



1
2
3
4
5 **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**
6 **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**
7

8
9
10 **MARIA CLARA DA SILVA GALRÃO CUNHA**
11

12
13
14 **EFEITOS DA KISSPEPTINA NA EXPRESSÃO TESTICULAR E**
15 **EPIDIDIMÁRIA DE MEDIADORES IMUNOLÓGICOS, PROTEÍNAS**
16 **JUNCIONAIS E DE TRANSPORTE EM RATOS HIPOTIREOIDEOS**
17

18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29 **ILHÉUS, BAHIA**

30 **2025**

1 **MARIA CLARA DA SILVA GALRÃO CUNHA**

2
3 **EFEITOS DA KISSPEPTINA NA EXPRESSÃO TESTICULAR E**
4 **EPIDIDIMÁRIA DE MEDIADORES IMUNOLÓGICOS, PROTEÍNAS**
5 **JUNCIONAIS E DE TRANSPORTE EM RATOS HIPOTIREOIDEOS**

6
7
8
9 Dissertação apresentada à Universidade Estadual de
10 Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do
11 título de Mestre em Ciência Animal.

12 Linha de pesquisa: Biotecnologia e Experimentação
13 Animal

14 Área de concentração: Patologia Experimental

15 Orientador: Prof. Dr. Juneo Freitas Silva
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

30 **ILHÉUS, BAHIA**

31 **2025**

1 **MARIA CLARA DA SILVA GALRÃO CUNHA**

2
3 **EFEITOS DA KISSPEPTINA NA EXPRESSÃO TESTICULAR E**
4 **EPIDIDIMÁRIA DE MEDIADORES IMUNOLÓGICOS, PROTEÍNAS**
5 **JUNCIONAIS E DE TRANSPORTE EM RATOS HIPOTIREOIDEOS**

6
7 **ILHÉUS- BA, 24/02/2025**

8
9
10
11 _____
12 **Dr. Juneo Freitas Silva**

13 **UESC/DCB**

14 **(Orientador)**

15
16 _____
17 **Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa**

18 **UFMG/ICB**

19
20 _____
21 **Dra. Maíra Bianchi Rodrigues Alves**

22 **UNESP/FCAV**

23
24
25
26
27
28
29
30 **ILHÉUS, BAHIA**

31 **2025**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

Dedico este trabalho ao meu pai, Marcos José Galvão da Cunha, (*In memoriam*), que partiu no último ano, deixando uma saudade que é difícil de explicar. Em muitos momentos achei que não seria capaz de caminhar após sua partida, mas sua voz clara e firme sempre me alcançava, (re)lembrando a força que carregou dentro de mim. Sou eternamente grata por todo amor, dedicação e apoio que você me deu. Este trabalho é por você e para você, pai.

Amor infinito, vida inteira.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

Agradecimentos

Agradeço a Deus, as forças que me guiam e aos meus ancestrais pelo privilégio e oportunidade de viver plenamente a minha vida. Axé

Agradeço à minha mãe, Maria Lya, pela vida, pela entrega e pelo amor. Chegar até aqui não seria possível sem ter você ao meu lado, te amo!

Agradeço também à minha tia, Ane, e à minha prima, Beatriz, pelo carinho, apoio e amor que me oferecem, vocês são peças fundamentais em minha vida.

Aprendi muito com as mulheres da minha vida. Coragem é, de fato, um substantivo feminino. Obrigada por tudo!

Agradeço ao meu tio, Jai, pelos momentos alegres e pelas cantorias no bar TikTok. Sua presença e carinho tornam minha jornada ainda mais especial, obrigada por tudo.

Agradeço a toda a minha família pela confiança, pelo carinho e pela admiração, que sempre me fortaleceram e me inspiraram.

Agradeço aos meus filhos felinos, Kramer, Margot e Ivo, por encherem meus dias de amor e por me salvarem, de alguma forma, a cada dia.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Juneo Freitas, pela paciência, compreensão e constante apoio ao longo deste percurso, que vem desde a graduação. Sua orientação e ensinamentos foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Sou grata pela confiança depositada e pelo exemplo de dedicação e excelência.

Agradeço ao meu colega de trabalho e professor Luciano Santos, sem nossa parceria e colaboração este trabalho não seria possível. Muito obrigada por todo ensinamento, companhia e por caminhar junto comigo nessa jornada.
#teammacho

Agradeço aos meus parceiros de equipe no NuRE, em especial Thayná, Cibele, Jeane, Bianca e Natália, dividir essa vida de pesquisa com vocês tornou tudo mais prazeroso. Ser NuRE é tudo de bom!

Agradeço à Tia Jacinha, por todo carinho e cuidado durante esses anos no CME.

Agradeço à minha amiga Tamiles, por estar ao meu lado desde tão cedo, compartilhando a vida comigo com amor, compreensão e parceria em todos os momentos. Obrigada por ser minha irmã de coração e por cuidar de mim com tanto carinho.

1 Agradeço ao meu amigo Guthierry por ter me acolhido com tanto carinho, como
2 quem adota gatinhos na rua rs, e por me mostrar a vida através do seu olhar
3 sensível. Você tem toda a minha admiração e gratidão.

4 Aos meus amigos Pedro L., Luiza B., Babi, Gabriel M., Leti e Matheus M.,
5 minha gratidão por cada conversa, troca, gesto de carinho e demonstração de
6 amor. A vida ganha ainda mais sentido ao ser vivida ao lado de vocês. Muito
7 obrigada por estarem comigo!

8 Agradeço aos meus amigos Gabriel R. e Eustáquio por cada banho de rio,
9 cada aventura e todo o amor compartilhado. O Gatitas me salvou, e não tenho
10 palavras para expressar minha gratidão pelo acolhimento e pelos momentos
11 que coloriram a minha vida.

12 Ao meu companheiro de vida, Erikles, todo o meu agradecimento. Não seria
13 quem sou sem a força da nossa amizade. Compartilhamos tantas vivências e
14 ainda temos muito por viver, lado a lado, em todos os momentos. Obrigada por
15 me ensinar o poder de acreditar nos nossos sonhos e por ser minha inspiração
16 constante. Caminharemos sempre juntos, independente da distância. Estarei
17 sempre na primeira fila, admirando sua beleza, sua grandeza e tudo o que você
18 é neste mundo, que também é nosso.

19 “Maria Bethânia, please send me a letter
20 I wish to know things are getting better”

21 Agradeço aos professores e técnicos que generosamente compartilharam seus
22 conhecimentos comigo ao longo deste mestrado. Meu reconhecimento também
23 à UESC e ao Programa de Ciência Animal pela estrutura e suporte fornecidos.

24 Agradeço a CAPES pela bolsa concedida, que tornou essa jornada possível.

25 Agradeço a todos que fizeram parte do meu trajeto, direta ou
26 indiretamente. Cada encontro, cada troca e cada gesto contribuíram de forma
27 significativa para que eu chegasse até aqui. A vida é feita dessas conexões, e
28 sou profundamente grata por todas elas.

29 Realmente, a vida presta.

30

31

32

33

34

35

36

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

*“A vida em mim é tão insistente que se me partirem, como a uma lagartixa, os
pedaços continuarão estremeando e se mexendo.”*

Clarice Lispector

1 **EFEITOS DA KISSPEPTINA NA EXPRESSÃO TESTICULAR E**
2 **EPIDIDIMÁRIA DE MEDIADORES IMUNOLÓGICOS, PROTEÍNAS**
3 **JUNCIONAIS E DE TRANSPORTE EM RATOS HIPOTIREOIDEOS**

4
5 **RESUMO**

6
7 A manutenção de um ambiente tolerogênico no testículo e epidídimo é
8 fundamental para a formação e função adequada dos espermatozoides. No
9 entanto, apesar do hipotireoidismo comprometer a morfologia gonadal e a
10 qualidade espermática e a kisspeptina (Kp) modular a esteroidogênese testicular
11 e melhorar a função gonadal em ratos hipotireoideos, não há informações sobre
12 os efeitos da hipofunção tireoidiana e da Kp no ambiente tolerogênico testicular
13 e epididimário. O objetivo deste estudo foi avaliar se o hipotireoidismo
14 compromete a expressão de fatores imunológicos, proteínas juncionais e de
15 transporte no testículo e epidídimo de ratos e o papel modulatório da Kp sobre
16 esses fatores. Foram utilizados ratos Wistar adultos e o hipotireoidismo foi
17 induzido com propiltiouracil (PTU) durante três meses. O tratamento com
18 kisspeptina-10 (Kp10) foi realizado no último mês (CEUA 03/19). Avaliou-se a
19 expressão testicular e/ou epididimária de citocinas inflamatórias (*Il6*, *IL-10*,
20 *TNF α*), mediadores da via do inflamassoma NLRP3-piroptose (*Nlrp3*, *IL1 β* , *Il18*,
21 *Casp1*, Gasdermina D) e de proteínas juncionais (Ocludina e Claudina 11) e de
22 função (*Ar*, *Abp*, *Def28*, *Def49*, *Ptgds*, *Aqp1*). O hipotireoidismo em ratos reduziu
23 a expressão testicular de *TNF α* e *Caspase1*, enquanto aumentou *Il6* e *IL10/Il10*
24 no testículo e *Il6* e *Tnfa* no epidídimo. O tratamento com Kp10, por outro lado,
25 restabeleceu a expressão testicular de *TNF α* e reduziu a expressão de *Il18* e *Il6*
26 no testículo e epidídimo, respectivamente. Em relação às proteínas juncionais, o
27 hipotireoidismo aumentou a imunomarcagem testicular e epididimária de
28 Claudina 11, enquanto Kp10 reduziu a expressão de Claudina 11 e Ocludina no
29 testículo e de Claudina 11 no epidídimo. Além disso, a hipofunção tireoidiana
30 aumentou a expressão gênica testicular de *Ar* e epididimária de *Ar*, *Abp*, *Def28*,
31 *Aqp1* e *Ptgds*, enquanto o tratamento com Kp10 restabeleceu a expressão de
32 *Abp*, *Aqp1* e *Ptgds* no epidídimo. Conclui-se que o hipotireoidismo em ratos
33 compromete o microambiente imunológico testicular e epididimário, além de
34 desregular a expressão de proteínas juncionais e de função no epitélio
35 epididimário, enquanto o tratamento com Kp10 atenuou essas alterações,
36 sugerindo uma nova via terapêutica para a disfunção testicular e epididimária
37 causada pela hipofunção tireoidiana.

38
39 Palavras chaves: Citocinas; Barreira hematotesticular, Barreira
40 hematoepididimária; Kisspeptina; Tireoide; Rato

41

42

1
2 **EFFECTS OF KISSPEPTIN ON TESTICULAR AND EPIDIDYMAL**
3 **EXPRESSION OF IMMUNE MEDIATORS, JUNCTIONAL AND TRANSPORT**
4 **PROTEINS IN HYPOTHYROID RATS**

5
6
7 **ABSTRACT**
8

9 Maintaining a tolerogenic environment in the testis and epididymis is essential for
10 proper sperm formation and function. However, although hypothyroidism
11 compromises gonadal morphology and sperm quality and kisspeptin (Kp)
12 modulates testicular steroidogenesis and improves gonadal function in
13 hypothyroid rats, there is no information on the effects of thyroid hypofunction
14 and Kp on the testicular and epididymal tolerogenic environment. The aim of this
15 study was to evaluate whether hypothyroidism compromises the expression of
16 immunological factors, junctional and transport proteins in the testis and
17 epididymis of rats and the modulatory role of Kp on these factors. Adult Wistar
18 rats were used and hypothyroidism was induced with propylthiouracil (PTU) for
19 three months. Treatment with kisspeptin-10 (Kp10) was performed in the last
20 month (CEUA 03/19). The testicular and/or epididymal expression of
21 inflammatory cytokines (*Il6*, *IL-10*, *TNF α*), mediators of the NLRP3
22 inflammasome-pyroptosis pathway (*Nlrp3*, *IL1 β* , *Il18*, *Casp1*, *GasderminD*) and
23 junctional (*Occludin* and *Claudin 11*) and function (*Ar*, *Abp*, *Def28*, *Def49*, *Ptgds*,
24 *Aqp1*, *Aqp9*) proteins were evaluated. Hypothyroidism in rats reduced the
25 testicular expression of *TNF α* and *Casp1*, while it increased *Il6* and *IL10/Il10* in
26 the testis and *Il6* and *Tnf α* in the epididymis. Treatment with Kp10, on the other
27 hand, restored the testicular expression of *TNF α* and reduced the expression of
28 *Il18* and *Il6* in the testis and epididymis, respectively. Regarding junctional
29 proteins, hypothyroidism increased testicular and epididymal immunostaining of
30 *Claudin 11*, while Kp10 reduced the expression of *Claudin 11* and *Occludin* in the
31 testis and of *Claudin 11* in the epididymis. Furthermore, thyroid hypofunction
32 increased testicular *Ar* and epididymal *Ar*, *Abp*, *Def28*, *Aqp1* and *Ptgds* gene
33 expression, while Kp10 treatment restored the expression of *Abp*, *Aqp1* and
34 *Ptgds* in the epididymis. It is concluded that hypothyroidism in rats compromises
35 the testicular and epididymal immune microenvironment, in addition to
36 deregulating the expression of junctional and function proteins in the epididymal
37 epithelium, while treatment with Kp10 attenuated these changes, suggesting a
38 new therapeutic avenue for testicular and epididymal dysfunction caused by
39 thyroid hypofunction.

40 **Keywords:** Cytokines; Blood-testicular barrier; Blood-epididymal barrier;
41 Kisspeptin; Thyroid; Rat

LISTA DE FIGURAS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

Figura 1. **Massa corporal, níveis de testosterona e T4 livre e expressão testicular e epididimária de *Ar* e *Abp* em ratos hipotireoideos e tratados com kisspeptina-10.**

Massa corporal dos ratos Controle, Hipo e Hipo + Kp10 durante todo o período experimental (média ± SEM; n=8-16). B) Níveis de T4 livre (ng/dL) (média ± SEM; n= 6-7). C) Testosterona sérica (média ± SEM; n= 6-7). D) Expressão gênica relativa de *Ar* no testículo e epidídimo (média ± SEM; n=6). E) Expressão gênica relativa de *Abp* no testículo e epidídimo (média ± SEM; n=6). Diferenças significativas da ANOVA são representadas por “*”, enquanto as diferenças encontradas no teste-t de Student são representadas por “#”. */#p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p<0.0001.....41

Figura 2. **Expressão de citocinas inflamatórias no testículo de ratos com hipotireoidismo e tratados com Kp10.**

A-C) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica da *Tnfa* no testículo de ratos dos grupos controle (A), hipo (B) e hipo + Kp10 (C) (Streptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 100 µm). D-F) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de *Il10* no testículo de ratos dos grupos controle (D), hipo (E) e hipo + Kp10 (F) (Streptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 50 µm). G) Área de imunomarcção em pixel da expressão de *Tnfa* no testículo (média ± SEM; n=6-8). H) Porcentagem de túbulos seminíferos positivos para *Il10* (média ± SEM; n=6-8). I) Expressão gênica relativa de *Il6* e *Il10* no testículo (média ± SEM; n=6). Diferenças significativas obtidas da ANOVA e teste-t de Student. */#p < 0,05, **p < 0,01.....43

Figura 3. **Expressão de mediadores imunológicos no epidídimo de ratos com hipotireoidismo e tratados com Kp10.**

Expressão gênica relativa de *Tnfa*, *Il6* e *Il10* (A) e *Def28* e *Def49* (B) no epidídimo de ratos dos grupos controle, hipo e hipo + Kp10 (média ± SEM; n= 6-7). Diferenças significativas encontradas no teste-t de Student. #p < 0,05, ##p < 0,01.....45

Figura 4. **Expressão de mediadores do inflamassoma (*Nlrp3*, *Il1β*, *Il18*) e piroptose (*Casp1* e *Gasdermina D*) no testículo de ratos hipotireoideos e tratados com Kp10.**

A) Fotomicrografia da expressão imuno-histoquímica da *Gasdermina D* no túbulo seminífero (Streptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 100 µm). B) Porcentagem de túbulos positivos para *Gasdermina D* (média ± SEM; n= 6-7). C) Expressão gênica relativa de *Nlrp3*, *Caspase1*, *Il1β* e *Il18* (média ± SEM; n= 6-7) As diferenças significativas foram encontradas por ANOVA e teste-t de Student. */#p < 0,05.....46

Figura 5. **Expressão de proteínas juncionais em testículo e epidídimo de ratos com hipotireoidismo e tratados com Kp10.**

A-C) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica da *Ocludina* no testículo de ratos dos grupos controle (A), hipo (B) e hipo+Kp10 (C) (Streptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 100 µm). D-F) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de *Claudina-11* no testículo de ratos dos grupos controle (D), hipo (E) e hipo+Kp10 (F) (Streptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 100 µm). G-I) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de *Claudina-11* no caput epididimário de ratos dos grupos controle (G), hipo (H) e Hipo+Kp10 (I) (Streptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 100 µm). J-L) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de *Claudina-11* na cauda epididimária de ratos dos grupos controle (J), hipo (K) e hipo+Kp10 (L) (Streptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris;

| | |
|----|---|
| 1 | Barra = 100 μ m). M-N) Controle negativo (Streptavidina-biotina-peroxidase; |
| 2 | Hematoxilina de Harris; Barra = 100 μ m). O) Área de imunomarcção em pixel da |
| 3 | expressão de Ocludina e Claudina-11 no testículo (média \pm SEM; n=4). P) Porcentagem |
| 4 | de túbulos seminíferos positivos para Ocludina (média \pm SEM; n=4). Q) Área de |
| 5 | imunomarcção em pixel da expressão de Claudina-11 no epidídimo (média \pm SEM; |
| 6 | n=4). Diferenças significativas obtidas da ANOVA e teste-t de Student. */#p < 0,05, **p |
| 7 | < 0,01.....48 |
| 8 | Figura 6. Expressão gênica de Aquaporinas e Prostaglandina D sintase em |
| 9 | testículo e epidídimo de ratos hipotireoideos e tratados com Kp10. Expressão |
| 10 | relativa de <i>Aqua1</i> e <i>Aqua9</i> em testículo e epidídimo (A) e de <i>Ptgds</i> (B) em epidídimo |
| 11 | (média \pm SEM; n= 6-8). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA. **p |
| 12 | < 0,01.....49 |
| 13 | Figura 7. Efeitos do hipotireoidismo e do tratamento com kisspeptina-10 na |
| 14 | expressão testicular e epididimária de mediadores imunológicos, proteínas |
| 15 | juncionais e de transporte em ratos machos adultos. Fonte: Arquivo pessoal.....57 |
| 16 | |
| 17 | |
| 18 | |
| 19 | |
| 20 | |

LISTA DE TABELAS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

Tabela 1: Anticorpos primários e tempos de revelação utilizados na imunohistoquímica do testículo e epidídimo.....38

Tabela 2: Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para qRT-PCR.....39

LISTA DE ABREVIATURAS

- 1
- 2 ABP – Proteína ligadora de andrógeno
- 3 AR – Receptor de andrógeno
- 4 ANOVA – Análise De Variância
- 5 AQP1 – Aquaporina 1
- 6 AQP9 – Aquaporina 9
- 7 ASC – Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing A Caspase- Recruitment
- 8 Domain
- 9 BHE – Barreira hemato epididimal
- 10 BHT – Barreira hemato testicular
- 11 Clds-11 – Claudina 11
- 12 Oclu - Ocludina
- 13 DAMP – Damage-Associated Molecular Pattern
- 14 DEF28 – Defensina β 28
- 15 DEF49 – Defensina β 49
- 16 FSH – Hormônio Folículo Estimulante
- 17 GnRH – hormônio liberador de gonadotropina
- 18 IL-1 β – Interleucina 1 β
- 19 IL-6 – Interleucina 6
- 20 IL-8 – Interleucina 8
- 21 IL-10 – Interleucina 10
- 22 IL-18 – Interleucina 18
- 23 Kp10 – Kisspeptina 10
- 24 LH – Hormônio Luteinizante
- 25 NLRP3 – NLR Family Pyrin Domain Containing 3
- 26 PAMP – Pathogen-Associated Molecular Pattern
- 27 PBS – Solução Fosfato Tamponada
- 28 PTU – 6-propyl-2-thiouracil
- 29 PPIA – Peptidilprolil
- 30 PTGDS – Prostaglandina D2 sintase
- 31 ROS – Espécies reativa de oxigênio
- 32 T4 – Tiroxina
- 33 TSH – Hormônio tireoestimulante

Sumário

| | | |
|----|--|-----------|
| 1 | | |
| 2 | 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 3 | 2. OBJETIVO GERAL | 18 |
| 4 | 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 18 |
| 5 | 3. REVISÃO DE LITERATURA | 19 |
| 6 | 3.1. Organização estrutural e funcional do testículo e epidídimo | 19 |
| 7 | 3.1.1. Testículo | 19 |
| 8 | 3.1.2. Epidídimo | 21 |
| 9 | 3.2. Barreiras hemato-testicular (HT) e hemato-epididimária (HE) | 22 |
| 10 | 3.2.1. Sistema de transporte nas barreiras HT e HE | 24 |
| 11 | 3.3. Sistema imunológico testicular e epididimário | 25 |
| 12 | 3.3.1. Testículo | 25 |
| 13 | 3.1.2. Epidídimo | 27 |
| 14 | 3.4. Inflamassoma NLRP3 | 28 |
| 15 | 3.5. Hipotireoidismo em machos | 29 |
| 16 | 3.6. Kisspeptina | 31 |
| 17 | 4. CAPÍTULO 1 | 30 |
| 18 | 4.1. INTRODUÇÃO | 30 |
| 19 | 4.2. MATERIAL E METODOS | 35 |
| 20 | 4.2.1. Animais | 35 |
| 21 | 4.2.2. Delineamento experimental | 35 |
| 22 | 4.2.3. Processamento histológico do testículo e epidídimo | 36 |
| 23 | 4.2.4. Dosagem de T4 livre e testosterona | 36 |
| 24 | 4.2.5. Imuno-histoquímica (IHQ) | 36 |
| 25 | 4.2.6. RT-qPCR em tempo real | 38 |
| 26 | 4.2.7. Análise estatística | 39 |
| 27 | 4.3. RESULTADOS | 40 |
| 28 | 4.4. DISCUSSÃO | 50 |
| 29 | 5. REFERÊNCIAS | 58 |
| 30 | | |
| 31 | | |
| 32 | | |
| 33 | | |

34 1. INTRODUÇÃO

35 A infertilidade masculina é uma condição patológica multifatorial
36 complexa com apresentações fenotípicas heterogêneas. Estima-se que 9-25%
37 dos casais no mundo sofrem por conta da infertilidade, sendo o fator macho o
38 responsável por metade desses casos (DABBOUS; ATKIN, 2018a). Embora
39 muitas condições estejam relacionadas com a infertilidade masculina, os
40 distúrbios endócrinos são considerados como uma das principais causas de
41 infertilidade no macho, principalmente as disfunções tiroidianas como o
42 hipotireoidismo (MAZZILLI *et al.*, 2023a).

