jannini EA, Crescenzi A, Rucci N, Screponi E, Carosa E, de Matteis A, et al. Ontogenetic pattern of thyroid hormone receptor expression in the human testis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000;85(9):3453-7.
81. Arambepola NK, Bunick D, Cooke PS. Thyroid hormone and follicle-stimulating hormone regulate Mullerian-inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in cultured neonatal rat Sertoli cells. *Endocrinology*. 1998;139(11):4489-95.
82. Buzzard JJ, Morrison JR, O'Bryan MK, Song Q, Wreford NG. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biology of reproduction*. 2000;62(3):664-9.
83. Canale D, Agostini M, Giorgilli G, Caglieresi C, Scartabelli G, Nardini V, et al. Thyroid hormone receptors in neonatal, prepubertal, and adult rat testis. *Journal of andrology*. 2001;22(2):284-8.
84. Rao JN, Liang JY, Chakraborti P, Feng P. Effect of thyroid hormone on the development and gene expression of hormone receptors in rat testes in vivo. *Journal of endocrinological investigation*. 2003;26(5):435-43.

85. Holsberger DR, Kiesewetter SE, Cooke PS. Regulation of neonatal Sertoli cell development by thyroid hormone receptor alpha1. *Biology of reproduction*. 2005;73(3):396-403.
86. Cooke PS, Zhao YD, Bunick D. Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. *Biology of reproduction*. 1994;51(5):1000-5.
87. Del Rio AG, Blanco AM, Pignataro O, Niepomniszcz H, Juvenal G, Pisarev MA. High-affinity binding of T3 to epididymis nuclei. *Archives of andrology*. 2000;44(3):187-91.
88. Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB. Effects of thyroid hormones on Leydig cells in the postnatal testis. *Histology and histopathology*. 2004;19(3):985-97.
89. Holsberger DR, Cooke PS. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell and tissue research*. 2005;322(1):133-40.
90. ter Horst GJ, Luiten PG. The projections of the dorsomedial hypothalamic nucleus in the rat. *Brain research bulletin*. 1986;16(2):231-48.
91. Maran RR. Thyroid hormones: their role in testicular steroidogenesis. *Archives of andrology*. 2003;49(5):375-88.
92. Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, et al. The stomach is a source of leptin. *Nature*. 1998;394(6695):790-3.
93. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, et al. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nature medicine*. 1997;3(9):1029-33.
94. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425-32.
95. Duclos M. [Effects of physical training on endocrine functions]. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2001;62(1 Pt 1):19-32.
96. Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nature genetics*. 1998;18(3):213-5.
97. Calvino C, Souza LL, Costa-e-Sousa RH, Almeida NA, Trevenzoli IH, Pazos-Moura CC. Hypothyroidism reduces ObRb-STAT3 leptin signalling in the hypothalamus and pituitary of rats associated with resistance to leptin acute anorectic action. *The Journal of endocrinology*. 2012;215(1):129-35.

98. Groba C, Mayerl S, van Mullem AA, Visser TJ, Darras VM, Habenicht AJ, et al. Hypothyroidism compromises hypothalamic leptin signaling in mice. *Molecular endocrinology*. 2013;27(4):586-97.
99. Moura EG, Santos RS, Lisboa PC, Alves SB, Bonomo IT, Fagundes AT, et al. Thyroid function and body weight programming by neonatal hyperthyroidism in rats - the role of leptin and deiodinase activities. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2008;40(1):1-7.
100. Dalamaga M, Chou SH, Shields K, Papageorgiou P, Polyzos SA, Mantzoros CS. Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: current evidence and therapeutic perspectives. *Cell metabolism*. 2013;18(1):29-42.
101. Ahima RS, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2000;21(3):263-307.
102. Campfield LA, Smith FJ, Burn P. The OB protein (leptin) pathway--a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 1996;28(12):619-32.
103. Hickey MS, Houmard JA, Considine RV, Tyndall GL, Midgette JB, Gavigan KE, et al. Gender-dependent effects of exercise training on serum leptin levels in humans. *The American journal of physiology*. 1997;272(4 Pt 1):E562-6.
104. Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 1996;379(6566):632-5.
105. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995;83(7):1263-71.
106. Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH. A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS letters*. 1996;392(2):87-90.
107. Cirillo D, Rachiglio AM, la Montagna R, Giordano A, Normanno N. Leptin signaling in breast cancer: an overview. *Journal of cellular biochemistry*. 2008;105(4):956-64.
108. Bluher S, Mantzoros CS. Leptin in reproduction. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2007;14(6):458-64.
109. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11(8):327-32.
110. Tartaglia LA. The leptin receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(10):6093-6.

111. Myers MG, Jr. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Recent progress in hormone research*. 2004;59:287-304.
112. Hegyi K, Fulop K, Kovacs K, Toth S, Falus A. Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell biology international*. 2004;28(3):159-69.
113. Fruhbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *The Biochemical journal*. 2006;393(Pt 1):7-20.
114. Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, Gualillo O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nature clinical practice Rheumatology*. 2007;3(12):716-24.
115. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 1996;382(6588):250-2.
116. Spicer LJ. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domest Anim Endocrinol*. 2001;21(4):251-70.
117. Kitawaki J, Kusuki I, Koshihara H, Tsukamoto K, Honjo H. Leptin directly stimulates aromatase activity in human luteinized granulosa cells. *Molecular human reproduction*. 1999;5(8):708-13.
118. Almog B, Gold R, Tajima K, Dantes A, Salim K, Rubinstein M, et al. Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the onset of puberty in immature rats. *Molecular and cellular endocrinology*. 2001;183(1-2):179-91.
119. Ruiz-Cortes ZT, Martel-Kennes Y, Gevry NY, Downey BR, Palin MF, Murphy BD. Biphasic effects of leptin in porcine granulosa cells. *Biol Reprod*. 2003;68(3):789-96.
120. Sirotkin AV, Mlyncek M, Kotwica J, Makarevich AV, Florkovicova I, Hetenyi L. Leptin directly controls secretory activity of human ovarian granulosa cells: possible inter-relationship with the IGF/IGFBP system. *Horm Res*. 2005;64(4):198-202.
121. Duggal PS, Weitsman SR, Magoffin DA, Norman RJ. Expression of the long (OB-RB) and short (OB-RA) forms of the leptin receptor throughout the oestrous cycle in the mature rat ovary. *Reproduction*. 2002;123(6):899-905.
122. Spicer LJ, Chamberlain CS, Francisco CC. Ovarian action of leptin: effects on insulin-like growth factor-I-stimulated function of granulosa and thecal cells. *Endocrine*. 2000;12(1):53-9.
123. Kikuchi N, Andoh K, Abe Y, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y. Inhibitory action of leptin on early follicular growth differs in immature and adult female mice. *Biology of reproduction*. 2001;65(1):66-71.