43 Os hormônios tiroidianos (HTs) atuam no testículo e epidídimo através
44 dos seus receptores nucleares alfa e beta (TR α ; TR β) (BUZZARD *et al.*, 2000; DE
45 PAUL *et al.*, 2008), como também indiretamente por meio de interações com outros
46 hormônios ou por influenciar a liberação do hormônio liberador de gonadotrofina
47 (GnRH) no eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal (HPG) (WAGNER; WAJNER;
48 MAIA, 2008). Portanto, a regulação normal dos HTs é importante para que se
49 tenha a funcionalidade das gônadas durante o desenvolvimento dos mamíferos,
50 sendo que a função testicular e epididimária é prejudicada em situações de
51 hipofunção tiroidiana (DEL RIO *et al.*, 1999; PAIVA *et al.*, 2024; ROMANO *et al.*, 2017a;
52 SANTOS *et al.*, 2023b)

53 No homem, a hipofunção tiroidiana é frequentemente associada ao
54 hipogonadismo (ALKHAYAL *et al.*, 2023), à redução da testosterona sérica e ao
55 aumento do tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo (ROMANO *et al.*,
56 2017a). Além disso, modelos animais de hipotireoidismo apresentam atrasos
57 na maturação das células de Sertoli, comprometimento da função e
58 diferenciação das células de Leydig (HARDY *et al.*, 1993a; PATEL; KASHANIAN,
59 2016a) e atrofia do epitélio secretor do epidídimo (DEL RIO *et al.*, 1999). No entanto,
60 ainda não há informações sobre a influência do hipotireoidismo no sistema
61 tolerogênico do testículo e epidídimo, sistema chave para a ocorrência adequada
62 da espermatogênese e proteção dos espermatozoides contra o sistema
63 imunológico (GREGORY; CYR, 2014; MITA; HINTON; DUFOUR, 2011).

64 O sistema tolerogênico testicular e epididimário é fundamental para a
65 reprodução, uma vez que os espermatozoides são antígenos e podem
66 desencadear uma resposta autoimune do organismo. Para evitar essa resposta,

67 o sistema genital masculino desenvolveu mecanismos de proteção, como as
68 barreiras hemato-testiculares (HT) e hemato-epididimais (HE), que ajudam a
69 isolar os espermatozoides do sistema imunológico, preservando a integridade
70 dos gametas (MITA; HINTON; DUFOUR, 2011b). As barreiras HT e HE são
71 formadas por junções oclusivas, junções comunicantes, junções de adesão e as
72 células de Sertoli (SCs) (MITA; HINTON; DUFOUR, 2011b), que juntas formam
73 um escudo anatômico que regula o movimento de eletrólitos, íons, água,
74 nutrientes e hormônios no compartimento adluminal dos túbulos seminíferos ou
75 no lúmen do epidídimo (CYR; DUFRESNE; GREGORY, 2018; DUTTA *et al.*, 2022a). Além
76 disso, as barreiras sequestram moléculas autoantigênicas, evitando respostas
77 autoimunes específicas, e protegem as células germinativas de moléculas
78 citotóxicas (GREGORY; CYR, 2014c; MRUK; CHENG, 2015). Portanto,
79 disfunções que alteram a estrutura ou função das barreiras HT e HE
80 inevitavelmente também afetam a formação e maturação do espermatozoide,
81 impactando a fertilidade masculina e a saúde reprodutiva (DOMÍNGUEZ-SALAZAR *et*
82 *al.*, 2020a; GE *et al.*, 2022; HAVERFIELD *et al.*, 2013; SONG *et al.*, 2022; WU *et al.*, 2019)

83 No entanto, o sistema tolerogênico também depende da funcionalidade
84 adequada de proteínas de transporte e do componente imunológico (MITA;
85 HINTON; DUFOUR, 2011a). O movimento dos espermatozoides no epidídimo é
86 regulado principalmente pelo fluxo do fluido luminal, que cria um ambiente onde
87 os espermatozoides encontram e absorvem íons, solutos orgânicos e
88 macromoléculas, que resulta na aquisição de motilidade e competência de
89 fertilização (LEE; HINTON; HIRASHIMA, 2023). Para isso, as aquaporinas são
90 canais de água preferencialmente presentes no sistema reprodutor masculino,
91 sendo expressas tanto no testículo quanto no epidídimo (BROWN *et al.*, 1995;
92 OBERSKA *et al.*, 2024a). Além desses transportadores, a imunidade inata local
93 testicular e epididimária são vitais para a produção e capacitação espermática
94 adequada. Os testículos, por meio de seus macrófagos, linfócitos T, células
95 dendríticas e mastócitos, lançam mão de mecanismos imunossupressores que
96 lhes garantem um sítio imunossuprimido ideal para que ocorra a
97 espermatogênese (LI; WANG; HAN, 2012; KAUR *et al.*, 2021). O mesmo
98 acontece com o ducto epididimário que possui células imunes residentes que
99 regulam as respostas imunes locais e são essenciais para o processo de

100 maturação do espermatozoide (BATTISTONE et al., 2020; PLEUGER et al.,
101 2022).

102 Atualmente já é bem documentado o papel chave da kisspeptina (Kp) e seu
103 receptor Kiss1R no controle do eixo HPG e da reprodução masculina (CORTÉS *et*
104 *al.*, 2015; FENG *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2018a; SANTOS *et al.*, 2021; TREVISAN *et al.*, 2018),
105 não somente pode regular a secreção hipotalâmica de GnRH (PINILLA *et al.*, 2012),
106 como por estimular localmente a esteroidogênese testicular (HAN *et al.*, 2020). Por
107 isso, pesquisas tem avaliado o potencial terapêutico da kisspeptina em
108 disfunções reprodutivas. Santos et al. (2023c) demonstraram recentemente que
109 a administração de kisspeptina-10 em ratos com hipotireodismo crônico foi capaz
110 de reverter os altos níveis de prolactina, além de melhorar a morfologia gonadal
111 e a atividade e morfologia espermática (SANTOS *et al.*, 2023c). Além disso, o
112 tratamento com kisspeptina-10 melhorou o estado redox testicular e inibiu a
113 ocorrência de apoptose causada pelo hipotireoidismo (SANTOS *et al.*, 2024). No
114 entanto, até o momento, não há informações sobre a influência da kisspeptina
115 no estabelecimento do sistema tolerogênico testicular e epididimário, em
116 especial na condição de hipotireodismo. Assim, a hipótese deste estudo é que o
117 tratamento com kisspeptina-10 regula positivamente as alterações causadas
118 pelo hipotireoidismo no ambiente tolerogênico testicular e epididimário em um
119 modelo experimental de rato.

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130 **2. OBJETIVO GERAL**

131 Avaliar os efeitos do hipotireoidismo e da administração de kisspeptina-
132 10 no sistema tolerogênico testicular e epididimário de ratos.

133 **2.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 134 • Avaliar o ganho de massa corporal e os níveis plasmáticos de T4 livre e
135 testosterona em ratos machos com hipotireoidismo e tratados com Kp10;
- 136 • Avaliar a expressão gênica de mediadores hormonais (*Ar* e *Abp*) no
137 testículo e epidídimo de ratos com hipotireoidismo e tratados com Kp10;
- 138 • Avaliar a expressão gênica e/ou proteica de mediadores da imunidade
139 inata (*Il6*; *Il10*, *Tnfa*, *Defensinas*, *Prostaglandina-endoperóxido sintase*
140 (*Ptgds*)) no testículo e/ou epidídimo de ratos com hipotireoidismo e
141 tratados com Kp10;
- 142 • Avaliar a expressão gênica e/ou proteica de mediadores da via do
143 inflamassoma (*Nlrp3*, *Il1β*, *Il18*) e piroptose (*Caspase 1*, *Gasdermina D*)
144 no testículo de ratos hipotireoideos e tratados com Kp10;
- 145 • Avaliar a expressão proteica de proteínas juncionais (*Ocludina*,
146 *Claudina11*) no testículo e epidídimo de ratos hipotireoideos e tratados
147 com Kp10;
- 148 • Avaliar a expressão gênica de proteínas de transporte (*Aquaporinas 1 e*
149 *9*) no testículo e/ou epidídimo de ratos hipotireoideos e tratados com
150 Kp10.

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163 3. REVISÃO DE LITERATURA

164

165 Em humanos e animais, a produção de espermatozoides capazes de
166 fertilizar o óvulo requer múltiplos órgãos que juntos constituem o trato genital
167 masculino. Uma característica comum desses órgãos, em especial os testículos
168 e os epidídimos, é a presença de células somáticas especializadas que dão
169 suporte ao desenvolvimento e à maturação dos gametas. Mas esse processo de
170 diferenciação celular cria desafios para o sistema imunológico desses órgãos,
171 pois esses espermatozoides diferenciados são imunogênicos e podem ativar
172 respostas autoimunes do organismo. No entanto, o sistema genital masculino
173 possui estratégias para evitar ataques imunológicos a antígenos específicos dos
174 gametas, criando um ambiente imunologicamente regulado que permite a
175 produção normal dos espermatozoides.

176

177 3.1. Organização estrutural e funcional do testículo e epidídimo

178

179 3.1.1. Testículo

180 O testículo dos mamíferos é responsável pela produção de gametas e
181 pela biossíntese de andrógenos. Funcionalmente e anatomicamente, o testículo
182 é separado em um compartimento espermatogênico avascular, os túbulos
183 seminíferos, e um compartimento endócrino altamente vascularizado, o tecido
184 intersticial (LARA et al., 2018). No interior dos túbulos seminíferos ocorre a
185 espermatogênese, um processo de diferenciação das células germinativas
186 masculinas, cuidadosamente orquestrado, no qual as espermatogônias se
187 diferenciam em espermatozoides. Uma série complexa de eventos moleculares,
188 que requer interações adequadas entre células de Sertoli, células germinativas,
189 células tubulares epiteliais e a integridade da barreira hemato-testicular (HT) é
190 necessária para uma espermatogênese bem-sucedida (HESS; DE FRANCA,
191 2008a; WU et al., 2020).

192 O processo de diferenciação das células germinativas acontece de
193 forma cíclica, tendo seu início um pouco antes da puberdade devido ao crescente
194 aumento dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), liberados
195 pelo eixo hipotalâmico-hipofisário (O'DONNELL; STANTON; KRETZER, 2017).

196 Esse processo pode ser dividido em três etapas: i) proliferativa ou diferenciação
197 espermatogonial, no qual ocorrem sucessivas divisões mitóticas; ii) meiótica ou
198 espermatocitária, envolvendo a duplicação de DNA, recombinação gênica e
199 formação de células haploides durante a Meiose I e II; e iii) diferenciação ou
200 espermiogênese, onde a espermátide redonda passa por mudanças
201 morfológicas, com formação do flagelo e a compactação do DNA (HESS; DE
202 FRANCA, 2009). Essa última etapa resulta na formação dos espermatozoides,
203 que vão passar por um processo de maturação no epidídimo. A meiose I e II, a
204 espermiogênese e a espermição ocorrem em um microambiente especializado
205 no compartimento apical do epitélio seminífero, após a barreira HT, enquanto a
206 renovação e diferenciação espermatogonial e a progressão do ciclo celular até
207 o estágio de espermatócito pré-leptóteno ocorrem antes da barreira HT, no
208 compartimento basal do epitélio seminífero (CANNARELLA et al., 2020; HESS;
209 DE FRANCA, 2008a;).

210 A produção dos gametas pelo epitélio seminífero ocorre em ciclos ou
211 ondas, que recebe o nome de “ciclo do epitélio seminífero”. O tempo do ciclo é
212 específico da espécie, mas a função é semelhante para todas, garantir a
213 espermatogênese não sincronizada e contínua (GRISWOLD, 2015). A
214 manutenção adequada dessa espermatogênese vai depender de fatores
215 intrínsecos, como a atividade das células de Sertoli e a renovação e
216 diferenciação das células germinativas, e de fatores extrínsecos, como a
217 produção de testosterona pelas células de Leydig (HESS; DE FRANCA, 2008b).
218 As células de Leydig estão localizadas no interstício do testículo, como também
219 macrófagos e linfócitos (células T e células *natural killers* (NKs)), que são
220 importantes para a regulação imunológica do microambiente testicular (QU et al.,
221 2020; GU et al., 2022).

222 Embora a estrutura básica dos testículos seja semelhante entre os
223 mamíferos, há diversas variações observadas entre as espécies. Essas
224 variações incluem o índice gonadossomático (relação entre massa testicular e
225 massa corporal), a porcentagem de área ocupada pelos túbulos seminíferos, a
226 proporção de células de Leydig no parênquima testicular, o diâmetro dos túbulos,
227 a quantidade de células de Leydig e Sertoli, e a eficiência das células de Sertoli,
228 que impactam diretamente na eficiência espermatogênica (LARA et al., 2018).

229

230

231 3.1.2. Epidídimo

232

233 Após a formação dos espermatozoides, a sua maturação, incluindo a
234 aquisição de motilidade e a capacitação para fertilização, ocorre durante o seu
235 trânsito pelo epidídimo. O epidídimo é um órgão tubular situado próximo ao
236 testículo e conecta o ducto eferente ao ducto deferente por meio dos vasos
237 eferentes (ROBAIRE; HINTON, 2015a). Em uma perspectiva funcional, o
238 epidídimo desempenha vários papéis importantes, incluindo proteção,
239 maturação e armazenamento dos espermatozoides (RINALDI et al., 2020a).
240 Além disso, diferente dos testículos, o andrógeno mais ativo biologicamente no
241 epidídimo é a diidrotestosterona (DHT), resultado da conversão da testosterona
242 em DHT pelas células principais (ROBAIRE et al., 2007).

243 Anatomicamente, o epidídimo é dividido em cabeça (e o segmento inicial,
244 exclusivo em roedores), corpo e cauda (WEIGEL MUÑOZ et al., 2024). Cada região
245 possui diferentes perfis de expressão gênica, garantindo diferentes funções
246 essenciais às diferentes etapas da maturação espermática (DUBÉ et al., 2007;
247 ROBAIRE; HINTON, 2015b). A cabeça e o corpo realizam eventos de maturação
248 precoce e tardia do espermatozoide, respectivamente, enquanto a região da
249 cauda serve majoritariamente como um local de armazenamento para os
250 espermatozoides, que são funcionalmente maduros (CORNWALL, 2009; NIE et al.,
251 2024).

252 O epidídimo apresenta um epitélio pseudoestratificado composto por
253 vários tipos de células morfológica e funcionalmente distintas (BRETON et al.,
254 2015), moduladas pela testosterona, e com alta atividade endocítica e secretora
255 (MITA; HINTON; DUFOUR, 2011c). A distribuição celular pode variar entre as
256 regiões, sendo que algumas dessas células são encontradas em todo o
257 epidídimo, enquanto outras estão restritas a regiões específicas (BELLEANNÉE;
258 THIMON; SULLIVAN, 2012; ROBAIRE; HINTON, 2015b).

259 As células principais do epidídimo são células secretoras e absorptivas
260 ativas, presentes em todo o ducto epididimário. Elas são responsáveis por
261 produzir a composição proteica no lúmen do epidídimo, além de desempenhar
262 papéis na modulação do pH luminal e na sinalização lumicrinal (RINALDI et al.,

263 2020b). Além disso, produzem e liberam epididimossomos, um tipo de vesícula
264 membranosa que interage com os espermatozoides, transferindo proteínas
265 fundamentais para a maturação e capacitação pós-testicular do espermatozoide
266 (PAUL *et al.*, 2021; SULLIVAN; SAEZ, 2013). As células claras são responsáveis por
267 fornecer o ambiente luminal ácido em repouso, essencial para a maturação e
268 armazenamento dos espermatozoides na cauda do epidídimo (PARK *et al.*,
269 2017). Elas são encontradas em uma proporção crescente da região proximal
270 para a distal do epidídimo e também participam da resposta imunológica,
271 secretando fatores pró e anti-inflamatórios (BATTISTONE *et al.*, 2020c, 2024a).

272 As células basais, outro tipo celular encontrado no epidídimo, estão
273 localizadas principalmente na superfície basal do ducto epididimário. Essas
274 células secretam prostaglandinas e podem metabolizar espécies reativas de
275 oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*). Ademais, apresentam projeções
276 apicais importantes para a manutenção da integridade estrutural da barreira
277 hemato-epididimal (HE) (SHUM *et al.*, 2008; MANDON; HERMO; CYR, 2015;
278 RINALDI *et al.*, 2020a). Também estão presentes no epitélio epididimário células
279 imunes primárias, as células halo, que são consideradas monócitos residentes,
280 e células dendríticas (JAMES *et al.*, 2020).

281

282 3.2. Barreiras hemato-testicular (HT) e hemato-epididimária (HE)

283

284 O testículo e o epidídimo são considerados sítios imuno-privilegiados
285 devido às suas propriedades imunológicas e imunidade local efetiva. O privilégio
286 imunológico fornece um *status* especial a alguns locais no corpo, onde alo- e
287 auto-antígenos são tolerados (ZHAO *et al.*, 2014a). Esse sistema especializado
288 confere proteção as células germinativas, evitando que sofram ataques
289 autoimunes por células imunes gonadais (SANTACROCE *et al.*, 2022a).

290 O sistema tolerogênico no testículo e epidídimo é estabelecido devido às
291 barreiras HT e HE, que desempenham a função de restringir a entrada de
292 moléculas no compartimento adluminal do testículo ou no lúmen do epidídimo,
293 regulando o microambiente necessário para a formação, capacitação e
294 armazenamento dos espermatozoides (MITA; HINTON; DUFOUR, 2011d;
295 MIYASO; OGAWA; ITOH, 2022). Essas barreiras são compostas por seus

296 elementos anatômicos, fisiológicos e imunológicos, que juntos criam barreiras de
297 competência máxima, dividindo o epitélio seminífero e lúmen epididimário nos
298 compartimentos basal e apical (adluminal) (HAU; WRIGHT; CHERRINGTON, 2023;
299 KIM *et al.*, 2022a). Quando essas barreiras se tornam funcionalmente danificadas,
300 os autoantígenos das células germinativas testiculares vazam através das
301 barreiras HT e HE, ocasionando uma contínua exposição de autoantígenos para
302 o sistema imunológico. Isso resulta no estabelecimento de uma inflamação
303 crônica e um distúrbio espermatogênico prolongado (ITOH, 2017; ITOH *et al.*,
304 2005; NAITO; ITOH, 2008).

305 A barreira HT se estabelece entre as idades de 12-14 anos em testículos
306 de humanos e em ratos nos dias 17-21 pós-parto (WANJARI;
307 GOPALAKRISHNAN, 2024). Essa barreira é formada pelas junções estreitas
308 (occludinas/cludinas), junções comunicantes (conexinas), junções semelhantes
309 a desmossomos e as células de Sertoli (SANTACROCE *et al.*, 2022a). As junções
310 impedem que as células germinativas haploides entrem em contato com o
311 sangue. Por isso, as células de Sertoli são as responsáveis por fornecer glicose
312 e ácidos graxos para as células germinativas (KAUR; THOMPSON; DUFOUR,
313 2014a). Além disso, as células de Sertoli secretam citocinas imunorreguladoras
314 da família do fator de crescimento transformador beta (TGF β), especificamente
315 a ativina A, que é responsável por direcionar o desenvolvimento de macrófagos
316 e células T para as respostas imunológicas tipo 2 (HEDGER; MEINHARDT, 2000;
317 RATO *et al.*, 2012; YE *et al.*, 2021a). Outro papel importante desempenhado pelas
318 células de Sertoli é a sua atividade fagocitária. Por meio dos seus receptores
319 tirosina quinase (Axl, tyro3, Mer e gene 6 específico de parada de crescimento
320 (GAS6)), elas identificam e fagocitam células germinativas apoptóticas e corpos
321 residuais, dando suporte ao processo de espermatogênese (NAKANISHI;
322 SHIRATSUCHI, 2004; TSOU *et al.*, 2014).

323 A dinâmica fisiológica da barreira HT é controlada pela rotatividade e
324 interações entre as proteínas de junção (YAN *et al.*, 2008). Estudos
325 demonstraram que anormalidades no ambiente intracelular e danos a proteínas
326 como conexina-43, claudina-5 e 11, ocludina e no complexo de junção da célula
327 de Sertoli, são as principais causas da interrupção da barreira HT (GAO; MRUK;
328 CHENG, 2015; WANG *et al.*, 2013).

329 Semelhante ao que acontece nos testículos, a barreira HE é um complexo
330 juncional estreito entre as células epiteliais do epidídimo, que assim como a
331 barreira HT, cria um local imuno-protégido dentro do lúmen epididimário
332 necessário para a maturação dos espermatozoides (ROBAIRE; HINTON,
333 2015b). O local anatômico da barreira HE foi descrito pela primeira vez como um
334 complexo juncional estreito entre as células epiteliais adjacentes (FRIEND;
335 GILULA, 1972). Em seguida, outros estudos forneceram evidências que a
336 barreira HE é formada por uma rede de junções oclusivas entre as células
337 principais, com a distribuição das redes firmes (*tight*) variando em número e
338 complexidade ao longo de todo o epidídimo, sendo mais extensas na cabeça
339 (*caput*) e menos extensas conforme se aproxima da cauda epididimária
340 (GREGORY; CYR, 2014a; SUZUKI; NAGANO, 1978).

341 Proteínas transmembranares dependentes de andrógenos, incluindo
342 ocludina, claudinas e zonula occludens (ZO), cooperam para a formação das
343 junções estreitas (CYR *et al.*, 2007a; KIM *et al.*, 2022b). As claudinas podem se
344 co-localizar com as ocludinas. No entanto, mesmo na ausência das ocludinas,
345 as claudinas são recrutadas para as junções estreitas, o que sugere seu
346 protagonismo na formação dessas junções (CYR *et al.*, 2007b; MARKOV;
347 ASCHENBACH; AMASHEH, 2015). As interações entre as proteínas que
348 compõem as junções estreitas controlam a natureza polarizada das células
349 epiteliais do epidídimo e são essenciais para a regulação fisiológica, celular e
350 molecular no órgão (KIM; BRETON, 2015).

351 A perda da função da barreira HE está associada a um aumento da
352 porcentagem de espermatozoides estáticos na cauda do epidídimo, como
353 também na influência negativa na motilidade e nos parâmetros de velocidade do
354 espermatozoide (GREGORY; CYR, 2014b; KORAH *et al.*, 2003). O mesmo acontece
355 quando há uma perturbação ao sistema tolerogênico testicular, ocasionando
356 comprometimento da função e estrutura do testículo que, por fim, leva ao
357 comprometimento da espermatogênese e infertilidade masculina (GREGORY;
358 CYR, 2014b; JACOBO *et al.*, 2011; STANTON, 2016; YE *et al.*, 2021a).

359

360 3.2.1. Sistema de transporte nas barreiras HT e HE

361

362 O sistema tolerogênico não é formado apenas por sua porção
363 anatômica, mas também pelos seus componentes fisiológicos (MITA; HINTON;
364 DUFOUR, 2011a). Enquanto a barreira anatômica restringe a passagem de
365 moléculas para o lúmen, transportadores específicos localizados ao longo das
366 membranas basolateral/apical das células de Sertoli e células epiteliais
367 epididimárias regulam o movimento de moléculas para dentro ou fora do lúmen
368 (SETCHELL, 2008). Logo, esse “portão” fisiológico, composto por
369 transportadores e canais, é necessário para se criar um microambiente
370 adequado para o desenvolvimento e maturação das células germinativas (ZHAO
371 *et al.*, 2020a).

372 Os espermatozoides desenvolvem motilidade e capacidade de fertilização
373 à medida que passam pelo epidídimo e ductos excretores. Portanto, o fluido
374 epididimário é peça importante para a maturação, concentração e
375 armazenamento adequado dos espermatozoides (ZHAO *et al.*, 2024). Esse
376 fluido sofre mudanças em sua composição à medida que se move distalmente
377 (KANNAN *et al.*, 2020) e o transporte do mesmo através do epitélio dos ductos
378 eferente e epididimário é necessário para atingir a concentração adequada de
379 espermatozoides no ejaculado, fator importante para a fertilidade (PASTOR-SOLER
380 *et al.*, 2009). Os canais de água (aquaporinas, AQPs) são responsáveis pelo
381 transporte de fluidos em uma ampla variedade de epitélios (OZU *et al.*, 2022).
382 Dentre as AQPs expressas no ducto epididimário (KANNAN *et al.*, 2020), a AQP9
383 é a mais presente no trato genital masculino, apresentando alta expressão na
384 membrana apical e nos estereocílios das células principais ao longo do epidídimo
385 (KANNAN *et al.*, 2020; OBERSKA *et al.*, 2024).

386

387 3.3. Sistema imunológico testicular e epididimário

388

389 3.3.1. Testículo

390 A estreita rede das células de Sertoli e seus complexos juncionais
391 constituem o componente físico da barreira HT, restringindo a passagem de
392 moléculas para o lúmen (WANJARI; GOPALAKRISHNAN, 2024). No entanto, o
393 sistema tolerogênico do testículo é mais complexo que apenas a restrição de
394 moléculas entre seus compartimentos. A capacidade imunoprotetora do espaço

395 fora do epitélio seminífero foi também demonstrado em estudos nos quais
396 tecidos alogênicos transplantados para o interstício do testículo sobreviveram
397 por um período prolongado (BOBZIEN et al., 1983; KAUR; VADALA; DUFOUR,
398 2017; SELAWRY; WHITTINGTON; FORSTER, 1988; SETCHELL, 1990). Esses
399 achados sugerem que o testículo se adapta como um todo para a proteção das
400 células germinativas e a manutenção das funções testiculares, possuindo duas
401 características imunológicas: 1) órgão imunoprivilegiado, onde as células
402 imunogênicas não induzem respostas inflamatórias deletérias sob condições
403 fisiológicas, formado principalmente pela barreira das células de Sertoli; 2)
404 mecanismos subjacentes ao privilégio imunológico testicular com a criação do
405 seu próprio sistema de defesa inata local, imprescindível para as respostas
406 contra infecções microbianas (CHEN; DENG; HAN, 2016).

407 Os mecanismos de defesa local do testículo incluem uma reatividade
408 baixa dos macrófagos residentes à inflamação, inibição de citocinas pró-
409 inflamatórias, citocinas anti-inflamatórias expressas por células imunes
410 reguladoras e células somáticas, e supressão imune específica de antígenos por
411 células dendríticas e mastócitos quiescentes (DUAN et al., 2020; GONG et al.,
412 2021a). Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que células somáticas (Leydig,
413 Sertoli ou peritubulares) e as células germinativas também são fontes de
414 produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, fator de necrose
415 tumoral alfa (TNF α), TGF β e IL-10, em condições fisiológicas e induzida por
416 lipopolissacarídeo (LPS) (DUTTA et al., 2022).

417 Os linfócitos T são reguladores centrais da inflamação e desempenham
418 um papel fundamental na imunidade do testículo, orquestrando células imunes
419 a fim de manter um estado de tolerância fisiológica, mas também ativando
420 respostas imunes quando sob ameaça (GONG et al., 2021b). As células Treg, um
421 subconjunto de células T reguladoras, representam fisiologicamente 10-20% do
422 total das células imunes em testículo de ratos (HEDGER, 1997; SANTACROCE
423 et al., 2022b) e estão estrategicamente posicionadas nos linfonodos drenantes
424 e interagindo com autoantígenos específicos do tecido (FIJAK; MEINHARDT,
425 2006). Embora presentes em pequena quantidade nos testículos, (HEDGER,
426 1997), as células Treg são responsáveis por prevenir a resposta imunológica

427 excessiva e a autoimunidade, suprimindo outras células T reativas
428 (SANTACROCE et al., 2022b).

429 Portanto, a coordenação entre a barreira HT e a resposta imunológica
430 inata e adaptativa é crítica para suprimir a resposta imunológica no testículo. De
431 forma geral, o ambiente do trato genital masculino tende a supressão ou
432 regulação negativa da imunidade inata local, o que representa uma capacidade
433 diminuída da expressão de citocinas pró-inflamatórias e expressão normal de
434 citocinas imunoreguladoras, garantindo a manutenção da homeostase
435 reprodutiva (KAUR; THOMPSON; DUFOUR, 2014b; LI et al., 2024; PLEUGER
436 et al., 2022a; QU et al., 2020b). No entanto, estudos já demonstraram que a
437 testosterona também modula o sistema tolerogênico testicular, por meio dos
438 seus receptores nas células imunes (KOVATS, 2015; YE *et al.*, 2021b). Em geral, os
439 andrógenos estão mais relacionados com as atividades imunossupressoras (YE
440 *et al.*, 2021a). Estudos descreveram o aumento nos níveis séricos de citocinas
441 inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , e o aumento do número de macrófagos
442 circulantes, quando há uma deficiência androgênica em homens (TRAISH *et al.*,
443 2018). Também foi demonstrado distúrbios na tolerância imunológica testicular
444 de camundongos que apresentavam baixa expressão dos receptores de
445 andrógenos nas células de Sertoli (MENG *et al.*, 2011).

446

447 3.3.2. Epidídimo

448

449 No epidídimo, um equilíbrio finamente ajustado entre a tolerância ao
450 espermatozoide antigênico e a ativação imunológica é necessário para manter a
451 função epididimária, enquanto protege o espermatozoide contra patógenos
452 estressores (HEDGER, 2011). Sabendo que a barreira HE é uma estrutura
453 dinâmica e não impede totalmente as interações entre o sistema imunológico e
454 as células germinativas, o epidídimo apresenta um arsenal de células que
455 compõem a imunidade local. Essas células imunes residentes estrategicamente
456 posicionadas funcionam como “catadoras” e “guardiões”, criando sítios de
457 resposta imunológica distintos dentro das diferentes regiões epididimárias
458 (PLEUGER *et al.*, 2022b). Os fagócitos mononucleares, incluindo células
459 dendríticas, monócitos, macrófagos e células linfocitárias B e T são

460 componentes desse aparato imunológico inato (KLEIN *et al.*, 2020; WANG *et al.*,
461 2021).

462 Recentemente foi demonstrado que as células claras estão
463 estrategicamente posicionadas para interagir com os fagócitos mononucleares e
464 inspecionar a barreira HE, regulando o equilíbrio entre a inflamação e a
465 tolerância imunológica no ambiente pós-testicular (BARRACHINA *et al.*, 2023;
466 BATTISTONE *et al.*, 2020c, 2020d, 2024b). Uma caracterização transcriptômica das
467 células claras em camundongos mostrou que essas células secretoras de
468 prótons expressam, em condições fisiológicas, receptores de *Il-17*, *Infγ* e *Tnf*,
469 além de quimiocinas que participam da resposta pró-inflamatória, assim como
470 genes associados a resposta anti-inflamatória, como receptores de *Il-4*, *Il-13* e
471 mediadores envolvidos na manutenção tolerogênica (BATTISTONE *et al.*, 2024b).

472 Outro componente da imunidade inata local do epidídimo são as β -
473 defensinas, uma importante subfamília de peptídeos de defesa do hospedeiro
474 (RIBEIRO *et al.*, 2018a). As β -defensinas demonstraram exercer papéis
475 multifuncionais, participando tanto como moléculas efetoras e reguladoras,
476 quanto moduladoras do sistema imunológico durante uma infecção ou resposta
477 inflamatória (RIBEIRO *et al.*, 2016a). Essas proteínas podem ser secretadas
478 ativamente no lúmen epididimário, onde não apenas protegem os
479 espermatozoides, mas também desempenham um papel na sua maturação e no
480 ganho de motilidade (ZHANG *et al.*, 2024).

481

482 3.4. Inflamassoma NLRP3

483

484 O sistema imune inato é o principal mecanismo pelo qual a maioria dos
485 organismos responde imediatamente a infecções ou lesões. Em diversas
486 condições patológicas o complexo inflamassoma NLRP3 é ativado, atuando
487 como um receptor de sinalização imune inata citosólica que detecta padrões
488 moleculares associadas a patógenos (PAMPs) ou ao perigo (DAMPs) e medeia
489 um estado altamente inflamatório (BAI *et al.*, 2020; BROZ; DIXIT, 2016; JO *et*
490 *al.*, 2016).

491 A ativação desse complexo tem sido descrita em condições patológicas
492 como síndrome metabólica, doenças inflamatórias crônicas e doenças

493 autoimunes (PRÓCHNICKI; LATZ, 2017a; TRAN et al., 2012; VANDANMAGSAR
494 et al., 2011). Além da produção exacerbada de citocinas inflamatórias, a ativação
495 do inflamassoma-NLRP3 pode levar à piroptose, uma forma de morte celular
496 associada à inflamação mediada pela clivagem da Gasdermina D através da
497 Caspase 1 (BAI *et al.*, 2020; JO *et al.*, 2016). A função da caspase-1 ativada é a
498 ativação proteolítica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 e da
499 gasdermina D (GSDMD). A gasdermina D se liga aos lipídios de membrana e
500 forma poros na membrana celular, promovendo a saída das citocinas pro-
501 inflamatórias, tumefação e morte celular (DE NARDO; LATZ, 2011; DING *et al.*,
502 2016; PRÓCHNICKI; LATZ, 2017b).

503 Um estudo realizado por Walenta et al. (2018) demonstrou a expressão
504 do NLRP3 em células de Sertoli e células peritubulares nos testículos de
505 roedores e primatas, inclusive com expressão antes do início da puberdade
506 (WALENTA et al., 2018). A ativação do inflamassoma NLRP3 em células de
507 Sertoli está associada a ativação de caspase- 1 e produção de IL-1 β em
508 condições fisiológicas, sendo este processo controlado pela autofagia
509 (HAYRABEDYAN *et al.*, 2016).

510 O inflamassoma NLRP3-piroptose é um importante maquinário da
511 resposta inata, garantindo uma resposta pró-inflamatória robusta, e servindo
512 como sentinela para respostas a danos no hospedeiro (MATTEUCCI *et al.*,
513 2019). Acontece que a desregulação ou hiperativação do sistema pode resultar
514 em danos celulares importantes. A superexpressão desses fatores se relaciona
515 com a desintegração do epitélio dos túbulos seminíferos e apoptose das células
516 germinativas, levando a interrupções na espermatogênese (RAMEZANIKHAH *et*
517 *al.*, 2020). Nesse contexto, Hajipour et al. (2018) demonstraram a regulação
518 positiva dos componentes do inflamassoma NLRP3 em um modelo experimental
519 de varicocele, que foi diminuída após a administração de resveratrol, um
520 composto com propriedades anti-inflamatórias (HAJIPOUR et al., 2018). No
521 entanto, até o momento, não há informações sobre a expressão da via
522 inflamassoma NLRP3-piroptose no trato genital de ratos machos com
523 hipotireoidismo, inclusive sobre o estabelecimento do ambiente tolerogênico
524 testicular e epididimário.

525

526 3.5. Hipotireoidismo em machos

527

528 Os hormônios tireoidianos, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), modulam as
529 funções reprodutivas por diversas vias, de modo que redução dos seus níveis
530 plasmáticos resultam em baixas concentrações do GnRH, das gonadotrofinas,
531 dos andrógenos (testosterona e DHT) e da globulina transportadora de
532 andrógeno (SHBG) (MARAN; ARULDHAS, 2002; FRANÇOIS XAVIER et al.,
533 2019; ALAHMAR; DUTTA; SENGUPTA, 2019). Tanto a testosterona quanto a
534 DHT promovem a espermatogênese e estimulam várias funções necessárias
535 para a produção ideal dos espermatozoides (FUSCO et al., 2021). Portanto, a
536 homeostase dos hormônios tireoidianos é fundamental para a reprodução,
537 participando desde o desenvolvimento gonadal e puberdade até a capacitação
538 e qualidade espermática (DAI et al., 2024; SULLIVAN; MIEUSSET, 2016;
539 WAGNER; WAJNER; MAIA, 2008b).

540

Nos machos, o hipotireoidismo atrasa a puberdade, causa disfunção erétil
541 (MEEKER; GODFREY-BAILEY; HAUSER, 2007; SENGUPTA *et al.*, 2021) e
542 reduz a massa testicular (SANTOS *et al.*, 2023c). A hipofunção tireoidiana
543 também está relacionada com mudanças na morfologia dos órgãos do trato
544 genital masculino de ratos, levando a deterioração da arquitetura testicular,
545 diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos, degeneração do epitélio
546 seminífero e atrofia do epitélio epididimal (DEL RIO *et al.*, 2001; IBRAHIM *et al.*,
547 2021; SANTOS *et al.*, 2023c). Essas alterações morfológicas estão associadas
548 com a redução de alguns tipos de células da linhagem espermática, como
549 espermatogônias e espermátócitos (ALHEALY; ALQAZAZ; AL-NUAIMY, 2021;
550 EL-SHAER *et al.*, 2024), além da diminuição da atividade funcional das células
551 de Leydig e Sertoli (DUTTA; SENGUPTA; MUHAMAD, 2019; EL-SHAER et al.,
552 2024; SIMORANGKIR; WREFORD; DE KRETZER, 1997). Recentemente,
553 Santos et al. (2024) demonstraram em seu estudo que o hipotireoidismo em ratos
554 causa estresse oxidativo e desregula a via de resposta a proteínas mal-
555 enoveladas (UPR, *unfolded protein response*) no testículo, e que o tratamento
556 com kisspeptina-10, um peptídeo chave da reprodução, melhorou o estado redox
557 testicular. Além disso, a condição de hipotireoidismo em ratos reduziu a
558 expressão testicular de kisspeptina e seu receptor Kiss1R (SANTOS et al.,
559 2023b, 2024).

560

3.6. Kisspeptina

562

563 A kisspeptina foi descoberta pela primeira vez em 1996 como um inibidor
564 de metástase em linhagens de células de melanoma (LEE *et al.*, 1996).
565 Posteriormente, foi postulado seu papel no controle central da reprodução, tanto
566 em humanos como em animais (LEHMAN; COOLEN; GOODMAN, 2010;
567 SEMINARA *et al.*, 2003). Em roedores, os neurônios de kisspeptina são
568 encontrados principalmente no núcleo periventricular anteroventral (AVPV) e no
569 núcleo arqueado (ARC) (CLARKSON *et al.*, 2009; KAUFFMAN *et al.*, 2007). Em
570 humanos e primatas, o mRNA da kisspeptina é expresso predominantemente
571 dentro do núcleo infundibular (equivalente ao ARC dos roedores) (ROMETO *et*
572 *al.*, 2007).

573 A kisspeptina é um peptídeo chave para a aquisição e manutenção da
574 fertilidade, uma vez que por meio do seu receptor Kiss1R regula a atividade dos
575 neurônios GnRH hipotalâmicos, participando como um mensageiro-chave no
576 eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (WOLFE; HUSSAIN, 2018; XIE *et al.*, 2022a).
577 Navarro *et al.* (2005a; 2005b) demonstraram o efeito estimulatório desse
578 peptídeo na secreção de LH (NAVARRO *et al.*, 2005) e FSH pela hipófise
579 (NAVARRO *et al.*, 2005a) e, conseqüentemente, a produção e liberação de
580 esteroides sexuais pelas gônadas (XIE *et al.*, 2022b).

581 No entanto, além da sua ação central, o sistema kisspeptina/Kiss1R
582 apresenta ação em tecidos periféricos, incluindo placenta (SANTOS *et al.*, 2022),
583 ovários (HU *et al.*, 2018b), fígado (SONG *et al.*, 2014) e pâncreas (LOOSEN *et*
584 *al.*, 2019). A kisspeptina e seu receptor também são expressos no testículo do
585 homem e de diferentes espécies, modulando o processo de espermatogênese,
586 o estabelecimento das células somáticas e germinativas e as funções dos
587 espermatozoides (FENG *et al.*, 2018; HSU *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2020a;
588 Santos *et al.*, 2023c).

589 Santos *et al.* (2023c) demonstraram a expressão de kisspeptina e Kiss1R
590 nas células intersticiais de ratos (SANTOS *et al.*, 2023c). Em camundongos,
591 kisspeptina foi identificada em células de Leydig (WANG *et al.*, 2015b), em
592 células germinativas primordiais (ANJUM *et al.*, 2012) e no epitélio epididimário.
593 No epidídimo, ela apresentou forte expressão nas células principais, fraca
594 expressão nas células basais e ausência de expressão nas células musculares

595 (HSU *et al.*, 2014b; MELE *et al.*, 2022a). Já Kiss1R foi encontrado tanto na
596 cabeça quanto na cauda epididimária de camundongos, com expressão
597 detectável em células musculares ao redor dos túbulos epididimários (MELE *et*
598 *al.*, 2022b). Em macaco Rhesus, kisspeptina foi também expressa em células de
599 Leydig, além de espermátócitos e espermátides redondas, enquanto seu
600 receptor Kiss1R foi observado dentro do túbulo seminífero, em espermatogônias,
601 espermátócitos e células de Sertoli (IRFAN *et al.*, 2016; TARIQ *et al.*, 2013). Em
602 hamster, a expressão de kisspeptina foi moderada nas células de Leydig e fraca
603 no epitélio seminífero (PARK *et al.*, 2022). O sistema KISS/KISS1R também foi
604 detectado em espermatozoides de humanos (PINTO *et al.*, 2012) e
605 camundongos (HSU *et al.*, 2014b).

606 Até o momento, estudos têm sugerido a participação de kisspeptina e seu
607 receptor na esteroidogênese testicular, com o aumento do pulso de LH e a
608 síntese de testosterona após a administração de kisspeptina em primatas não
609 humanos (IRFAN *et al.*, 2014), e aumento da produção *in vitro* de testosterona
610 pelas células de Leydig de caprinos, quando incubadas com kisspeptina-54
611 (HAN *et al.*, 2020). Além disso, a administração de kisspeptina aumentou o nível
612 de cálcio nos espermatozoides da cauda do epidídimo, e o antagonista da
613 kisspeptina reduziu as taxas de fertilização dos espermatozoides *in vitro* (HSU
614 *et al.*, 2014b). Esses dados sugerem fortemente que o sistema
615 kisspeptina/Kiss1R pode regular a fertilização e a reprodução de mamíferos.