124. Tena-Sempere M, Pinilla L, Gonzalez LC, Dieguez C, Casanueva FF, Aguilar E. Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis in vitro. *The Journal of endocrinology*. 1999;161(2):211-8.
125. El-Hefnawy T, Ioffe S, Dym M. Expression of the leptin receptor during germ cell development in the mouse testis. *Endocrinology*. 2000;141(7):2624-30.
126. Gombar FM, Ramos CF. Perinatal malnutrition programs gene expression of leptin receptors isoforms in testis and prostate of adult rats. *Regulatory peptides*. 2013;184:115-20.
127. Herrid M, Xia Y, O'Shea T, McFarlane JR. Leptin inhibits basal but not gonadotrophin-stimulated testosterone production in the immature mouse and sheep testis. *Reproduction, fertility, and development*. 2008;20(4):519-28.
128. Rago V, Aquila S, Guido C, Carpino A. Leptin and its receptor are expressed in the testis and in the epididymis of young and adult pigs. *Anatomical record*. 2009;292(5):736-45.
129. Tena-Sempere M, Manna PR, Zhang FP, Pinilla L, Gonzalez LC, Dieguez C, et al. Molecular mechanisms of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptin-induced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression. *The Journal of endocrinology*. 2001;170(2):413-23.
130. Alves-Pereira JL, Colli S, Marques DS, Sampaio FJ, Ramos CF. Molecular and morphometric analysis of the rat ventral prostate injected with leptin. *Regulatory peptides*. 2012;176(1-3):6-12.
131. Colli S, Silveira Cavalcante F, Peixoto Martins M, Sampaio FJ, da Fonte Ramos C. Leptin role in the rat prostate ventral lobe. *Fertility and sterility*. 2011;95(4):1490-3 e1.
132. Leze E, Alves-Pereira JL, Colli S, Cavalcante FS, Jose Sampaio F, da Fonte Ramos C. Leptin regulates proliferation and apoptosis in human prostate. *TheScientificWorldJournal*. 2012;2012:842301.
133. Malendowicz W, Rucinski M, Belloni AS, Ziolkowska A, Nussdorfer GG, Kwias Z. Real-time PCR analysis of leptin and leptin receptor expression in the rat prostate, and effects of leptin on prostatic acid phosphatase release. *International journal of molecular medicine*. 2006;18(6):1097-100.
134. Malendowicz W, Rucinski M, Macchi C, Spinazzi R, Ziolkowska A, Nussdorfer GG, et al. Leptin and leptin receptors in the prostate and seminal vesicles of the adult rat. *International journal of molecular medicine*. 2006;18(4):615-8.
135. Engelbregt MJ, van Weissenbruch MM, Popp-Snijders C, Lips P, Delemarre-van de Waal HA. Body mass index, body composition, and leptin at onset of puberty in male and female rats after intrauterine growth retardation and after early postnatal food restriction. *Pediatric research*. 2001;50(4):474-8.

136. Fauser BC, Van Heusden AM. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev.* 1997;18(1):71-106.
137. Chan JL, Mantzoros CS. Leptin and the hypothalamic-pituitary regulation of the gonadotropin-gonadal axis. *Pituitary.* 2001;4(1-2):87-92.
138. Rondini TA, Baddini SP, Sousa LF, Bittencourt JC, Elias CF. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript neurons project to areas expressing gonadotropin releasing hormone immunoreactivity and to the anteroventral periventricular nucleus in male and female rats. *Neuroscience.* 2004;125(3):735-48.
139. Caprio M, Isidori AM, Carta AR, Moretti C, Dufau ML, Fabbri A. Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. *Endocrinology.* 1999;140(11):4939-47.
140. Ishikawa T, Fujioka H, Ishimura T, Takenaka A, Fujisawa M. Expression of leptin and leptin receptor in the testis of fertile and infertile patients. *Andrologia.* 2007;39(1):22-7.
141. Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997;94(20):11073-8.
142. Tena-Sempere M, Pinilla L, Zhang FP, Gonzalez LC, Huhtaniemi I, Casanueva FF, et al. Developmental and hormonal regulation of leptin receptor (Ob-R) messenger ribonucleic acid expression in rat testis. *Biology of reproduction.* 2001;64(2):634-43.
143. Gower BA, Nagy TR, Goran MI, Smith A, Kent E. Leptin in postmenopausal women: influence of hormone therapy, insulin, and fat distribution. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2000;85(5):1770-5.
144. Licinio J, Negrao AB, Mantzoros C, Kaklamani V, Wong ML, Bongiorno PB, et al. Synchronicity of frequently sampled, 24-h concentrations of circulating leptin, luteinizing hormone, and estradiol in healthy women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1998;95(5):2541-6.
145. Ryan NK, Van der Hoek KH, Robertson SA, Norman RJ. Leptin and leptin receptor expression in the rat ovary. *Endocrinology.* 2003;144(11):5006-13.
146. Zhang Y, Olbort M, Schwarzer K, Nuesslein-Hildesheim B, Nicolson M, Murphy E, et al. The leptin receptor mediates apparent autocrine regulation of leptin gene expression. *Biochemical and biophysical research communications.* 1997;240(2):492-5.