616 Considerando os efeitos centrais e periféricos da kisspeptina, novas
617 pesquisas vêm sendo realizadas considerando o seu potencial para tratar
618 subfertilidade e outros distúrbios associados a reprodução (AQUINO *et al.*, 2019;
619 CHAN *et al.*, 2011; DE OLIVEIRA *et al.*, 2022; DHILLO *et al.*, 2007; JAYASENA
620 *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2023a; YOUNG *et al.*, 2012). Em um modelo
621 experimental de hipotireoidismo, Santos *et al.* (2023c) observaram que o
622 tratamento com kisspeptina-10 reverteu os altos níveis de prolactina, além de
623 melhorar a função gonadal e atividade espermática (SANTOS *et al.*, 2023c) Em
624 outro estudo do mesmo grupo, foi observado que a administração de kisspeptina-
625 10 foi capaz de melhorar o estado redox testicular e inibir a ocorrência de
626 apoptose causada pelo hipotireoidismo (Santos *et al.*, 2024). No entanto, ainda
627 são escassos os estudos que avaliam o potencial terapêutico da kisspeptina no
628 trato genital masculino, não havendo informações sobre o papel regulatório da

629 kisspeptina no sistema tolerogênico testicular e epididimário de ratos com
630 hipofunção tireoidiana.

631

632

4. CAPÍTULO 1

633

634 **Tratamento com kisspeptina-10 atenua a desregulação testicular e**
635 **epididimária de mediadores imunológicos, juncionais e de transporte**
636 **causada pelo hipotireodismo em ratos**

637

638 **Kisspeptin-10 treatment attenuates testicular and epididymal**
639 **dysregulation of immune, junctional, and transport mediators caused by**
640 **hypothyroidism in rats**

640

641 4.1. INTRODUÇÃO

642

643 A reprodução é um processo complexo que requer uma estreita
644 colaboração entre os sistemas endócrino e imunológico. 9-25% dos casais no
645 mundo sofrem por conta da infertilidade, sendo o fator macho o responsável por
646 metade desses casos (DABBOUS; ATKIN, 2018). Além disso, os distúrbios
647 endócrinos são considerados as principais causas de infertilidade no macho,
648 principalmente as disfunções tireoidianas como o hipotireoidismo (MAZZILLI et
649 al., 2023b; WAGNER; WAJNER; MAIA, 2008).

650

651 Os hormônios tireoidianos atuam no testículo e epidídimo através dos
652 seus receptores nucleares alfa e beta ($TR\alpha$; $TR\beta$), e influenciam as células de
653 Sertoli, as células de Leydig e a espermatogênese através da regulação da
654 transcrição gênica, síntese proteica, proliferação e diferenciação celular
655 (CONDORELLI *et al.*, 2019; FUMEL *et al.*, 2015). Pacientes com hipotireoidismo
656 apresentam atrasos na maturação das células de Sertoli, comprometimento da
657 função e diferenciação das células de Leydig (HARDY *et al.*, 1993b; PATEL;
658 KASHANIAN, 2016b), atraso da puberdade, disfunção erétil e redução da
659 gametogênese e da massa testicular (BAHAR et al., 2011; EL-KASHLAN et al.,
660 2015; ROMANO et al., 2017b; WANG et al., 2015a). Além disso, a hipofunção
660 tireoidiana reduz as concentrações plasmáticas dos hormônios liberador de

661 gonadotrofinas (GnRH), folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH) e
662 testosterona (WAGNER; WAJNER; MAIA, 2008), além de causar
663 hiperprolactinemia, outra importante causa de infertilidade em homens (FRANÇOIS
664 XAVIER *et al.*, 2019). Contudo, ainda não há informações sobre o sistema
665 tolerogênico testicular e epididimário em indivíduos com hipotireoidismo.

666 A espermatogênese é um processo de diferenciação celular coordenado
667 e controlado pelo eixo hipotálamo-pituitário-gonadal (HPG) (HERMANN *et al.*,
668 2018). Considerando o desafio que a espermatogênese representa ao sistema
669 imunológico, e com a finalidade de proteger as células germinativas testiculares
670 de respostas imunes prejudiciais, o sistema reprodutor desenvolve um sistema
671 tolerogênico por meio das barreiras hemato-testicular e hemato-epididimária (YE
672 *et al.*, 2021b). Essas barreiras, formadas por junções oclusivas, junções
673 comunicantes, junções de adesão e as células de Sertoli (SCs), funcionam como
674 um escudo anatômico restringindo a entrada de moléculas no compartimento
675 adluminal do testículo ou no lúmen do epidídimo (MITA; HINTON; DUFOUR,
676 2011; ROBAIRE; HINTON, 2015; SANTACROCE *et al.*, 2022).

677 Mas a proteção imunológica testicular e epididimária não é formada
678 apenas por sua porção anatômica, como também pelo estabelecimento de um
679 ambiente imunotolerante e pelas proteínas de transporte, em especial as
680 aquaporinas (MITA; HINTON; DUFOUR, 2011b), que são vitais para a produção
681 e maturação adequada dos espermatozoides (ZHAO *et al.*, 2020b, 2014).
682 Enquanto as aquaporinas são canais de água que regulam moléculas para
683 dentro e fora do lúmen testicular e epididimário, células da imunidade inata como
684 macrófagos, linfócitos T, células dendríticas e mastócitos estão presentes no
685 testículo e epidídimo estabelecendo um sítio imunossuprimido ideal para que
686 ocorra a espermatogênese e maturação espermática (BATTISTONE *et al.*, 2020;
687 KAUR *et al.*, 2021; LI; WANG; HAN, 2012). Além disso, as células imunes
688 testiculares não somente mantêm o meio tolerogênico, como protegem a
689 espermatogênese da invasão de patógenos, controlando dessa forma processos
690 infecciosos e o desenvolvimento de inflamação (LI; WANG; HAN, 2012)

691 Recentes estudos têm demonstrado o papel da kisspeptina, peptídeo
692 chave da reprodução, em controlar processos inflamatórios devido a sua ação
693 antioxidante e imunomoduladora, sugerindo o seu uso no tratamento de

694 disfunções reprodutivas uma vez que também estimula o eixo gonadal. Neste
695 sentido, Santos *et al.* (2023c, 2024) demonstraram em ratos com hipotireoidismo
696 que o tratamento com kisspeptina melhorou a morfologia gonadal e a atividade
697 e morfologia espermática, além de melhorar o estado redox testicular e inibir a
698 ocorrência de apoptose. No entanto, não há informações sobre a influência de
699 kisspeptina no estabelecimento do sistema tolerogênico testicular e epididimário,
700 em especial na condição de hipotireodismo.

701

702 **4.2. MATERIAL E METODOS**

703

704 4.2.1. Animais

705

706 Neste estudo foram utilizados ratos Wistar machos com dois meses de
707 idade obtidos do Laboratório de Criação, Manutenção e Experimentação Animal
708 da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Os animais foram alojados em
709 caixas plásticas (6 animais/caixa) e a temperatura (22 ± 2 °C), luminosidade
710 (1200 h claro / 1200 h escuro) e fluxo de ar foram controlados. A água e ração
711 comercial foram de livre acesso. O protocolo experimental foi aprovado pela
712 Comissão de Ética no Uso de Animais da UESC (nº 03/19).

713

714 4.2.2. Delineamento experimental

715

716 Os ratos foram divididos aleatoriamente nos grupos controle (n = 8),
717 hipotireoideo (n = 8) e hipotireoideo tratado com Kp10 (n = 8). O hipotireoidismo
718 foi induzido durante três meses pela administração de 6-propyl-2-thiouracil (PTU;
719 4 mg/Kg/dia; Cat. No. P3755, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) em 3 mL de água
720 destilada, enquanto o controle recebeu o mesmo volume de água (SANTOS *et al.*,
721 2023c, 2024). Após dois meses de tratamento com PTU, oito animais começaram
722 a receber diariamente Kisspeptina-10 (Kp10; 12 µg/Kg/dia; Cat. No. 4243, Tocris
723 Bioscience, Bristol, UK), formando o terceiro grupo de estudo. Os animais foram
724 pesados semanalmente. Após três meses do início do experimento, todos os
725 animais foram eutanasiados entre 10:00 - 11:00 h por decapitação. O sangue foi
726 coletado para dosagem de tiroxina (T4) livre e testosterona, enquanto o testículo

727 e todo o epidídimo direito foram coletados para processamento e análises imuno-
728 histoquímicas (IHQ). Amostras do testículo e cauda do epidídimo esquerdo foram
729 colhidas em TRizol, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e
730 armazenadas em freezer -80 °C para avaliação gênica pela reação em cadeia
731 da polimerase em tempo real (RT-qPCR).

732

733

734 4.2.3. Processamento histológico do testículo e epidídimo

735

736 As amostras de testículo e epidídimo foram fixadas em paraformaldeído 4%
737 por 24 horas, desidratadas em solução gradual de álcool 70% até álcool
738 absoluto, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes de 4 µm foram
739 feitos em micrótomo automático e coletados em lâminas silanizadas (StarFrost
740 Polycat, Germany) para a IHQ.

741

742 4.2.4. Dosagem de T4 livre e testosterona

743

744 O sangue foi coletado em tubos com heparina e centrifugado a 3.000 rpm
745 por 20 min a 4 °C. O plasma foi armazenado a -20 °C até o momento da análise
746 hormonal. A avaliação de T4 livre foi realizada por ELISA seguindo as
747 recomendações do fabricante (IMMULITE, Siemens Medical Solutions
748 Diagnostics, Malvern, PA, EUA), enquanto a dosagem de testosterona foi
749 realizada utilizando o kit DRG *International*, Inc (REF.: EIA-1559) conforme
750 instruções do fabricante.

751

752 4.2.5. Imuno-histoquímica (IHQ)

753

754 Na IHQ dos testículos e epidídimo, os anticorpos utilizados foram: anti-
755 Il10 (sc-365858, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-TNFα (sc-52746,
756 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-Gasdermin D (sc-376318, Santa Cruz
757 Biotechnology, CA, USA), anti-Ocludina (sc-133256, Santa Cruz Biotechnology,
758 CA, USA) e anti-Claudina 11 (sc-271232, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).
759 (ST-PIERRE et al., 2003; SU et al., 2020a; XIAO et al., 2023) (Tabela 1).

760 Foi utilizado o método indireto da estreptavidina-biotina-peroxidase pelo
761 sistema de detecção Dako (EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH, (Link))
762 seguindo protocolo de Ilie et al. (2017) e adaptações de Santos et al. (2023c). A
763 recuperação do epítipo foi feita por calor em solução de ácido cítrico (0,54 mol/L;
764 98°C; pH 6,0) por 20 minutos, enquanto o bloqueio de peroxidase endógena foi
765 realizada pela incubação por 30 min em solução de peróxido de hidrogênio (3 %;
766 H₂O₂) em metanol (CH₃OH). Os cortes foram mantidos por mais 30 min em
767 solução de soro de bloqueio (Ultra vision Block, Lab Vision Corp., Fremont, CA.
768 USA). A incubação dos tecidos com o anticorpo primário foi feita por 42 horas.
769 Após a incubação, foi adicionada aos cortes uma solução de estabilização de
770 proteínas (EnVision™ FLEX +, Mouse (LINKER)), seguido do anticorpo
771 secundário conjugado com estreptavidina peroxidase (EnVision™ FLEX/HRP)
772 por 30 min. O cromógeno usado foi a 3'3 diaminobenzidina (EnVision™ FLEX
773 DAB+ Chromogen), diluído em solução tampão com H₂O₂ (EnVision™ FLEX
774 Substrate Buffer; 1:50). As secções foram contracoradas com hematoxilina de
775 Harris e o controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por
776 solução salina tamponada com Tris + Tween 20 (0,05%) (TBS-T; pH 7,6). Entre
777 todas as etapas, os cortes foram lavados com TBS-T.

778 Avaliações descritivas e quantitativas da imunomarcção de IL10, TNF α ,
779 Gasdermina D, Ocludina e Claudina 11 foram realizadas no testículo e epidídimo
780 (cabeça e cauda). Foi determinada a área de imunomarcção utilizando o
781 software WCIF ImageJ® (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD,
782 USA) em fotomicrografias aleatórias feitas em 10-15 regiões do testículo e
783 epidídimo. As fotos foram obtidas em microscópio Leica DM 2500 utilizando a
784 câmara digital Leica DFC 295 (Leica Microsystems, Germany). Para a análise,
785 *color deconvolution* e *thresholding* das imagens foram realizadas. Os dados de
786 cada tecido foram arquivados, analisados e expressos como área de
787 imunomarcção em pixels. Para aqueles anticorpos em que houve marcação em
788 somente alguns túbulos (IL-10, Gasdermina D e Ocludina), foi também
789 contabilizada a porcentagem de túbulos marcados na secção histológica.

790

791

792

793

794 **Tabela 1. Anticorpos primários e tempos de revelação utilizados na imuno-histoquímica**
 795 **do testículo e epidídimo.**

796

| Anticorpo | Espécie/Clone | Diluição | Tempo de incubação | Tempo de revelação |
|-------------------|-----------------------|----------|--------------------|--------------------|
| Testículo | | | | |
| Anti-TNF α | Camundongo/Monoclonal | 1:50 | 42 horas | 5 minutos |
| Anti-IL-6 | Camundongo/Monoclonal | 1:100 | 42 horas | 2 minutos |
| Anti-IL-10 | Camundongo/Monoclonal | 1:6000 | 42 horas | 4 minutos |
| Anti-GasderminaD | Camundongo/Monoclonal | 1:200 | 42 horas | 1 minuto |
| Anti-Olcudina | Camundongo/Monoclonal | 1:200 | 42 horas | 40 segundos |
| Anti-Claudina-11 | Camundongo/Monoclonal | 1:100 | 42 horas | 1 minuto |
| Epidídimo | | | | |
| Anti-Claudina-11 | Camundongo/Monoclonal | 1:100 | 42 horas | 5 minutos |

797

798 4.2.6. RT-qPCR em tempo real

799

800 Para a técnica de qRT-PCR, a extração do RNA total do testículo e da
 801 cauda do epidídimo foi feita pelo uso do Trizol de acordo com as instruções do
 802 fabricante (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A análise da
 803 concentração e da qualidade do RNA de cada tecido foi feita utilizando nanodrop
 804 2000 Spectrophotometer (Thermo scientific). Os transcritos dos genes alvo
 805 referentes a *Ar*, *Abp*, *Il10*, *Il6*, *Tnf*, *Il1 β* , *Il18*, *Nlrp3*, *GardermiNaD*, *Defensina49*,
 806 *Defensina28*, *Prostanglandina D2 sintase (Ptgds)*, *Aquaporina1* e *Aquaporina9*
 807 foram quantificados pela qPCR utilizando SYBR Green no equipamento Applied
 808 Biosystems® 7500 Real-Time PCR System. Os iniciadores utilizados estão
 809 descritos na Tabela 2. Para cada reação utilizou-se 1,5 μ L de cDNA, 100 nM de
 810 cada iniciador e 12,5 μ L do reagente GoTaq® qPCR Master Mix, 2X em um
 811 volume final de 20 μ L. O controle negativo foi obtido pela substituição da amostra
 812 de cDNA por água livre de DNase e RNase. As condições de amplificação foram:
 813 ativação enzimática a 95 °C por 2 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15
 814 s e anelamento/extensão a 60 °C por 60 segundos. A linearidade e a eficiência
 815 da amplificação da qPCR foram avaliadas através de curvas padrões dos
 816 transcritos geradas utilizando diluições seriadas do cDNA, além da avaliação da
 817 curva de *melting* dos produtos da amplificação. A expressão gênica foi calculada
 818 pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde os resultados obtidos para cada grupo foram
 819 comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de
 820 *Gapdh* (*gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase*) para testículo e *Ppia*

821 (*peptidylprolyl isomerase A*) para epidídimo de *Rattus norvegicus* (PIHLAJAMAA
822 *et al.*, 2014).

823

824 **Tabela 2: Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para qRT-PCR.**

825

| Gene | Iniciadores | Nº Acesso |
|-----------------|--|----------------|
| <i>Ar</i> | F: CAGGGACCACGTTTTACCCA R: TTTCCGGAGACGACACGATG | NM_012502.2 |
| <i>Abp</i> | F: CGACTGCTTCTGTTGCTA R: CAATGTGTCTCAGGGTCCGT | NM_012650.2 |
| <i>Il6</i> | F: GACTTCCAGCCAGTTGCCTT R: AAGTCTCCTCTCCGGACTTGT | NM_053595.2 |
| <i>Il10</i> | F: GGCCATTCCATCCGGGGTGA R: AAGGCAGCCCTCAGCTCTCG | NM_012854.2 |
| <i>Il18</i> | F: ACCACTTTGGCAGACTTCACT R: ACACAGGCGGGTTTCTTTTG | NM_019165.1 |
| <i>Il1β</i> | F: GCACAGTTCCTCCAACTGGTA R: TGTCCCGACCATTGCTGTTT | NM_031512.2 |
| <i>Nlrp3</i> | F: CTCTGCATGCCGTATCTGGT R: GTCCTGAGCCATGGAAGCAA | NM_001191642.1 |
| <i>Caspase1</i> | F: ACAAGAAGGTGGCGCATTT R: GTGCTGCAGATAATGAGGGC | NM_012762.2 |
| <i>Tnfa</i> | F: AGCCCGTAGCCACGTCGTA R: CGGTGTGGGTGAGGAGCACG | NM_012675.3 |
| <i>Def28</i> | F: ACCTTAGCTGTGCTTGTGGT R: CCATGCCGTA AAAAGCACGTT | XM_063285210.1 |
| <i>Def49</i> | F: CTCAAGAAAGGCAAATGCAGACA R: CACGCACAAATATGCAGCAGT | NM_001037527.2 |
| <i>Aqp1</i> | F: GTGTGGGTCACATCAGTGGT R: CCACACACTGGGCGATGATA | NM_012778.2 |
| <i>Aqp9</i> | F: TAGGAAGTCCCCACAGTTGC R: TGGCCATGGGTTTTCTCA | XM_039082099.2 |
| <i>Gapdh</i> | F: ACAGCCGCATCTTCTTGTGC R: GCCTCACCCCATTTGATGTT | NM_017008.4 |
| <i>Ppia</i> | F: TCTGCACTGCCAAGACTGAG R: TGGTCTTGCCATTCTGGAC | XM_039108606.2 |

847

848 4.2.7. Análise estatística

849

850 Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM) e
851 foram analisados quanto à normalidade dos resíduos pelos testes de Shapiro-
852 Wilk, D'Agostino & Pearson e Kolmogorov-Smirnov com $P > 0,05$. Para os dados
853 paramétricos foi realizada análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste

854 Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação entre três grupos
855 experimentais, ou teste t de Student para comparação entre dois grupos, usando
856 o programa GraphPad Prism® 8.0.2. Para todas as análises, as diferenças foram
857 consideradas significativas quando $P < 0.05$.

858

859 **4.3. RESULTADOS**

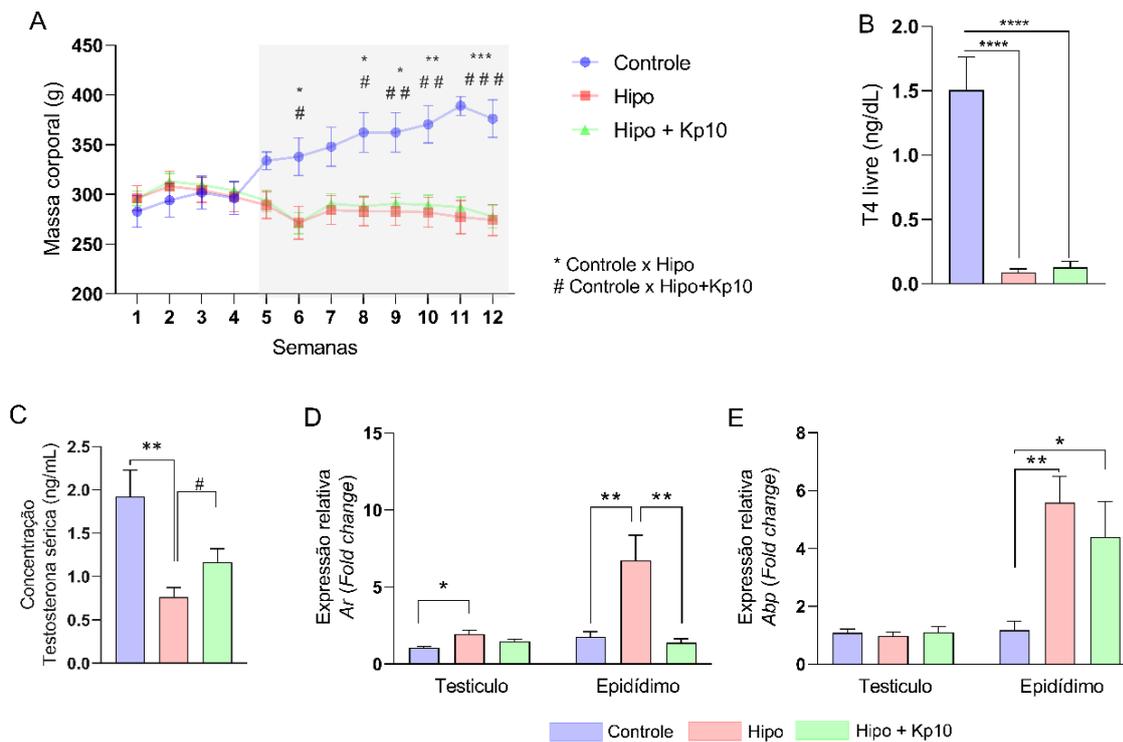
860

861 *4.3.1. Confirmação do hipotireoidismo, níveis de testosterona e expressão* 862 *testicular e epididimária de Ar e Abp em ratos hipotireoideos e tratados* 863 *com kisspeptina-10.*

864

865 Os animais hipotireoideos tratados ou não com Kp10 apresentaram menor
866 massa corporal após a sexta semana de tratamento com PTU comparado ao
867 controle (Figura 1A), assim como redução dos níveis plasmáticos de T4 livre
868 (Figura 1B; **** $P < 0,0001$), confirmando a indução do hipotireoidismo.

869 Uma vez que a hipofunção tireoidiana altera o eixo hipotalâmico-hipofisário-
870 gonadal (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018), foram avaliados nos animais
871 os níveis plasmáticos de testosterona e a expressão gênica testicular do receptor
872 de andrógeno (*Ar*) e da proteína ligadora de andrógenos (*Abp*), mediadores
873 hormonais chaves da função reprodutiva do macho (JAROW *et al.*, 2005; SMITH;
874 WALKER, 2014). Os animais hipotireoideos apresentaram redução dos níveis
875 plasmáticos de testosterona em relação ao controle (Figura 1C; $P < 0,01$), e o
876 tratamento com Kp10 reverteu essa alteração (Figura 1C; $P < 0,05$), não
877 apresentando diferença significativa comparado ao controle ($P > 0,05$). Por outro
878 lado, a expressão gênica de *Ar* aumentou no grupo hipotireoideo, tanto no
879 testículo ($P < 0,05$) quanto no epidídimo (Figura 1D; $P < 0,01$), enquanto o
880 tratamento com Kp10 reduziu a expressão gênica de *Ar* no epidídimo dos
881 animais hipotireoideos ($P < 0,01$), igualando ao controle (Figura 1D; $P > 0,05$).
882 Não houve diferença significativa da expressão do mRNA de *Abp* no testículo (P
883 $> 0,05$). No entanto, no epidídimo, houve aumento da expressão de *Abp* nos
884 animais hipotireoideos (Figura 1E; $P < 0,01$), e o tratamento com Kp10 não
885 alterou essa maior expressão ($P < 0,05$).



886 **Figura 1. Massa corporal, níveis de testosterona e T4 livre e expressão testicular e**
 887 **epididimária de *Ar* e *Abp* em ratos hipotireoideos e tratados com kisspeptina-10.** Massa
 888 corporal dos ratos Controle, Hipo e Hipo + Kp10 durante todo o período experimental (média ±
 889 SEM; n=8-16). B) Níveis de T4 livre (ng/dL) (média ± SEM; n= 6-7). C) Testosterona sérica (média
 890 ± SEM; n= 6-7). D) Expressão gênica relativa de *Ar* no testículo e epidídimo (média ± SEM; n=6).
 891 E) Expressão gênica relativa de *Abp* no testículo e epidídimo (média ± SEM; n=6). Diferenças
 892 significativas da ANOVA seguido de SNK são representadas por “*”, enquanto as diferenças
 893 encontradas no teste-t de Student são representadas por “#”. */#P < 0.05, **P < 0.01, ***P <
 894 0.001, ****p<0.0001.

895

896 4.3.2. O hipotireoidismo em ratos desregula a expressão testicular de citocinas 897 inflamatórias e o tratamento com kisspeptina-10 restabelece a expressão 898 de *Tnfa*.

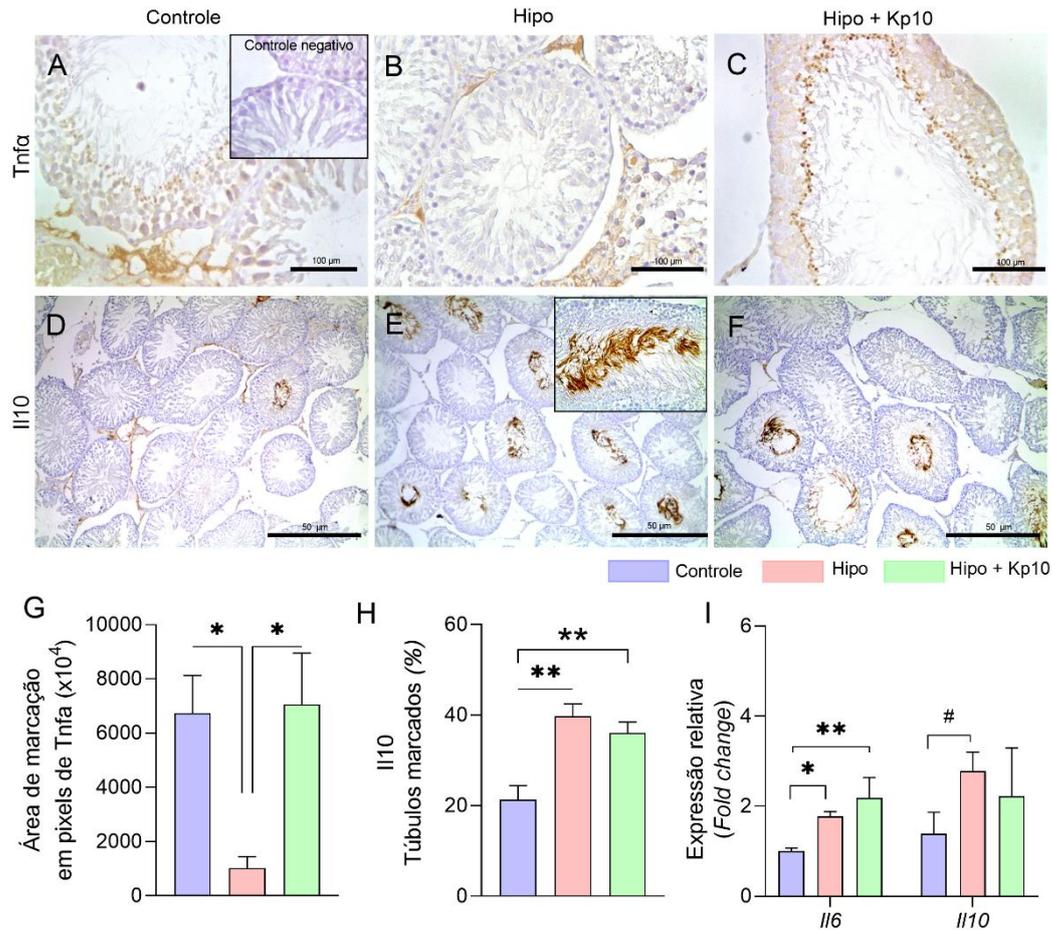
899

900 Considerando que o estabelecimento do ambiente tolerogênico testicular é
 901 fundamental para a progressão da espermatogênese (FERREIRO *et al.*, 2023; FIJAK;
 902 BHUSHAN; MEINHARDT, 2017), avaliou-se a expressão testicular das principais
 903 citocinas inflamatórias (*Tnfa*, *Il6* e *Il10*) nos ratos hipotireoideos, e se a Kp10
 904 poderia modular a expressão dessas citocinas. A imunomarcagem de *Tnfa* foi
 905 citoplasmática e/ou nuclear nas células intersticiais e do epitélio seminífero,
 906 principalmente em espermatogônias, espermátocitos e espermátides redondas

907 (Figura 2A-C). No entanto, a expressão foi reduzida intensamente nos animais
908 hipotireoideos em relação ao controle, particularmente no epitélio seminífero,
909 sendo que o tratamento com Kp10 reverteu essa alteração, como confirmado
910 pela análise da área de imunomarcacão (Figura 2G; $P < 0,05$).

911 Interessantemente, a imunomarcacão de IL-10, uma citocina anti-
912 inflamatória, foi restrita ao interstício e aos túbulos no estágio VI-VIII, com forte
913 marcacão em espermatides alongadas e espermatozoides (Figura 2D-F). Os
914 animais hipotireoideos apresentaram maior porcentagem de túbulos
915 imunomarcados quando comparados ao controle (Figura. 2H; $P < 0,01$), e o
916 tratamento com Kp10 não alterou essa maior expressão.

917 Em relação a análise dos transcritos gênicos, semelhante ao observado na
918 imuno-histoquímica, houve aumento do mRNA de *Il10* nos animais
919 hipotireoideos (Figura 2I; $P < 0,05$), enquanto o tratamento com Kp10 não
920 apresentou diferenças significativas em relação aos grupos controle e
921 hipotireoideo (Figura 2I; $P > 0,05$). Semelhante à *Il10*, os animais hipotireoideos
922 também apresentaram maior expressão testicular de *Il6* comparado ao controle
923 (Figura 2I; $P < 0,05$), e o tratamento com Kp10 não afetou essa maior expressão
924 ($P < 0,01$). Não houve amplificacão de transcritos para *Tnfa* nos testículos dos
925 animais. Em conjunto, esses dados sugerem que a hipofunção tireoidiana
926 desregula a expressão de citocinas inflamatórias no testículo de ratos.



927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944

Figura 2. **Expressão de citocinas inflamatórias no testículo de ratos com hipotireoidismo e tratados com Kp10.** A-C) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica da Tnf α no testículo de ratos dos grupos controle (A), hipo (B) e hipo + Kp10 (C) (Streptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina \de Harris; Barra = 100 μ m). D-F) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de Il10 no testículo de ratos dos grupos controle (D), hipo (E) e hipo + Kp10 (F) (Streptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 50 μ m). G) Área de imunomarcção em pixel da expressão de Tnf α no testículo (média \pm SEM; n=6-8). H) Porcentagem de túbulos seminíferos positivos para Il10 (média \pm SEM; n=6-8). I) Expressão gênica relativa de *Il6* e *Il10* no testículo (média \pm SEM; n=6). Diferenças significativas da ANOVA seguido de SNK são representadas por “*”, enquanto as diferenças encontradas no teste-t de Student são representadas por “#”. */#P < 0,05, **P < 0,01.

945 4.3.3. O hipotireoidismo favorece um microambiente pró-inflamatório no
946 epidídimo de ratos.

947

948 Tendo em vista que o hipotireoidismo alterou a expressão testicular de
949 citocinas inflamatórias nos animais, e que um ambiente tolerogênico epididimário
950 adequado também é necessário para a maturação e armazenamento dos
951 espermatozoides (BARRACHINA *et al.*, 2022; BATTISTONE *et al.*, 2020b; PLEUGER *et*
952 *al.*, 2022c), avaliamos a expressão epididimária de *Tnfa*, *Il6* e *Il10*, como também
953 de β -defensinas (*Def28* e *Def49*), nos animais. A análise dos transcritos gênicos
954 na cauda epididimária demonstrou que, diferente da expressão proteica no
955 testículo, a expressão de *Tnfa* aumentou nos animais hipotireoideos quando
956 comparada ao controle (Figura 3A; $P < 0,05$), enquanto o tratamento com Kp10
957 não apresentou diferenças significativas em relação aos grupos controle e
958 hipotireoideo ($P > 0,05$). Já a expressão de *Il6*, semelhante à do *Tnfa*, também
959 teve aumento nos animais hipotireoideos quando comparado ao controle (Figura
960 3A; $P < 0,05$), enquanto o grupo tratado com Kp10 apresentou uma tendência
961 de redução ($P = 0,05$) em relação ao grupo hipotireoideo, igualando ao controle
962 (Figura 3A; $P > 0,05$). Por outro lado, na avaliação da expressão de *Il10*, não
963 houve diferenças significativas entre os grupos (Figura 3A; $P > 0,05$).

964 Em relação às β -defensinas, houve aumento da expressão de *Def28* nos
965 animais hipotireoideos comparados ao controle (Figura 3B; $P < 0,01$), enquanto
966 o tratamento com Kp10 atenuou essa expressão, pois não apresentou diferença
967 significativa em relação ao controle (Figura 3B; $P > 0,05$). Não foi observada
968 diferença significativa na expressão de *Def49* entre os grupos (Figura 3B; $P >$
969 $0,05$).

970

971

972

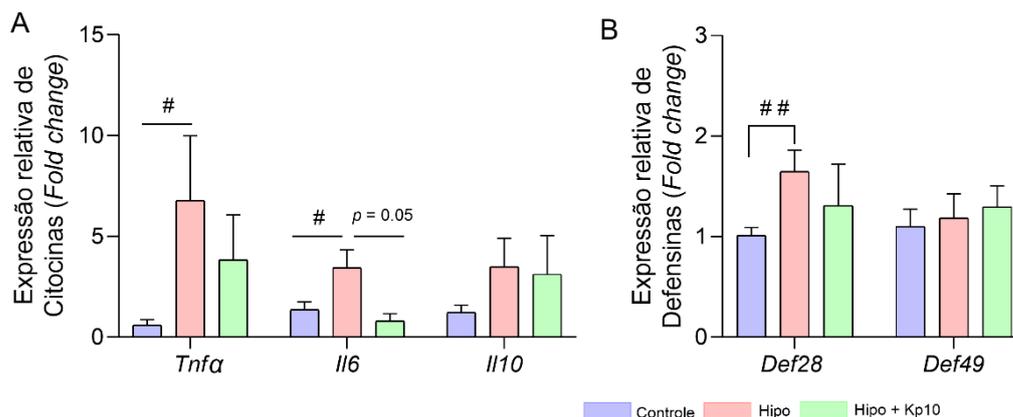
973

974

975

976

977



978

979 **Figura 3. Expressão de mediadores imunológicos no epidídimo de ratos com**
 980 **hipotireoidismo e tratados com Kp10.** Expressão gênica relativa de *Tnfa*, *Il6* e *Il10* (A) e *Def28*
 981 e *Def49* (B) no epidídimo de ratos dos grupos controle, hipo e hipo + Kp10 (média ± SEM; n= 6-
 982 7). Diferenças significativas encontradas no teste-t de Student. #P < 0,05, ##P < 0,01).

983

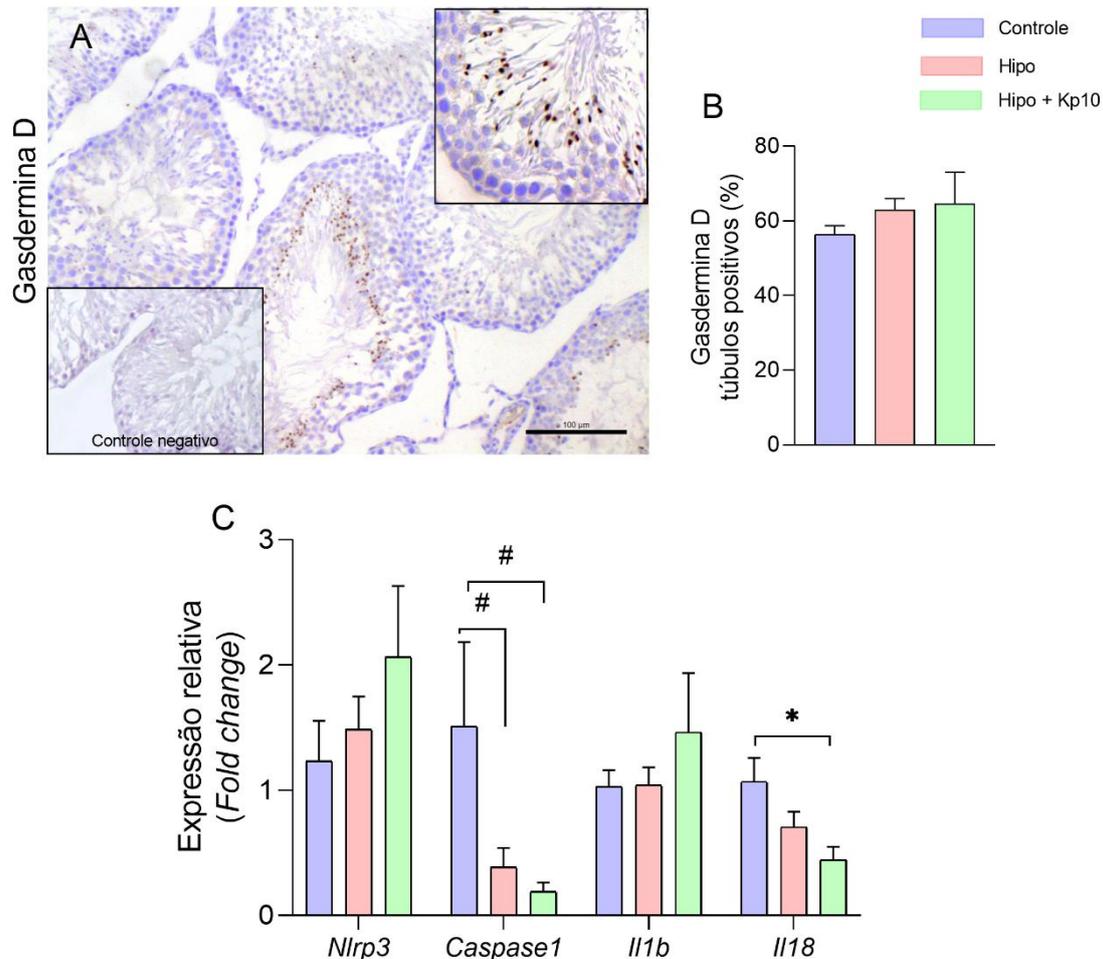
984 **4.3.4. O hipotireoidismo e tratamento com kisspeptina-10 regulam**
 985 **negativamente a expressão de Caspase1 e Il18, respectivamente, no**
 986 **testículo de ratos.**

987

988 Uma vez que a ativação do inflamassoma Nlrp3 e da piroptose também
 989 estão envolvidos na desregulação imune de disfunções testiculares (FANG *et*
 990 *al.*, 2021; MINUTOLI *et al.*, 2016; SU *et al.*, 2020b), avaliou-se a expressão de
 991 *Nlrp3*, *Il18*, *Il1β*, *caspase1* e Gasdermina D no testículo dos animais. O
 992 hipotireoidismo reduziu a expressão do mRNA de *Caspase1* em relação ao
 993 controle (Figura 4A; P < 0,05), e o tratamento com Kp10 não alterou essa menor
 994 expressão. Por outro lado, o tratamento com Kp10 reduziu a expressão de *Il18*
 995 comparado ao controle (P < 0,05), enquanto o grupo hipotireoideo não
 996 apresentou diferença significativa comparado ao controle (Figura 4A; P > 0,05).
 997 Não foram observadas diferenças significativas na expressão de *Nlrp3* e *Il1β*
 998 entre os grupos (Figura 4A; P > 0,05).

999

1000 Em relação a imunomarcagem de GasderminaD, um biomarcador de
 1001 piroptose (ORNING; LIEN; FITZGERALD, 2019), curiosamente observamos
 1002 forte expressão em espermátides redondas de túbulos no estágio V ou VI,
 1003 independente do grupo experimental (Figura 4B). No entanto, a porcentagem de
 túbulos marcados não diferiu entre os grupos (Figura 4C; P > 0,05).



1004

1005 **Figura 4. Expressão de mediadores do inflamassoma (*Nlrp3*, *Il1 β* , *Il18*) e piroptose (*Casp1***
 1006 **e Gasdermina D) no testículo de ratos hipotireoideos e tratados com Kp10.** A)
 1007 Fotomicrografia da expressão imuno-histoquímica da Gasdermina D no túbulo seminífero
 1008 (Streptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 100 μ m). B) Porcentagem de
 1009 túbulos positivos para Gasdermina D (média \pm SEM; n= 6-7). C) Expressão gênica relativa de
 1010 *Nlrp3*, *Caspase1*, *Il1 β* e *Il18* (média \pm SEM; n= 6-7). As diferenças significativas foram
 1011 encontradas por ANOVA seguido de SNK ou teste-t de Student. */#P < 0,05.

1012

1013 **4.3.5. O tratamento com Kp10 diminui a maior expressão testicular e**
 1014 **epididimária de proteínas juncionais causada pelo hipotireoidismo em**
 1015 **ratos.**

1016

1017 Pelo fato do ambiente tolerogênico testicular e epididimário também
 1018 depender da manutenção das barreiras HT e HE (OH *et al.*, 2016), avaliou-se a
 1019 expressão das proteínas juncionais Claudina-11 e Ocludina no testículo e
 1020 epidídimo dos ratos. Interessantemente, observamos imunomarcção testicular

1021 de Ocludina em espermatídes redondas e alongadas nos túbulos seminíferos em
1022 estágios VI-VII, além da membrana basal (Figura 5 A-C). Embora o grupo
1023 hipotireoideo tenha apresentado maior média de área imunomarcada comparada
1024 ao controle, não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 5 O; $P >$
1025 $0,05$). O tratamento com Kp10, por outro lado, reduziu a expressão de Ocludina
1026 nos animais comparado ao grupo hipotireoideo ($P < 0,05$), enquanto não teve
1027 diferença em relação ao controle ($P > 0,05$) Não houve diferença significativa na
1028 porcentagem de túbulos imunomarcados para Ocludina entre os grupos (Figura
1029 5P; $P > 0,05$).

1030 Já a imunomarcação testicular de Claudina-11 foi citoplasmática,
1031 heterogênea, presente em interstício, membrana basal e dentro do
1032 compartimento basal do túbulo seminífero (espermatogônias, espermatócitos e
1033 células de Sertoli) (Figura 5 D-F). A área de imunomarcação de Claudina-11 foi
1034 maior nos animais hipotireoideos comparados ao controle ($P < 0,05$), enquanto
1035 o tratamento com Kp10 foi capaz de reduzir essa maior expressão ($P < 0,01$),
1036 igualando ao controle (Figura 5O; $P > 0,05$).