147. Catalano S, Marsico S, Giordano C, Mauro L, Rizza P, Panno ML, et al. Leptin enhances, via AP-1, expression of aromatase in the MCF-7 cell line. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(31):28668-76.
148. Faria TS, Ramos CF, Sampaio FJ. Puberty onset in the female offspring of rats submitted to protein or energy restricted diet during lactation. *J Nutr Biochem*. 2004;15(2):123-7.
149. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:413-37.
150. Araujo RL, Andrade BM, da Silva ML, Ferreira AC, Carvalho DP. Tissue-specific deiodinase regulation during food restriction and low replacement dose of leptin in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(5):E1157-63.
151. Cabanelas A, Lisboa PC, Moura EG, Pazos-Moura CC. Leptin acute modulation of the 5'-deiodinase activities in hypothalamus, pituitary and brown adipose tissue of fed rats. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2006;38(8):481-5.
152. Ortiga-Carvalho TM, Oliveira KJ, Soares BA, Pazos-Moura CC. The role of leptin in the regulation of TSH secretion in the fed state: in vivo and in vitro studies. *The Journal of endocrinology*. 2002;174(1):121-5.
153. Seoane LM, Carro E, Tovar S, Casanueva FF, Dieguez C. Regulation of in vivo TSH secretion by leptin. *Regulatory peptides*. 2000;92(1-3):25-9.
154. Elias CF, Kelly JF, Lee CE, Ahima RS, Drucker DJ, Saper CB, et al. Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain. *The Journal of comparative neurology*. 2000;423(2):261-81.
155. Guo F, Bakal K, Minokoshi Y, Hollenberg AN. Leptin signaling targets the thyrotropin-releasing hormone gene promoter in vivo. *Endocrinology*. 2004;145(5):2221-7.
156. Nilni EA, Vaslet C, Harris M, Hollenberg A, Bjorbak C, Flier JS. Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis. Evidence for direct and indirect pathways. *J Biol Chem*. 2000;275(46):36124-33.
157. Menendez C, Baldelli R, Camina JP, Escudero B, Peino R, Dieguez C, et al. TSH stimulates leptin secretion by a direct effect on adipocytes. *The Journal of endocrinology*. 2003;176(1):7-12.
158. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*. 2001;411(6836):480-4.
159. Lechan RM, Fekete C. The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Progress in brain research*. 2006;153:209-35.

160. Horita A. An update on the CNS actions of TRH and its analogs. *Life sciences*. 1998;62(17-18):1443-8.
161. Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 1997;138(6):2569-76.
162. Sreenan S, Caro JF, Refetoff S. Thyroid dysfunction is not associated with alterations in serum leptin levels. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 1997;7(3):407-9.
163. Leonhardt U, Ritzel U, Schafer G, Becker W, Ramadori G. Serum leptin levels in hypo- and hyperthyroidism. *The Journal of endocrinology*. 1998;157(1):75-9.
164. Yoshida T, Momotani N, Hayashi M, Monkawa T, Ito K, Saruta T. Serum leptin concentrations in patients with thyroid disorders. *Clinical endocrinology*. 1998;48(3):299-302.
165. Mann DR, Akinbami MA, Gould KG, Castracane VD. Leptin and thyroxine during sexual development in male monkeys: effect of neonatal gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment and delayed puberty on the developmental pattern of leptin and thyroxine secretion. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2002;146(6):891-8.
166. Santana-Farre R, Mirecki-Garrido M, Bocos C, Henriquez-Hernandez LA, Kahlon N, Herrera E, et al. Influence of neonatal hypothyroidism on hepatic gene expression and lipid metabolism in adulthood. *PloS one*. 2012;7(5):e37386.
167. Zamoner A, Pessoa-Pureur R, Silva FR. Membrane-initiated actions of thyroid hormones on the male reproductive system. *Life sciences*. 2011;89(15-16):507-14.
168. Benavides VC, Mallela MK, Booth CJ, Wendler CC, Rivkees SA. Propylthiouracil is teratogenic in murine embryos. *PloS one*. 2012;7(4):e35213.
169. Manna D, Roy G, Mugesh G. Antithyroid drugs and their analogues: synthesis, structure, and mechanism of action. *Accounts of chemical research*. 2013;46(11):2706-15.
170. Brennan J, Capel B. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nature reviews Genetics*. 2004;5(7):509-21.
171. Fischbeck KL, Rasmussen KM. Effect of repeated reproductive cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad