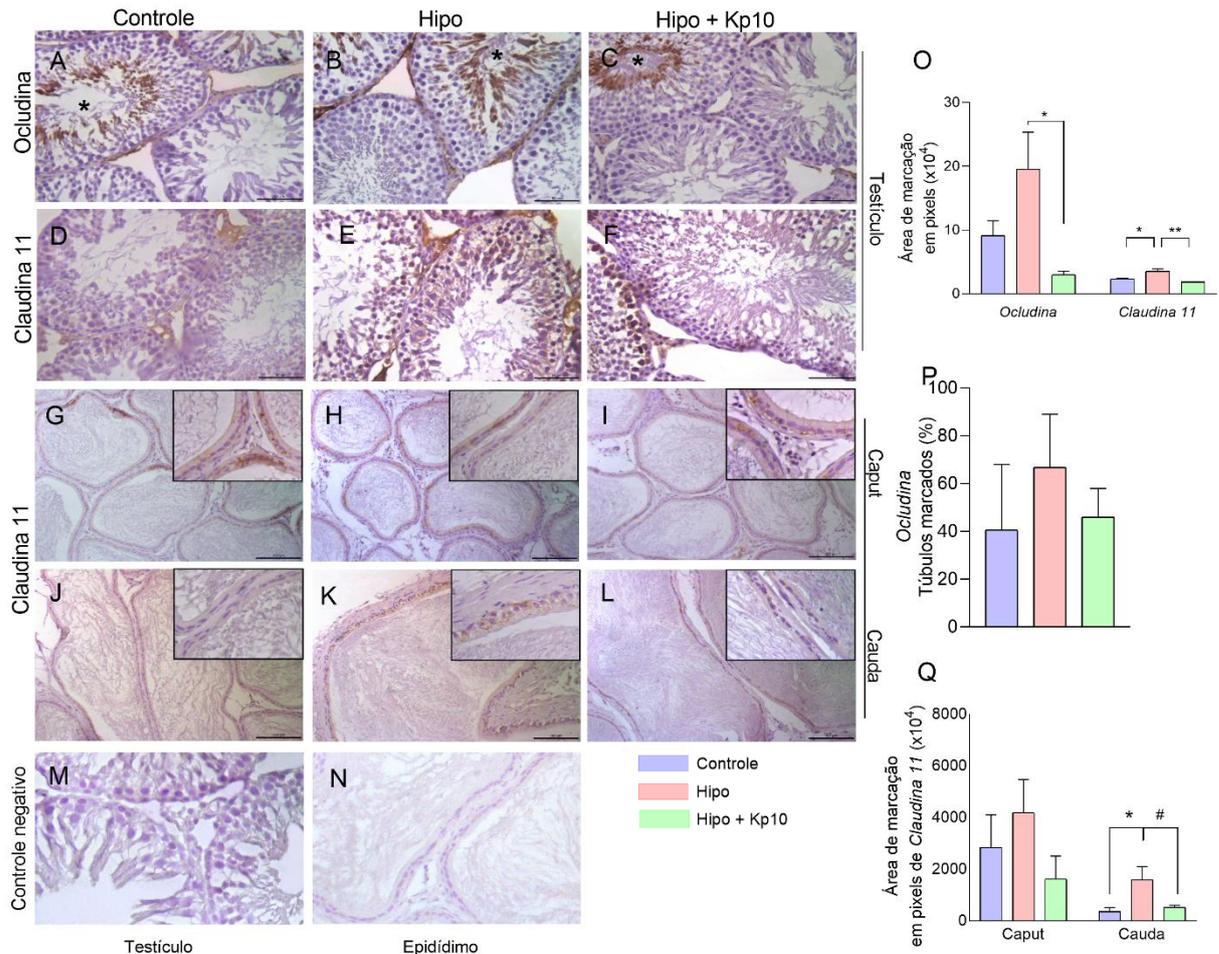
1037 Em relação a imunomarcação epididimária de Claudina 11, tanto na
1038 cabeça quanto na cauda, a expressão foi citoplasmática e de membrana,
1039 heterogênea (Figura 5G-L), com aumento da área de expressão na cauda
1040 epididimária do grupo hipotireoideo comparado ao controle (Figura 5Q; $P < 0,05$),
1041 enquanto o tratamento com Kp10 reverteu essa maior expressão ($P < 0,05$),
1042 igualando ao controle ($P > 0,05$). Não houve diferença significativa de Claudina
1043 11 na região da cabeça entre os grupos ($P > 0,05$).

1044

1045

1046

1047



1048

1049 **Figura 5. Expressão de proteínas juncionais em testículo e epidídimo de ratos com hipotireoidismo**
 1050 **e tratados com Kp10.** A-C) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica da Ocludina no testículo
 1051 de ratos dos grupos controle (A), hipo (B) e hipo+Kp10 (C) (Streptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina
 1052 de Harris; Barra = 100 µm). D-F) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de Claudina-11 no
 1053 testículo de ratos dos grupos controle (D), hipo (E) e hipo+Kp10 (F) (Streptavidina-biotina-peroxidase;
 1054 Hematoxilina de Harris; Barra = 100 µm). G-I) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de
 1055 Claudina-11 no caput epididimário de ratos dos grupos controle (G), hipo (H) e Hipo+Kp10 (I)
 1056 (Streptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 100 µm). J-L) Fotomicrografias da
 1057 expressão imuno-histoquímica de Claudina-11 na cauda epididimária de ratos dos grupos controle (J), hipo
 1058 (K) e hipo+Kp10 (L) (Streptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 100 µm). M-N)
 1059 Controle negativo (Streptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 100 µm). O) Área de
 1060 imunomarcção em pixel da expressão de Ocludina e Claudina-11 no testículo (média ± SEM; n=4). P)
 1061 Porcentagem de túbulos seminíferos positivos para Ocludina (média ± SEM; n=4). Q) Área de
 1062 imunomarcção em pixel da expressão de Claudina-11 no epidídimo (média ± SEM; n=4). Diferenças
 1063 significativas obtidas da ANOVA seguido de SNK ou teste-t de Student. */#P < 0,05, **P < 0,01.

1064

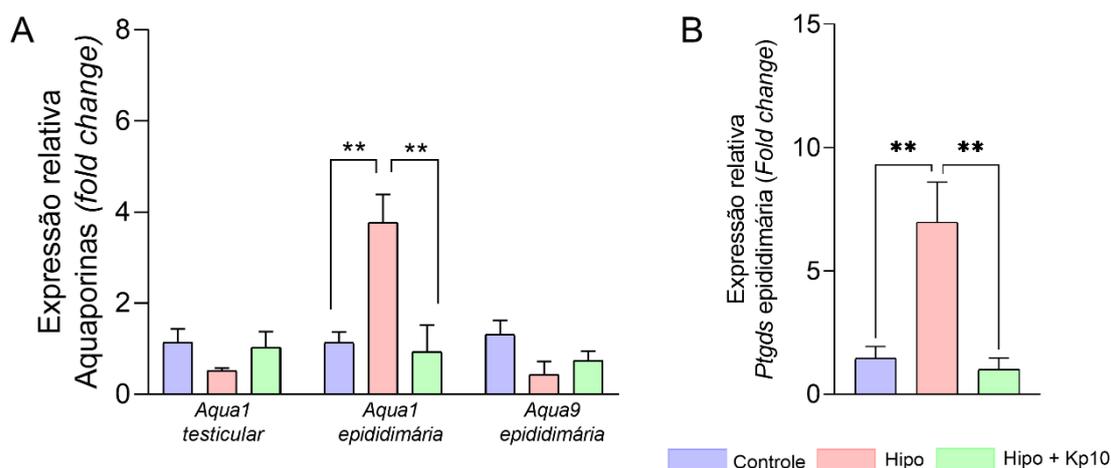
1065

1066 4.3.6. O tratamento com Kp10 reverte a maior expressão gênica epididimária de
1067 *Aqua1* e *Ptgds* causada pelo hipotireoidismo em ratos.

1068

1069 Uma vez que a expressão de aquaporinas e da prostaglandina D sintase
1070 também é essencial para a produção e maturação espermática adequada,
1071 fazendo parte das barreiras HT e HE (CAVARIANI et al., 2019; HOXHA;
1072 BARBONETTI; ZAPPACOSTA, 2023), avaliou-se a expressão de *Aqp1*, *Aqp9* e
1073 *Ptgds* no testículo e epidídimo dos animais. Em relação às aquaporinas, não
1074 houve diferença significativa na expressão testicular de *Aqp1* entre os grupos
1075 (Figura 6A; $P > 0,05$), enquanto não houve amplificação para *Aqp9* nesse tecido.
1076 Por outro lado, o hipotireoidismo aumentou a expressão gênica de *Aqp1* no
1077 epidídimo dos animais quando comparado ao controle (Figura 6A; $P < 0,05$), e o
1078 tratamento com Kp10 reverteu essa maior expressão ($P < 0,01$), igualando ao
1079 controle (Figura 6A; $P > 0,05$). Não foi observada diferença significativa na
1080 expressão epididimária de *Aqp9* entre os grupos (Figura 6A; $P > 0,05$).
1081 Semelhante à expressão de *Aqp1*, os animais hipotireoideos também
1082 apresentaram maior expressão epididimária de transcritos para *Ptgds*
1083 comparado ao controle ($P < 0,01$), e o tratamento com Kp10 reduziu a sua
1084 expressão ($P < 0,01$), igualando ao controle (Figura 6B; $P > 0,05$).

1085



1086

1087 **Figura 6. Expressão gênica de Aquaporinas e Prostaglandina D sintase (*Ptgds*) em testículo e**
1088 **epidídimo de ratos hipotireoideos e tratados com Kp10.** A-B) Expressão relativa de *Aqua1* e
1089 *Aqua9* em testículo e epidídimo (A) e de *Ptgds* (B) em epidídimo (média \pm SEM; n= 6-8). As diferenças
1090 significativas foram determinadas por ANOVA seguido de SNK. ** $P < 0,01$.

1091 4.4. DISCUSSÃO

1092

1093 O presente estudo demonstrou que a hipofunção tireoidiana em ratos
1094 desregula a imunologia testicular e promove um ambiente pró-inflamatório no
1095 epidídimo, além de aumentar a expressão de proteínas juncionais (Claudina 11
1096 e/ou Ocludina) e de transporte (*Aqua1* e *Ptgds*) associadas às barreiras HT e
1097 HE. O tratamento diário com Kp10, por outro lado, reverteu ou atenuou essas
1098 alterações (Figura 7), sugerindo outras vias pelas quais a kisspeptina melhora a
1099 disfunção testicular e epididimária causada pela hipofunção tireoidiana.

1100 O hipotireoidismo induzido pela administração de PTU, uma droga que
1101 bloqueia a tireoperoxidase (YOSHIHARA *et al.*, 2019), foi confirmado pela menor
1102 massa corporal dos animais após 6 semanas de tratamento e pela redução dos
1103 níveis plasmáticos de T4 livre. Essa condição causou redução dos níveis
1104 plasmáticos de testosterona, como também já foi demonstrado em estudos
1105 prévios (JAROW *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 1990; SANTOS *et al.*, 2023c). Por
1106 outro lado, houve um aumento da expressão gênica de *Ar* no testículo e
1107 epidídimo dos animais hipotireoideos, como também de *Abp* no epidídimo, que
1108 pode ser uma resposta compensatória dos baixos níveis de testosterona. O AR
1109 e a ABP são essenciais para a sinalização e função androgênica (CHRISTIN-
1110 MAITRE; YOUNG, 2022), pois ambos regulam a biodisponibilidade da
1111 testosterona (BURNSTEIN, 2005; LAURENT; VANDERSCHUEREN, 2014;
1112 MURASHIMA *et al.*, 2015; O'HARA; SMITH, 2015). Aumento da expressão de
1113 *Ar* já foi observado no testículo de ratos hipotireoideos (SANTOS *et al.*, 2023c)
1114 e no epidídimo de ratos castrados (QUARMBY *et al.*, 1990), diferente de ABP,
1115 cuja concentração estava reduzida no epidídimo de ratos adultos com
1116 hipotireoidismo congênito (KALA *et al.*, 2002). É plausível que essa diferença na
1117 ABP epididimária observada no presente estudo em relação ao trabalho de KALA
1118 *et al.* (2002) seja reflexo das diferenças nas idades dos animais e do tempo de
1119 indução do hipotireoidismo, uma vez que esses fatores influenciam as alterações
1120 causadas pela hipofunção tireoidiana no sistema genital do macho (AICELES;
1121 GOMBAR; DA FONTE RAMOS, 2017; ANELLI *et al.*, 2024). O tratamento diário
1122 com Kp10, por outro lado, foi capaz de aumentar os níveis plasmáticos de
1123 testosterona, além de restabelecer a expressão gênica de *Ar* no epidídimo dos
1124 ratos hipotireoideos. Esses dados corroboram com o estudo de Santos *et al.*

1125 (2023) que demonstrou melhora dos níveis de testosterona e da função gonadal
1126 em ratos com hipotireoidismo após administração de Kp10 (SANTOS *et al.*,
1127 2023c).

1128 Em relação ao sistema imunológico no testículo dos animais, o
1129 hipotireoidismo aumentou a expressão de *IL6* e IL-10, citocinas inflamatórias que
1130 também estão aumentadas em outras disfunções testiculares causadas por
1131 orquite (ZHU *et al.*, 2022), torção (ARABACI TAMER *et al.*, 2018), varicocele (JIA
1132 *et al.*, 2024) e obesidade (FAN *et al.*, 2018). A inflamação crônica é característica
1133 de doenças metabólicas, como a obesidade e o hipotireoidismo, pois ocorre
1134 alteração no fenótipo dos macrófagos testiculares (PONTE *et al.*, 2018),
1135 resultando em secreção aumentada de citocinas inflamatórias (LAINEZ; COSS,
1136 2019), aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e falhas na
1137 espermatogênese (BARATI; NIKZAD; KARIMIAN, 2020). Embora outros estudos
1138 tenham demonstrado o efeito de Kp10 em reduzir a expressão de citocinas
1139 inflamatórias no baço e útero de camundongos (YANG *et al.*, 2024), o tratamento
1140 diário no presente estudo não foi capaz de alterar a maior expressão testicular
1141 de *IL6* e IL-10 causada pelo hipotireoidismo. Uma vez que IL-10 é uma citocina
1142 anti-inflamatória, o seu aumento nos animais hipotireoideos, especialmente nos
1143 túbulos no estágio VI-VIII do ciclo do epitélio seminífero, pode ser uma resposta
1144 compensatória referente ao aumento de *IL6*, uma vez que IL-10 é necessária
1145 para manter o ambiente testicular imunossuprimido (WINNALL; MUIR;
1146 HEDGER, 2011), e outros estudos já demonstraram o seu aumento em resposta
1147 a processos inflamatórios testiculares (ERTÜRK *et al.*, 2022; JEON *et al.*, 2024;
1148 VOSS *et al.*, 2018).

1149 Contudo, interessante, o tratamento com Kp10 restabeleceu a
1150 imunomarcagem testicular de TNF α , que estava reduzida nos animais
1151 hipotireoideos. Apesar do TNF α , uma citocina pró-inflamatória, estar geralmente
1152 associada a processos inflamatórios testiculares (FAN *et al.*, 2018; HASSANI-
1153 BAFRANI *et al.*, 2019; MICHELI *et al.*, 2019; POLAT *et al.*, 2020), disfunções
1154 endócrinas podem estar associadas à redução testicular dessa citocina, como
1155 observado por Abarukwu *et al.* (2024) em camundongos tratados com atrazina,
1156 um desregulador endócrino (ABARIKWU *et al.*, 2024). TNF α é produzido por
1157 espermátides redondas, espermátócitos e macrófagos testiculares, enquanto
1158 populações de células de Sertoli e Leydig expressam o mRNA de seu receptor,

1159 *Tnfr1* (DE *et al.*, 1993), sugerindo que esta citocina apresenta papéis fisiológicos
1160 na regulação da espermatogênese. De fato, Pentikäinen *et al.* (2001)
1161 demonstraram *in vitro* que o $Tnfa$ inibe a apoptose de células germinativas
1162 regulando negativamente a expressão de Fas ligante, um indutor de apoptose
1163 testicular (PENTIKÄINEN *et al.*, 2001). Em nosso estudo, tivemos redução
1164 acentuada da imunoexpressão de $Tnfa$ no epitélio seminífero dos animais
1165 hipotireoideos, sendo que ratos com hipotireoidismo apresentam aumento da
1166 apoptose testicular e o tratamento com Kp10 é capaz de inibir essa apoptose
1167 (SANTOS *et al.*, 2024). SUH *et al.* (2008), utilizando camundongos *knockout* no
1168 testículo para *Tnfa*, demonstraram redução da esteroidogênese e
1169 espermatogênese, sugerindo outro papel fisiológico desta citocina (SUH *et al.*,
1170 2008). Ratos hipotireoideos apresentam redução da expressão testicular de
1171 enzimas esteroidogênicas, *Star* e *Cyp11a1*, enquanto o tratamento com Kp10
1172 nesses animais melhora a espermatogênese e a expressão de *Nr5a1*, um fator
1173 de transcrição que regula a esteroidogênese (SANTOS *et al.*, 2023c),
1174 corroborando com os resultados de $Tnfa$ do presente estudo.

1175 Semelhante ao observado no testículo, o hipotireodismo também
1176 aumentou a expressão epididimária de *Il6*, sendo que o tratamento com Kp10
1177 reduziu a sua expressão. O mesmo foi observado para *Tnfa*, que estava
1178 aumentado no epidídimo dos animais hipotireoideos. Esses dados sugerem que
1179 o hipotireoidismo causou um ambiente pró-inflamatório no epidídimo, enquanto
1180 Kp10 atenuou essa alteração. Resultados semelhantes foram também
1181 observados em homens e camundongos obesos que apresentam aumento dos
1182 níveis de $TNF\alpha$ e *IL6* no epidídimo (FAN *et al.*, 2018), como também foi
1183 observado por Pleuger *et al.* (2022) em modelo experimental de epididimite
1184 (PLEUGER *et al.*, 2022d).

1185 Além das citocinas inflamatórias, também avaliamos no epidídimo a
1186 expressão de β -defensinas, um importante peptídeo com propriedades
1187 antimicrobianas, e que tem sido associado a maturação e capacidade de
1188 fertilização do espermatozoide ao longo do ducto epididimário (RIBEIRO *et al.*,
1189 2016, 2018; ZHAO *et al.*, 2011). Em nosso estudo, o hipotireoidismo aumentou
1190 a expressão de *Def28*, enquanto o tratamento com Kp10 não reverteu essa maior
1191 expressão. O papel exato das β -defensinas no epidídimo ainda é incerto (PATIL
1192 *et al.*, 2005; HU *et al.*, 2014). No entanto, Biswas *et al.* (2011) observaram

1193 aumento nos níveis de mRNA de isoformas de β -defensinas na cauda
1194 epididimária de ratos tratados com lipopolissacarídeo (LPS) e sugeriram que o
1195 aumento observado nas citocinas *Il6* e *Tnfa* seria responsável pela regulação
1196 positiva das β -defensinas (BISWAS; YENUGU, 2011). Isso corrobora com os
1197 resultados do presente estudo, uma vez que teve aumento de *Tnfa* e *Il6* no
1198 epidídimo dos animais hipotireoideos. No entanto, mais estudos são necessários
1199 para compreender o aumento epididimário de *Def28* causado pelo
1200 hipotireoidismo e seus efeitos na fertilidade do macho.

1201 Considerando que alterações na imunologia testicular também podem
1202 estar associadas a ativação da via do inflamassoma NLRP3, como observado
1203 por Fan *et al.* (2018) na condição obesogênica e em modelos de varicocele
1204 (HAJIPOUR *et al.*, 2018) e orquite (SU *et al.*, 2020c), avaliamos mediadores
1205 dessa via no presente trabalho, uma vez que estudos já demonstraram ativação
1206 do inflamassoma NLRP3 na interface materno-fetal (SANTOS *et al.*, 2023a) e
1207 coração (SAHIN *et al.*, 2019a) de ratos hipotireoideos. No entanto, os animais
1208 hipotireoideos não tiveram alterações na expressão de *Nlrp3*, *Il1 β* e *Il18*,
1209 enquanto o tratamento com Kp10 reduziu a expressão testicular de *Il18*.

1210 O NLRP3 é considerado um sensor global de dano celular (LI *et al.*,
1211 2020) e inicia uma resposta inflamatória por meio da ativação de Caspase1,
1212 responsável por clivar as citocinas IL1 β e IL18 em suas formas ativas, além de
1213 poder ativar a proteína GasderminaD, que causa piroptose (BORTOLUCI;
1214 MEDZHITOV, 2010). A menor expressão de *Il18* observada nos animais tratados
1215 com Kp10 sugere que esse peptídeo pode modular a via do inflamassoma no
1216 testículo, uma vez que estudos já demonstraram *in vitro* e *in vivo* o papel
1217 imunorregulatório da Kp10 (LI *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2024), enquanto
1218 SANTOS *et al.* (2023) demonstraram o bloqueio da via inflamassoma NLRP3 na
1219 interface materno-fetal de ratas hipotireoideas após o tratamento com Kp10
1220 (SANTOS *et al.*, 2023a). No entanto, o presente estudo carece da análise
1221 proteica dos mediadores dessa via para uma análise mais completa da mesma.
1222 Além disso, os animais hipotireoideos apresentaram redução da expressão
1223 testicular de *Caspase1*, diferente de outros estudos que demonstraram aumento
1224 dessa citocina na condição de hipotireodismo (SAHIN *et al.*, 2019b; SANTOS *et*
1225 *al.*, 2023a), reforçando a necessidade de mais pesquisas nesta área.