- libitum-fed and chronically food-restricted rats. *The Journal of nutrition*. 1987;117(11):1967-75.
172. Bellentani FF, Fernandes GS, Perobelli JE, Pacini ES, Kiguti LR, Pupo AS, et al. Acceleration of sperm transit time and reduction of sperm reserves in the epididymis of rats exposed to sibutramine. *Journal of andrology*. 2011;32(6):718-24.
 173. Silva. TA. Avaliação do efeito do chumbo na qualidade espermática de humanos e de ratinhos [Mestrado em Biologia para o ensino]. Portugal: Universidade do Porto; 2007.
 174. Fernandez CD, Bellentani FF, Fernandes GS, Perobelli JE, Favareto AP, Nascimento AF, et al. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2011;9:32.
 175. Mahadevan MM, Trounson AO. The influence of seminal characteristics on the success rate of human in vitro fertilization. *Fertility and sterility*. 1984;42(3):400-5.
 176. Dyson AL, Orgebin-Crist MC. Effect of hypophysectomy, castration and androgen replacement upon the fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. *Endocrinology*. 1973;93(2):391-402.
 177. Drevius LO, Eriksson H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Experimental cell research*. 1966;42(1):136-56.
 178. Filler RL, Vig JR. Long-term aging of oscillators. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*. 1993;40(4):387-94.
 179. Cooke PS, Hess RA, Porcelli J, Meisami E. Increased sperm production in adult rats after transient neonatal hypothyroidism. *Endocrinology*. 1991;129(1):244-8.
 180. Kirby JD, Arambepola N, Porkka-Heiskanen T, Kirby YK, Rhoads ML, Nitta H, et al. Neonatal hypothyroidism permanently alters follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone production in the male rat. *Endocrinology*. 1997;138(7):2713-21.
 181. Morreale de Escobar G, Obregon MJ, Escobar del Rey F. Maternal-fetal thyroid hormone relationships and the fetal brain. *Acta medica Austriaca*. 1988;15 Suppl 1:66-70.
 182. Nanto-Salonen K, Glasscock GF, Rosenfeld RG. The effects of thyroid hormone on insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) expression in the neonatal rat: prolonged high expression of IGFBP-2 in methimazole-induced congenital hypothyroidism. *Endocrinology*. 1991;129(5):2563-70.

183. Marchant B, Brownlie BE, Hart DM, Horton PW, Alexander WD. The placental transfer of propylthiouracil, methimazole and carbimazole. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1977;45(6):1187-93.
184. Aruldas MM, Ramalingam N, Jaganathan A, John Sashi AM, Stanley JA, Nagappan AS, et al. Gestational and neonatal-onset hypothyroidism alters androgen receptor status in rat prostate glands at adulthood. *The Prostate*. 2010;70(7):689-700.
185. Kobayashi K, Kubota H, Saegusa J. Testicular development in growth-retarded mice. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*. 2007;56(5):393-7.
186. Rijntjes E, Swarts HJ, Anand-Ivell R, Teerds KJ. Prenatal induced chronic dietary hypothyroidism delays but does not block adult-type Leydig cell development. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2009;296(2):E305-14.
187. William JL, Radu S, Aziz SA, Rahim RA, Cheah YK, Liwan A, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* carriage by young Malaysian footballers during indoor training. *British journal of sports medicine*. 2004;38(1):12-4.
188. Cooke PS, Kirby JD, Porcelli J. Increased testis growth and sperm production in adult rats following transient neonatal goitrogen treatment: optimization of the propylthiouracil dose and effects of methimazole. *Journal of reproduction and fertility*. 1993;97(2):493-9.
189. Cooke PS, Porcelli J, Hess RA. Induction of increased testis growth and sperm production in adult rats by neonatal administration of the goitrogen propylthiouracil (PTU): the critical period. *Biology of reproduction*. 1992;46(1):146-54.
190. Cooke PS, Meisami E. Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone levels. *Endocrinology*. 1991;129(1):237-43.
191. De Felice M, Di Lauro R. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocrine reviews*. 2004;25(5):722-46.
192. Yen PM. Molecular basis of resistance to thyroid hormone. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2003;14(7):327-33.
193. Coppola A, Liu ZW, Andrews ZB, Paradis E, Roy MC, Friedman JM, et al. A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell metabolism*. 2007;5(1):21-33.
194. Decherf S, Seugnet I, Kouidhi S, Lopez-Juarez A, Clerget-Froidevaux MS, Demeneix BA. Thyroid hormone exerts negative feedback on hypothalamic type 4 melanocortin receptor expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(9):4471-6.

195. Santini F, Maffei M, Pelosini C, Salvetti G, Scartabelli G, Pinchera A. Melanocortin-4 receptor mutations in obesity. *Advances in clinical chemistry*. 2009;48:95-109.
196. Passos MC, da Fonte Ramos C, Dutra SC, Mouco T, de Moura EG. Long-term effects of malnutrition during lactation on the thyroid function of offspring. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2002;34(1):40-3.
197. Ramos CF, Lima AP, Teixeira CV, Brito PD, Moura EG. Thyroid function in post-weaning rats whose dams were fed a low-protein diet during suckling. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 1997;30(1):133-7.
198. Rodrigues AL, de Moura EG, Passos MC, Dutra SC, Lisboa PC. Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *The Journal of physiology*. 2009;587(Pt 11):2647-61.
199. Pracyk JB, Seidler FJ, McCook EC, Slotkin TA. Pituitary-thyroid axis reactivity to hyper- and hypothyroidism in the perinatal period: ontogeny of regulation of regulation and long-term programming of responses. *Journal of developmental physiology*. 1992;18(3):105-9.
200. Dussault JH, Coulombe P, Walker P. Effects of neonatal hyperthyroidism on the development of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the rat. *Endocrinology*. 1982;110(3):1037-42.
201. Walker P, Courtin F. Transient neonatal hyperthyroidism results in hypothyroidism in the adult rat. *Endocrinology*. 1985;116(6):2246-50.
202. Watanobe H. Leptin directly acts within the hypothalamus to stimulate gonadotropin-releasing hormone secretion in vivo in rats. *The Journal of physiology*. 2002;545(Pt 1):255-68.
203. Mann DR, Plant TM. Leptin and pubertal development. *Seminars in reproductive medicine*. 2002;20(2):93-102.
204. Tena-Sempere M, Barreiro ML. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Molecular and cellular endocrinology*. 2002;188(1-2):9-13.
205. Kirby JD, Jetton AE, Cooke PS, Hess RA, Bunick D, Ackland JF, et al. Developmental hormonal profiles accompanying the neonatal hypothyroidism-induced increase in adult testicular size and sperm production in the rat. *Endocrinology*. 1992;131(2):559-65.