1226 Curiosamente, apesar de não ter diferença entre os grupos, todos os
1227 animais apresentaram imunomarcção de GasderminaD no epitélio seminífero
1228 e que foi restrita a espermátides redondas dos túbulos em estágio V-VI. A
1229 GasderminaD é conhecida como uma executora da piroptose, pois é
1230 responsável pela formação de poros na membrana celular e a lise da célula (SHI
1231 et al., 2015). Dessa forma, a imunomarcção dessa proteína nas espermátides
1232 redondas, independente do grupo, sugere a participação na mesma no processo
1233 de espermiogênese, embora mais estudos sejam necessários para confirmar
1234 essa hipótese.

1235 Uma vez que a desregulação de citocinas e β -defensinas estão
1236 associadas a alterações na permeabilidade das barreiras HT e HE, resultando
1237 na morte das células germinativas (PÉREZ *et al.*, 2012b; ZHANG *et al.*, 2014),
1238 também avaliamos a expressão de proteínas juncionais, como Claudina-11 e
1239 Ocludina, e de aquaporinas, proteínas importantes na regulação do
1240 microambiente local e transporte de água, necessários para o desenvolvimento
1241 de espermatozoides funcionais (GREGORY; CYR, 2014c; MITA; HINTON;
1242 DUFOUR, 2011b). A hipofunção tireoidiana aumentou a imunomarcção de
1243 Claudina11 no testículo e na cauda do epidídimo, como também a expressão
1244 gênica epididimária de *Aqua1*, sendo que o tratamento com Kp10 foi capaz de
1245 não somente restabelecer a expressão de *Aqua1* e a imunomarcção testicular
1246 e epididimária de Claudina-11, como também de reduzir a expressão testicular
1247 de Ocludina.

1248 As Claudinas e Ocludinas são importantes para o estabelecimento das
1249 junções estreitas e falhas na barreira HT geralmente estão associadas a perda
1250 ou diminuição dessas proteínas (KATO *et al.*, 2020; MCCABE *et al.*, 2016; PAN
1251 *et al.*, 2018; PÉREZ *et al.*, 2012a). No entanto, o aumento na expressão testicular
1252 de Claudina11 e/ou Ocludina já foi observado em disfunções reprodutivas. Oh *et*
1253 *al.* (2016b) descreveram o aumento da expressão de Claudina11 e desregulação
1254 de Ocludina em modelo de varicocele em ratos, como também foi observado na
1255 expressão testicular de Claudina11 em cães criptorquídicos (JHUN *et al.*, 2022)
1256 e em modelo de estresse oxidativo testicular em camundongos (ZHANG *et al.*,
1257 2013). Além disso, aumento de Ocludina testicular e desarranjo na sua
1258 expressão epitelial foi observada em coelhos com hiperlipidemia (MORGAN *et*

1259 *al.*, 2014a), sendo que hiperlipidemia é observada em indivíduos com
1260 hipotireoidismo (SU *et al.*, 2022).

1261 A expressão testicular de Claudina em ratos é específica de estágio, não
1262 estando presente apenas no estágio VIII, e sua localização é principalmente na
1263 base do túbulo seminífero, estruturando a barreira HT (LI *et al.*, 2006; MORROW
1264 *et al.*, 2010). Curiosamente, em nosso estudo, observamos a expressão dessa
1265 proteína também em espermátides redondas/alongadas, sugerindo outro papel
1266 fisiológico na espermatogênese, especialmente na espermiogênese. No entanto,
1267 mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

1268 O aumento de Claudina11 observado nos animais hipotireoideos pode
1269 ser um mecanismo adaptativo do epitélio germinativo em resposta a hipofunção
1270 tireoidiana, buscando evitar comprometimento da barreira HT, uma vez que as
1271 células de Sertoli sintetizam e inserem mais proteínas juncionais no
1272 compartimento basal proporcionando maior rigidez para a barreira (MORGAN *et*
1273 *al.*, 2014). Por outro lado, essa maior expressão pode influenciar negativamente
1274 a dinâmica da barreira HT, modificando sua permeabilidade e dificultando a
1275 passagem de espermátócitos pré-leptótenos/leptótenos através dela, retardando
1276 a espermatogênese. Esse mecanismo pode contribuir para a maior quantidade
1277 de células testiculares apoptóticas e espermatozoides com defeitos patológicos
1278 encontrados em ratos hipotireoideos (SANTOS *et al.*, 2024).

1279 Já no epidídimo, o aumento observado na expressão de Claudina11 nos
1280 animais hipotireoideos difere do que foi observado em outras condições
1281 patológicas epididimárias em que houve redução da sua expressão, como em
1282 modelos murinos de disfunção epididimária e espermática causada por restrição
1283 de sono (DOMÍNGUEZ-SALAZAR *et al.*, 2020) e infecção pelo Zika vírus
1284 (SHENG *et al.*, 2021). Talvez este aumento observado na expressão
1285 epididimária de Claudina11 seja um mecanismo compensatório para a maior
1286 expressão de *Aqua1* observada nestes animais, no intuito de conter a maior
1287 reabsorção de líquido do lúmen epididimário, uma vez que as aquaporinas são
1288 as principais proteínas transportadores de água no ducto epididimário
1289 (SCHIMMING *et al.*, 2017). Estudos anteriores corroboram com nossos
1290 resultados pois demonstraram aumento de aquaporinas nos rins de ratos (CHEN
1291 *et al.*, 2005; YEUM *et al.*, 2002) e coelhos (MULDER *et al.*, 2003) hipotireoideos.
1292 Mais recentemente, também verificamos aumento de *Aqua5* na tuba uterina de

1293 ratas com hipotireoidismo (dados não publicados). Em conjunto, nossos dados
1294 sugerem uma desregulação e permeabilidade osmótica aumentada no ducto
1295 epididimário de ratos causada pela hipofunção tireoidiana, que pode favorecer a
1296 menor qualidade espermática observada nesses animais (SANTOS *et al.*,
1297 2023c). Além disso, a redução da expressão epididimária de *Aqua1* e *Claudina-*
1298 *11* causada pela Kp10, se igualando ao controle, sugere que a Kp10 aumenta a
1299 qualidade espermática de ratos hipotireoideos (SANTOS *et al.*, 2023c) por
1300 regular o transporte de fluidos na barreira HE.

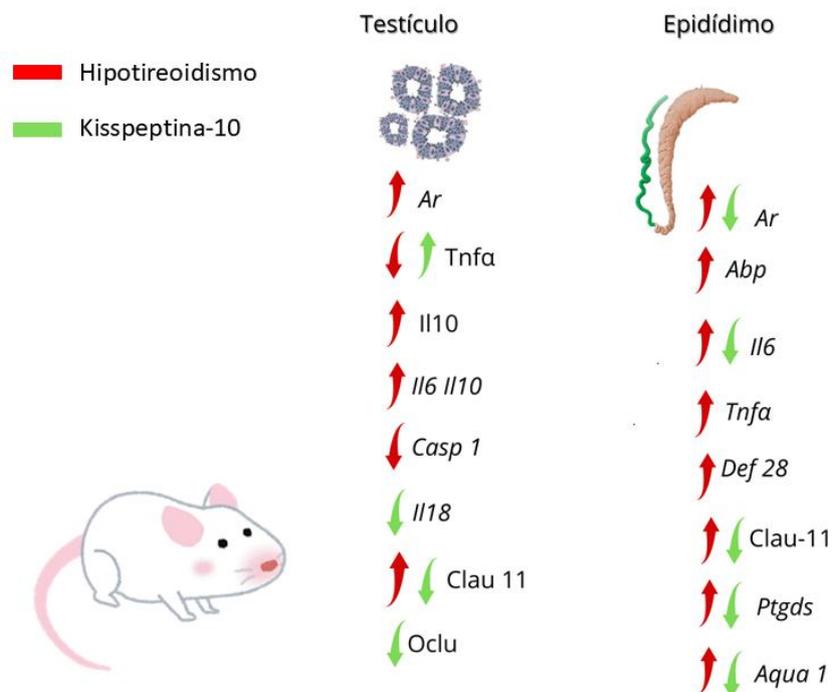
1301 Semelhante ao observado para *Aqua1*, o hipotireoidismo também
1302 aumentou a expressão gênica epididimária de prostaglandina D2 sintase
1303 (*Ptgds*), enquanto o tratamento com Kp10 restabeleceu a sua expressão. A
1304 PTGDS é uma das principais proteínas secretórias epididimárias em várias
1305 espécies de animais e está envolvida no catabolismo do ácido araquidônico
1306 (FOUCHÉCOURT *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2022). Além disso, estudos sugerem
1307 que ela esteja envolvida no transporte de ácido retinoico e hormônios esteroides
1308 no fluido epididimário (FOUCHÉCOURT *et al.*, 2002; LEONE; HAQ; SASO,
1309 2002), influenciando a maturação espermática. Dessa forma, o aumento
1310 observado nos animais hipotireoideos pode ser um efeito compensatório da
1311 redução da testosterona plasmática, visando aumentar a concentração de
1312 testosterona intratubular. Interessantemente, camundongos *knockout* para
1313 *Ocludina* apresentam redução acentuada da imunomarcação epididimária de
1314 PTGDS, sugerindo a sua participação na infertilidade e degeneração epitelial
1315 epididimária apresentada por esses animais (LIU *et al.*, 2022). Este estudo
1316 corrobora com o presente trabalho, pois os animais hipotireoideos tratados com
1317 Kp10 apresentaram redução da *Ocludina* testicular concomitante à redução da
1318 *Ptgds* epididimária. Desse modo, em conjunto, esses dados sugerem que o
1319 tratamento com Kp10 atenua as alterações na barreira HE causadas pelo
1320 hipotireodismo.

1321 Os achados deste estudo demonstraram que a hipofunção tireoidiana
1322 em ratos compromete o microambiente imunológico testicular e epididimário,
1323 além de desregular a expressão de proteínas juncionais e de transporte no
1324 testículo e/ou epidídimo, enquanto o tratamento com Kp10 atenuou essas
1325 alterações. Este é o primeiro estudo que caracterizou o perfil de mediadores
1326 imunológicos e de proteínas de barreira no trato genital de ratos machos

1327 hipotireoideos e demonstrou o potencial terapêutico da Kp10 em regular o
 1328 ambiente tolerogênico testicular e epididimário.

1329

1330



1331

1332

1333

1334

1335

1336

1337

1338

1339

1340

1341

1342

1343

1344

1345

1346

1347

1348

Figura 7. Efeitos do hipotireoidismo e tratamento com kisspeptina-10 na expressão testicular e epididimária de mediadores imunológicos, proteínas juncionais e de transporte em ratos machos adultos. Fonte: Arquivo pessoal.

1349

1350 **5. REFERÊNCIAS**

1351

1352 ABARIKWU, S. O.; COIMBRA, J. L. P.; CAMPOLINA-SILVA, G.; ROCHA, S. T.; COSTA, V. V.;

1353 LACERDA, S. M. S. N.; COSTA, G. M. J. Acute effects of atrazine on the immunoexpressions of

1354 sertoli and germ cells molecular markers, cytokines, chemokines, and sex hormones levels in

1355 mice testes and epididymides. **Chemosphere**, v. 363, p. 142852, 1 set. 2024. doi:

1356 10.1016/j.chemosphere.2024.142852. PMID: 39019188

1357 AICELES, V.; GOMBAR, F.; DA FONTE RAMOS, C. Hormonal and testicular changes in rats

1358 submitted to congenital hypothyroidism in early life. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.

1359 439, p. 65–73, 5 jan. 2017. doi: 10.1016/j.mce.2016.10.026. PMID: 27793676

1360 ALAHMAR, A.; DUTTA, S.; SENGUPTA, P. Thyroid hormones in male reproduction and

1361 infertility. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 8, n. 5, p. 203–210, 1 set. 2019.

1362 doi: 10.4103/2305-0500.268135

1363 ALHEALY, E.; ALQAZAZ, M.; AL-NUAIMY, W. Impact of Selenium on Structural Changes

1364 Induced by Hypothyroidism In Adult Male Rat 's Testis. **Iraqi Journal of Pharmacy**, v. 18, n. 1,

1365 p. 20–32, 1 ago. 2021. doi: 10.33899/iph.2021.168799

1366 ALKHAYAL, A.; MAHZARI, M.; ALHAMMADI, A. S.; ALMUTAIRI, R. R.; BAFAQIH, S. M.;

1367 ALSULTAN, Z. M.; ALQARNI, S. S.; ALIBRAHIM, A. R. Prevalence of Hypogonadism

1368 Symptoms Among Males With Hypothyroidism at a Tertiary Hospital: A Cross-Sectional Study.

1369 **Cureus**, v. 15, n. 12, 10 dez. 2023. doi: 10.7759/cureus.50255. PMID: 38089945 PMCID:

1370 PMC10711326.

1371 ANELLI, V.; GATTA, E.; PIROLA, I.; DELBARBA, A.; ROTONDI, M.; CAPPELLI, C. Thyroid

1372 impairment and male fertility: a narrative review of literature. The aging male: the official journal

1373 of the International Society for the Study of the. **Aging Male**, v. 27, n. 1, 2024. doi:

1374 10.1080/13685538.2024.2310303. PMID: 38347677.

1375 ANJUM, S.; KRISHNA, A.; SRIDARAN, R.; TSUTSUI, K. Localization of Gonadotropin-

1376 Releasing Hormone (GnRH), Gonadotropin-Inhibitory Hormone (GnIH), Kisspeptin and GnRH

1377 Receptor and Their Possible Roles in Testicular Activities From Birth to Senescence in Mice. **J**

1378 **Exp Zool A Ecol Genet Physiol**, v. 317, n. 10, p. 630, dez. 2012. doi: 10.1002/jez.1765. PMID:

1379 23027641

1380 AQUINO, N. S. S.; KOKAY, I. C.; PEREZ, C. T.; LADYMAN, S. R.; HENRIQUES, P. C.; SILVA,

1381 J. F.; BROBERGER, C.; GRATTAN, D. R.; SZAWKA, R. E. Kisspeptin Stimulation of Prolactin

1382 Secretion Requires Kiss1 Receptor but Not in Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurons.

1383 **Endocrinology**. 2019 Mar 1;160(3):522-533. doi: 10.1210/en.2018-00932. PMID: 30668693

1384 ARABACI TAMER, S.; YILDIRIM, A.; KÖROĞLU, M. K.; ÇEVİK, Ö.; ERCAN, F.; YEĞEN, B.

1385 Nesfatin-1 ameliorates testicular injury and supports gonadal function in rats induced with testis

1386 torsion. **Peptides**. 2018 Sep;107:1-9. doi: 10.1016/j.peptides.2018.07.005. PMID: 30031042.

1387 ARRIGHI, S.; ARALLA, M.; GENOVESE, P.; PICABEA, N.; BIELLI, A. Undernutrition during

1388 foetal to prepubertal life affects aquaporin 9 but not aquaporins 1 and 2 expression in the male

1389 genital tract of adult rats. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p. 1661–1669, dez. 2010. doi:

1390 10.1016/j.theriogenology.2010.06.039. PMID: 20708787.

1391 BAHAR, A.; AKHA, O.; KASHI, Z.; VESGARI, Z. Hyperprolactinemia in association with

1392 subclinical hypothyroidism. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 2, n. 2, p. 229, mar.

1393 2011. PMID: 24024022 PMCID: PMC3766941.

1394 BAI, B.; YANG, Y.; WANG, Q.; LI, M.; TIAN, C.; LIU, Y.; AUNG, L. H. H.; LI, P. feng; YU, T.;

1395 CHU, X. ming. NLRP3 inflammasome in endothelial dysfunction. **Cell Death and Disease**, v.

1396 11, n. 9, 2020. doi: 10.1038/s41419-020-02985-x. PMID: 32948742 PMCID: PMC7501262.

- 1397 BARATI, E.; NIKZAD, H.; KARIMIAN, M. Oxidative stress and male infertility: current knowledge
1398 of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. **Cell Mol Life Sci.**
1399 v. 77, n. 1, p. 93–113, 1 jan. 2020. doi: 10.1007/s00018-019-03253-8. PMID: 31377843 PMCID:
1400 PMC11105059.
- 1401 BARRACHINA, F.; OTTINO, K.; TU, L. J.; SOBERMAN, R. J.; BROWN, D.; BRETON, S.;
1402 BATTISTONE, M. A. CX3CR1 deficiency leads to impairment of immune surveillance in the
1403 epididymis. **Cell Mol Life Sci.** v. 80, n. 1, 1 jan. 2022. doi: 10.1007/s00018-022-04664-w.
1404 PMID: 36550225 PMCID: PMC9948740.
- 1405 BATTISTONE, M. A.; ELIZAGARAY, M. L.; BARRACHINA, F.; OTTINO, K.; MENDELSON, A.
1406 C.; BRETON, S. Immunoregulatory mechanisms between epithelial clear cells and mononuclear
1407 phagocytes in the epididymis. **Andrology**, v. 12, n. 5, p. 949–963, 1 jul. 2024. doi:
1408 10.1111/andr.13509. PMID: 37572347 PMC10859549.
- 1409 BATTISTONE, M. A.; MENDELSON, A. C.; SPALLANZANI, R. G.; BROWN, D.; NAIR, A. V.;
1410 BRETON, S. Region-specific transcriptomic and functional signatures of mononuclear
1411 phagocytes in the epididymis. **Molecular Human Reproduction**, v. 26, n. 1, p. 14–29, 1 jan.
1412 2020a. doi: 10.1093/molehr/gaz059. PMC: 6992890 PMID: 31778536.
- 1413 BATTISTONE, M. A.; SPALLANZANI, R. G.; MENDELSON, A. C.; CAPEN, D.; NAIR, A. V.;
1414 BROWN, D.; BRETON, S. Novel role of proton-secreting epithelial cells in sperm maturation
1415 and mucosal immunity. **Journal of Cell Science**, v. 133, n. 5, 1 mar. 2020c. doi:
1416 10.1242/jcs.233239. PMCID: PMC7003979 PMID: 31636115.
- 1417 BELLEANNÉE, C.; THIMON, V.; SULLIVAN, R. Region-specific gene expression in the
1418 epididymis. **Cell and Tissue Res** v. 349, n. 3, p. 717–731, set. 2012. doi: 10.1007/s00441-012-
1419 1381-0. PMID: 22427067.
- 1420 BISWAS, B.; YENUGU, S. Antimicrobial Responses in the Male Reproductive Tract of
1421 Lipopolysaccharide Challenged Rats. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 65,
1422 n. 6, p. 557–568, 1 jun. 2011. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00937. x. PMID: 21199063
- 1423 BOBZIEN, B.; YASUNAMI, Y.; MAJERCIK, M.; LACY, P. E.; DAVIE, J. M. Intratesticular
1424 transplants of islet xenografts (rat to mouse). **Diabetes**, v. 32, n. 3, p. 213–216, 1983. doi:
1425 10.2337/diab.32.3.213. PMID: 6402406
- 1426 BORTOLUCI, K. R.; MEDZHITOV, R. Control of infection by pyroptosis and autophagy: Role of
1427 TLR and NLR. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 10, p. 1643–1651, 13 mar.
1428 2010. doi: 10.1007/s00018-010-0335-5. PMID: 20229126 PMCID: PMC11115606.
- 1429 BRETON, S.; RUAN, Y. C.; PARK, Y. J.; KIM, B. Regulation of epithelial function, differentiation,
1430 and remodeling in the epididymis. **Asian Journal of Andrology**, v. 18, n. 1, p. 3, 1 jan. 2015.
1431 DOI: 10.4103/1008-682X.165946. PMID: 26585699 PMCID: PMC4736353.
- 1432 BROWN, D.; KATSURA, T.; KAWASHIMA, M.; VERKMAN, A. S.; SABOLIC, I. Cellular
1433 distribution of the aquaporins: a family of water channel proteins. **Histochemistry and Cell**
1434 **Biol**, v. 104, n. 1, p. 1–9, jul. 1995. doi: 10.1007/BF01464780. PMID: 7584554.
- 1435 BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling.
1436 **Nature Rev Immunol**, v. 16, n. 7, p. 407–420, 1 jul. 2016. doi: 10.1038/nri.2016.58. PMID:
1437 27291964.
- 1438 BURNSTEIN, K. L. Regulation of androgen receptor levels: Implications for prostate cancer
1439 progression and therapy. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 95, n. 4, p. 657–669, 1 jul.
1440 2005. doi: 10.1002/jcb.20460. PMID: 15861399.
- 1441 BUZZARD, J. J.; MORRISON, J. R.; O'BRYAN, M. K.; SONG, Q.; WREFORD, N. G.
1442 Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. **Biology of**
1443 **Reproduction**, v. 62, n. 3, p. 664–669, 2000. doi: 10.1095/biolreprod62.3.664. PMID: 10684808.