206. Hu S, Gan C, Wen R, Xiao Q, Gou H, Liu H, et al. Role of leptin in the regulation of sterol/steroid biosynthesis in goose granulosa cells. *Theriogenology*. 2014;82(5):677-85.
207. Su Y, Carey LC, Rose JC, Pulgar VM. Leptin alters adrenal responsiveness by decreasing expression of ACTH-R, StAR, and P450c21 in hypoxemic fetal sheep. *Reproductive sciences*. 2012;19(10):1075-84.
208. Sweeney G. Leptin signalling. *Cellular signalling*. 2002;14(8):655-63.
209. Barker DJ. In utero programming of cardiovascular disease. *Theriogenology*. 2000;53(2):555-74.
210. Bonomo IT, Lisboa PC, Pereira AR, Passos MC, de Moura EG. Prolactin inhibition in dams during lactation programs for overweight and leptin resistance in adult offspring. *The Journal of endocrinology*. 2007;192(2):339-44.
211. de Oliveira Cravo C, Teixeira CV, Passos MC, Dutra SC, de Moura EG, Ramos C. Leptin treatment during the neonatal period is associated with higher food intake and adult body weight in rats. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2002;34(7):400-5.
212. Lucas A. Programming by early nutrition: an experimental approach. *The Journal of nutrition*. 1998;128(2 Suppl):401S-6S.
213. Ashby J, Tinwell H, Lefevre PA, Joiner R, Haseman J. The effect on sperm production in adult Sprague-Dawley rats exposed by gavage to bisphenol A between postnatal days 91-97. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2003;74(1):129-38.
214. Cooper TG. Role of the epididymis in mediating changes in the male gamete during maturation. *Advances in experimental medicine and biology*. 1995;377:87-101.
215. Moore HD, Bedford JM. Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. *The Anatomical record*. 1979;193(2):293-311.
216. Robaire B, Seenundun S, Hamzeh M, Lamour SA. Androgenic regulation of novel genes in the epididymis. *Asian journal of andrology*. 2007;9(4):545-53.
217. Ezer N, Robaire B. Androgenic regulation of the structure and functions of the epididymis. In: Robaire B, BT H, editors. *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice* New York: Kluwer Academic/Plenum; 2002. p. 19.
218. Liu YX. Control of spermatogenesis in primate and prospect of male contraception. *Archives of andrology*. 2005;51(2):77-92.

219. Shayu D, Rao AJ. Expression of functional aromatase in the epididymis: role of androgens and LH in modulation of expression and activity. *Molecular and cellular endocrinology*. 2006;249(1-2):40-50.
220. Awider-Al-Amawi M, Marchlewicz M, Kolasa A, Wenda-Rozewicka L, Wiszniewska B. Rat epididymal epithelial cells and 17beta-estradiol synthesis under hCG stimulation in vitro. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*. 2007;45(3):255-63.
221. Cooper TG. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility Supplement*. 1998;53:119-36.
222. Kempinas WD, Suarez JD, Roberts NL, Strader LF, Ferrell J, Goldman JM, et al. Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy. *Biology of reproduction*. 1998;59(4):897-904.
223. NagDas SK, Winfrey VP, Olson GE. Identification of ras and its downstream signaling elements and their potential role in hamster sperm motility. *Biology of reproduction*. 2002;67(4):1058-66.
224. Yeung CH, Sonnenberg-Riethmacher E, Cooper TG. Infertile spermatozoa of c-ros tyrosine kinase receptor knockout mice show flagellar angulation and maturational defects in cell volume regulatory mechanisms. *Biology of reproduction*. 1999;61(4):1062-9.

ANEXO – Comitê de ética



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/001/2015 sobre "Impacto do hipotireoidismo nos diferentes órgãos do sistema reprodutor masculino em diferentes fases do desenvolvimento" sob a responsabilidade de **Cristiane da Fonte Ramos**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em **27/01/2015**. Este certificado expira em **27/01/2019**.

Rio de Janeiro, 27 de Janeiro de 2015.

Prof. Dra. Patricia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dra. Elaine de Oliveira
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Dr. Sylvio Claudio Neto
CEUA/IBRAG/UERJ

/ass