- 1444 CANNARELLA, R.; CONDORELLI, R. A.; MONGIOÌ, L. M.; LA VIGNERA, S.; CALOGERO, A.
1445 E. Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently Idiopathic Male
1446 Infertility. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1728, 1 mar. 2020. DOI:
1447 10.3390/ijms21051728. PMID: 32138324 PMCID: PMC7084762.
- 1448 CAVARIANI, M. M.; SANTOS, T. de M.; PEREIRA, D. N.; DE ALMEIDA CHUFFA, L. G.;
1449 PINHEIRO, P. F. F.; SCARANO, W. R.; DOMENICONI, R. F. Maternal protein restriction
1450 differentially alters the expression of AQP1, AQP9 and VEGFr-2 in the epididymis of rat
1451 offspring. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, 1 fev. 2019. doi:
1452 10.3390/ijms20030469. PMID: 30678254 PMCID: PMC6387270.
- 1453 CHAN, Y. M.; BUTLER, J. P.; PINNELL, N. E.; PRALONG, F. P.; CROWLEY, W. F.; REN, C.;
1454 CHAN, K. K.; SEMINARA, S. B. Kisspeptin Resets the Hypothalamic GnRH Clock in Men. **The**
1455 **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 6, p. E908, jun. 2011. doi:
1456 10.1210/jc.2010-3046. PMCID: PMC 3100758 PMID: 21470997.
- 1457 CHEN, Q.; DENG, T.; HAN, D. Testicular immunoregulation and spermatogenesis. **Seminars in**
1458 **Cell & Developmental Biology**, v. 59, p. 157–165, 1 nov. 2016. doi:
1459 10.1016/j.semcd.2016.01.019. PMID: 26805443.
- 1460 CHEN, Y. C.; CADNAPAPHORNCHAI, M. A.; YANG, J.; SUMMER, S. N.; FALK, S.; LI, C.;
1461 WANG, W.; SCHRIER, R. W. Nonosmotic release of vasopressin and renal aquaporins in
1462 impaired urinary dilution in hypothyroidism. **Am J Physiol Renal Physiol**. v. 289, n. 4 58-4,
1463 2005. doi: 10.1152/ajprenal.00384.2004. PMID: 15914774.
- 1464 CHRISTIN-MAITRE, S.; YOUNG, J. Androgens and spermatogenesis. **Ann Endocrinol**, v. 83,
1465 n. 3, p. 155–158, 1 jun. 2022. doi: 10.1016/j.ando.2022.04.010. PMID: 35489414.
- 1466 CLARKSON, J.; D'ANGLEMONT DE TASSIGNY, X.; COLLEDGE, W. H.; CARATY, A.;
1467 HERBISON, A. E. Distribution of Kisspeptin Neurones in the Adult Female Mouse Brain.
1468 **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21, n. 8, p. 673–682, 1 ago. 2009. doi: 10.1111/j.1365-
1469 2826.2009.01892. x. PMID: 19515163.
- 1470 CONDORELLI, R. A.; LA VIGNERA, S.; MONGIOÌ, L. M.; ALAMO, A.; GIACONE, F.;
1471 CANNARELLA, R.; CALOGERO, A. E. Thyroid hormones and spermatozoa: In vitro effects on
1472 sperm mitochondria, viability and DNA integrity. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 5, p. 756,
1473 27 maio 2019. doi: 10.3390/jcm8050756. PMCID: PMC6571713 PMID: 31137924.
- 1474 CORNWALL, G. A. New insights into epididymal biology and function. **Human Reproduction**
1475 Update, v. 15, n. 2, p. 213–227, 2009. doi: 10.1093/humupd/dmn055. PMCID: PMC2639084
1476 PMID: 19136456.
- 1477 CORTÉS, M. E.; CARRERA, B.; RIOSECO, H.; PABLO DEL RÍO, J.; VIGIL, P. The Role of
1478 Kisspeptin in the Onset of Puberty and in the Ovulatory Mechanism: A Mini-review. **Journal of**
1479 **Pediatric and Adolescent Gynecology**, v. 28, n. 5, p. 286–291, 1 out. 2015. doi:
1480 10.1016/j.jpag.2014.09.017. PMID: 26231608.
- 1481 CYR, D. G.; DUFRESNE, J.; GREGORY, M. Cellular junctions in the epididymis, a critical
1482 parameter for understanding male reproductive toxicology. **Reproductive Toxicology**, v. 81, p.
1483 207–219, 1 out. 2018. Doi: 10.1016/j.reprotox.2018.08.013. PMID: 30130578.
- 1484 CYR, D. G.; GREGORY, M.; DUBÉ, É.; DUFRESNE, J.; CHAN, P. T. K.; HERMO, L.
1485 Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance
1486 of the blood-epididymal barrier in animals and humans. **Asian Journal of Andrology**, v. 9, n. 4,
1487 p. 463–475, 2007. doi: 10.1111/j.1745-7262.2007.00308. x. PMID: 17589783.
- 1488 DABBOUS, Z.; ATKIN, S. L. Hyperprolactinaemia in male infertility: Clinical case scenarios.
1489 **Arab Journal of Urology**, v. 16, n. 1, p. 44–52, 2018. doi: 10.1016/j.aju.2017.10.002. PMID:
1490 29713535 PMCID: PMC5922222.

- 1491 DAI, T.; YANG, L.; WEI, S.; CHU, Y.; DAN, X. The effect of gonadotropin-inhibitory hormone on
1492 steroidogenesis and spermatogenesis by acting through the hypothalamic-pituitary-testis axis in
1493 mice. **Endocrine**, v. 84, n. 2, p. 745–756, 1 maio 2024. doi: 10.1007/s12020-024-03690-x.
1494 PMID: 38285410.
- 1495 DE NARDO, D.; LATZ, E. NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease.
1496 **Trends in Immunology**. 2011 Aug;32(8):373-9. doi:10.1016/j.it.2011.05.004. Epub 2011 Jul 4.
1497 PMID: 21733753 PMCID: PMC3151541.
- 1498 DE OLIVEIRA, L. S.; DA SILVA, T. Q. M.; BARBOSA, E. M. E.; DOS ANJOS CORDEIRO, J.
1499 M.; SANTOS, L. C.; HENRIQUES, P. C.; SANTOS, B. R.; GUSMAO, D. D. O.; DE MACEDO, I.
1500 O.; SZAWKA, R. E.; SILVA, J. F. Kisspeptin Treatment Restores Ovarian Function in Rats with
1501 Hypothyroidism. **Thyroid**. 2022 Dec;32(12):1568-1579. doi: 10.1089/thy.2021.0638. PMID:
1502 35765915
- 1503 DE PAUL, A. L.; MUKDSI, J. H.; PELLIZAS, C. G.; MONTESINOS, M.; GUTIÉRREZ, S.;
1504 SUSPERREGUY, S.; DEL RÍO, A.; MALDONADO, C. A.; TORRES, A. I. Thyroid hormone
1505 receptor alpha 1-beta 1 expression in epididymal epithelium from euthyroid and hypothyroid
1506 rats. **Histochemistry and cell biology**, v. 129, n. 5, p. 631–642, doi: 10.1007/s00418-008-
1507 0397-8. PMID: 18299881.
- 1508 DE, S. K.; CHEN, H. L.; PACE, J. L.; HUNT, J. S.; TERRANOVA, P. F.; ENDERS, G. C.
1509 Expression of tumor necrosis factor-alpha in mouse spermatogenic cells. **Endocrinology**, v.
1510 133, n. 1, p. 389–396, 1 jul. 1993. doi: 10.1210/endo.133.1.8319585. PMID: 8319585.
- 1511 DEL RIO, A. G.; BLANCO, A. M.; NIEPOMNISZCZE, H.; BURGOS, M.; FORNES, W. N.
1512 Changes in the epididymal ultrastructure in hypothyroid rats. **Archives of andrology**, v. 43, n.
1513 3, p. 197–201, 1999. doi: 10.1080/01485010390205011.
- 1514 DHILLO, W. S.; CHAUDHRI, O. B.; THOMPSON, E. L.; MURPHY, K. G.; PATTERSON, M.;
1515 RAMACHANDRAN, R.; NIJHER, G. K.; AMBER, V.; KOKKINOS, A.; DONALDSON, M.;
1516 GHATEI, M. A.; BLOOM, S. R. Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently
1517 during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. **The Journal of Clinical**
1518 **Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 10, p. 3958–3966, 2007. doi: 10.1210/jc.2007-1116.
1519 PMID: 17635940.
- 1520 DING, J.; WANG, K.; LIU, W.; SHE, Y.; SUN, Q.; SHI, J.; SUN, H.; WANG, D. C.; SHAO, F.
1521 Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. **Nature**. v. 535, n.
1522 7610, p. 111–116, 8 jun. 2016. doi: 10.1038/nature18590. PMID: 27281216.
- 1523 DOMÍNGUEZ-SALAZAR, E.; HURTADO-ALVARADO, G.; MEDINA-FLORES, F.; DORANTES,
1524 J.; GONZÁLEZ-FLORES, O.; CONTIS-MONTES DE OCA, A.; VELÁZQUEZ-MOCTEZUMA, J.;
1525 GÓMEZ-GONZÁLEZ, B. Chronic sleep loss disrupts blood–testis and blood–epididymis
1526 barriers, and reduces male fertility. **Journal of Sleep Research**, v. 29, n. 3, p. e12907, 1 jun.
1527 2020. doi: 10.1111/jsr.12907. PMID: 31578801.
- 1528 DUAN, Y. G.; GONG, J.; YEUNG, W. S. B.; HAIDL, G.; ALLAM, J. P. Natural killer and NKT
1529 cells in the male reproductive tract. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 142, 1 nov.
1530 2020. doi: 10.1016/j.jri.2020.103178. PMID: 32739646.
- 1531 DUBÉ, E.; CHAN, P. T. K.; HERMO, L.; CYR, D. G. Gene Expression Profiling and Its
1532 Relevance to the Blood-Epididymal Barrier in the Human Epididymis. **Biology of**
1533 **Reproduction**, v. 76, n. 6, p. 1034–1044, 1 jun. 2007. doi: 10.1095/biolreprod.106.059246.
1534 PMID: 17287494.
- 1535 DUTTA, S.; SANDHU, N.; SENGUPTA, P.; ALVES, M. G.; HENKEL, R.; AGARWAL, A.
1536 Somatic-Immune Cells Crosstalk In-The-Making of Testicular Immune Privilege. **Reproductive**
1537 **Sciences**, v. 29, n. 10, p. 2707–2718, 1 out. 2022. doi: 10.1007/s43032-021-00721-0. PMID:
1538 34580844.

- 1539 DUTTA, S.; SENGUPTA, P.; MUHAMAD, S. Male reproductive hormones and semen quality.
1540 **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 8, n. 5, p. 189–194, 1 set. 2019.
1541 DOI:10.4103/2305-0500.268132.
- 1542 SAHIN, E.; BEKTUR, E.; BAYCU, C.; BURUKOGLU DÖNMEZ, D.; KAYGISIZ, B.
1543 Hypothyroidism increases expression of sterile inflammation proteins in rat heart tissue. **Acta**
1544 **Endocrinológica**. v. 5, n. 1, p. 39–45, 2019. doi: 10.4183/aeb.2019.39. PMID: 31149058
1545 PMCID: PMC6535312.
- 1546 EL-KASHLAN, A. M.; NOOH, M. M.; HASSAN, W. A.; RIZK, S. M. Therapeutic Potential of Date
1547 Palm Pollen for Testicular Dysfunction Induced by Thyroid Disorders in Male Rats. **PLOS ONE**,
1548 v. 10, n. 10, p. e0139493, 1 out. 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0139493. PMCID:
1549 PMC4591363 PMID: 26425844.
- 1550 EL-SHAER, R. A. A.; IBRAHIM, S.; HEWADY, P. M.; ATEF, M. M.; EL-DEEB, O. S.; HAFEZ, Y.
1551 M.; AMER, R. S.; EL-SHARNOBY, J. A. E. H.; ABUHASHISH, N. A.; AWAD, M. M. Selenium
1552 protects against nesfatin-1 modulation of the hypothalamic-pituitary-testicular axis during
1553 hypothyroidism in male rats. **Physiological Reports**, v. 12, n. 2, p. e15923, 1 jan. 2024. doi:
1554 10.14814/phy2.15923. PMID: 38268116 PMCID: PMC10808778.
- 1555 ERTÜRK, A.; DEMIR, S.; GÜNAL, Y. D.; ZENGİN, M.; ÇINAR, M.; YILDIZ, D.; KARAHAN, S.;
1556 ŞENEL, E. The impact of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental
1557 testicular torsion in rats. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 52, n. 2, p. 505–513, 1 jan.
1558 2022. doi: 10.55730/1300-0144.5339. PMID: 36161618.
- 1559 FAN, W.; XU, Y.; LIU, Y.; ZHANG, Z.; LU, L.; DING, Z. Obesity or Overweight, a Chronic
1560 Inflammatory Status in Male Reproductive System, Leads to Mice and Human Subfertility.
1561 **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. JAN, p. 1117, 4 jan. 2018. doi: 10.3389/fphys.2017.01117.
1562 PMID: 29354072 PMCID: PMC5758580.
- 1563 FANG, Y.; SU, Y.; XU, J.; HU, Z.; ZHAO, K.; LIU, C.; ZHANG, H. Varicocele-Mediated Male
1564 Infertility: From the Perspective of Testicular Immunity and Inflammation. **Frontiers in**
1565 **Immunology**, v. 12, p. 729539, 31 ago. 2021. doi: 10.3389/fimmu.2021.729539. PMID:
1566 34531872 PMCID: PMC8438154.
- 1567 FENG, T.; BAI, J. H.; XU, X. L.; LIU, Y. Kisspeptin and its Effect on Mammalian
1568 Spermatogenesis. **Current Drug Metabolism**, v. 20, n. 1, p. 9–14, 30 jan. 2018. doi:
1569 10.2174/1389200219666180129112406. PMID: 29380696.
- 1570 FERREIRO, M. E.; MÉNDEZ, C. S.; GLIENKE, L.; SOBARZO, C. M.; FERRARIS, M. J.;
1571 PISERA, D. A.; LUSTIG, L.; JACOBO, P. V.; THEAS, M. S. Unraveling the effect of the
1572 inflammatory microenvironment in spermatogenesis progression. **Cell and Tissue Research**, v.
1573 392, n. 2, p. 581–604, 1 maio 2023. Doi: 10.1007/s00441-022-03703-z. PMID: 36627392.
- 1574 FIJAK, M.; BHUSHAN, S.; MEINHARDT, A. The Immune Privilege of the Testis. Immune
1575 Infertility: Impact of Immune Reactions on Human Fertility, **Immune Infertility**, p. 97–107, 1 jan.
1576 2017. doi: 10.1007/978-3-319-40788-3_5.
- 1577 FIJAK, M.; MEINHARDT, A. The testis in immune privilege. **Immunological Reviews**, v. 213, n.
1578 1, p. 66–81, out. 2006. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2006.00438. x. PMID: 16972897.
- 1579 FOUCHÉCOURT, S.; CHAURAND, P.; DAGUE, B. B.; LAREYRE, J. J.; MATUSIK, R. J.;
1580 CAPRIOLI, R. M.; ORGEBIN-CRIST, M. C. Epididymal Lipocalin-Type Prostaglandin D2
1581 Synthase: Identification Using Mass Spectrometry, Messenger RNA Localization, and
1582 Immunodetection in Mouse, Rat, Hamster, and Monkey. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 2,
1583 p. 524–533, 1 fev. 2002. doi: 10.1095/biolreprod66.2.524. PMID: 11804971.
- 1584 FRANÇOIS XAVIER, K. N.; PATRICK BRICE, D. D.; MODESTE, W. N.; ESTHER, N.; ALBERT,
1585 K.; PIERRE, K.; PIERRE, W. Preventive effects of Aframomum melegueta extracts on the

- 1586 reproductive complications of propylthiouracil-induced hypothyroidism in male rat. **Andrologia**,
1587 v. 51, n. 7, 1 ago. 2019. doi: 10.1111/and.13306. PMID: 31074045.
- 1588 FRIEND, D. S.; GILULA, N. B. Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues.
1589 **Journal of Cell Biology**, v. 53, n. 3, p. 758–776, 1972. doi: 10.1083/jcb.53.3.758. PMID:
1590 4337577 PMCID: PMC2108762.
- 1591 FUMEL, B.; FROMENT, P.; HOLZENBERGER, M.; LIVERA, G.; MONGET, P.;
1592 FOUCHÉCOURT, S. Expression of Dominant-Negative Thyroid Hormone Receptor Alpha1 in
1593 Leydig and Sertoli Cells Demonstrates No Additional Defect Compared with Expression in
1594 Sertoli Cells Only. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0119392, 20 mar. 2015. doi:
1595 10.1371/journal.pone.0119392. PMID: 25793522 PMCID: PMC4368620.
- 1596 FUSCO, F.; VERZE, P.; CAPECE, M.; NAPOLITANO, L. Suppression of Spermatogenesis by
1597 Exogenous Testosterone. **Current Pharmaceutical Design**, v. 27, n. 24, p. 2750–2753, 8 dez.
1598 2020. doi: 10.2174/1381612826666201207104340. PMID: 33292112.
- 1599 GAO, Y.; MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. Sertoli cells are the target of environmental toxicants in
1600 the testis – a mechanistic and therapeutic insight. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v.
1601 19, n. 8, p. 1073–1090, 1 ago. 2015. doi: 10.1517/14728222.2015.1039513. PMID: 25913180
1602 PMCID: PMC4822540.
- 1603 GE, X.; HE, Z.; CAO, C.; XUE, T.; JING, J.; MA, R.; ZHAO, W.; LIU, L.; JUERAITETIBAIKE, K.;
1604 MA, J.; FENG, Y.; QIAN, Z.; ZOU, Z.; CHEN, L.; FU, C.; SONG, N.; YAO, B. Protein
1605 palmitoylation-mediated palmitic acid sensing causes blood-testis barrier damage via inducing
1606 ER stress. **Redox biology**, v. 54, 1 ago. 2022. doi: 10.1016/j.redox.2022.102380. PMID:
1607 35803125 PMCID: PMC9287734.
- 1608 GONG, J.; ZENG, Q.; YU, D.; DUAN, Y. G. T Lymphocytes and Testicular Immunity: A New
1609 Insight into Immune Regulation in Testes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22,
1610 n. 1, p. 1–21, 1 jan. 2021. doi: 10.3390/ijms22010057. PMID: 33374605 PMCID: PMC7793097.
- 1611 GREGORY, M.; CYR, D. G. The blood-epididymis barrier and inflammation **Spermatogenesis**.
1612 2014 Dec 31;4(2):e979619. doi: 10.4161/21565562.2014.979619. PMCID: PMC4581054 PMID:
1613 26413391.
- 1614 GRISWOLD, M. D. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. **Physiological Reviews**, v.
1615 96, n. 1, p. 1, 1 jan. 2015. doi: 10.1152/physrev.00013.2015. PMID: 26537427 PMCID:
1616 PMC4698398.
- 1617 HAJIPOUR, E.; JALALI MASHAYEKHI, F.; MOSAYEBI, G.; BAAZM, M.; ZENDEDEL, A.
1618 Resveratrol decreases apoptosis and NLRP3 complex expressions in experimental varicocele
1619 rat model. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, n. 2, p. 225, 1 fev. 2018. doi:
1620 10.22038/IJBMS.2018.21943.5625. PMCID: PMC5811763 PMID: 29456821.
- 1621 HAN, Y.; PENG, X.; SI, W.; LIU, G.; HAN, Y.; JIANG, X.; NA, R.; YANG, L.; WU, J.; E, G.;
1622 ZENG, Y.; ZHAO, Y.; HUANG, Y. Local expressions and function of Kiss1/GPR54 in goats'
1623 testes. **Gene**, v. 738, 15 maio 2020. doi: 10.1016/j.gene.2020.144488. PMID: 32087275.
- 1624 HARDY, M. P.; KIRBY, J. D.; HESS, R. A.; COOKE, P. S. Leydig cells increase their numbers
1625 but decline in steroidogenic function in the adult rat after neonatal hypothyroidism.
1626 **Endocrinology**, v. 132, n. 6, p. 2417–2420, 1 jun. 1993. doi: 10.1210/endo.132.6.8504746.
1627 PMID: 8504746.
- 1628 HASSANI-BAFRANI, H.; NAJARAN, H.; RAZI, M.; RASHTBARI, H. Berberine ameliorates
1629 experimental varicocele-induced damages at testis and sperm levels; evidences for oxidative
1630 stress and inflammation. **Andrologia**, v. 51, n. 2, 1 mar. 2019. doi: 10.1111/and.13179. PMID:
1631 30334274.

- 1632 HAU, R. K.; WRIGHT, S. H.; CHERRINGTON, N. J. Drug Transporters at the Human Blood-
1633 Testis Barrier. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 51, n. 5, p. 560, 1 maio 2023. doi:
1634 10.1124/dmd.122.001186. PMID: PMC10158500 PMID: 36732077.
- 1635 HAVERFIELD, J. T.; MEACHEM, S. J.; O'BRYAN, M. K.; MCLACHLAN, R. I.; STANTON, P. G.
1636 Claudin-11 and connexin-43 display altered spatial patterns of organization in men with primary
1637 seminiferous tubule failure compared with controls. **Fertility and Sterility**, v. 100, n. 3, p. 658-
1638 666.e3, 1 set. 2013. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.04.034. PMID: 23706332.
- 1639 HAYRABEDYAN, S.; TODOROVA, K.; JABEEN, A.; METODIEVA, G.; TOSHKOV, S.;
1640 METODIEV, M. V.; MINCHEFF, M.; FERNÁNDEZ, N. Sertoli cells have a functional NALP3
1641 inflammasome that can modulate autophagy and cytokine production. **Scientific Reports**, v. 6,
1642 p. 18896, 8 jan. 2016. doi: doi.org/10.1038/srep18896.
- 1643 HEDGER, M. P. Testicular leukocytes: what are they doing? **Reviews of Reproduction**, v. 2, n.
1644 1, p. 38–47, 1997. doi: 10.1530/ror.0.0020038. PMID: 9414464.
- 1645 HEDGER, M. P. Immunophysiology and Pathology of Inflammation in the Testis and
1646 Epididymis. **Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, p. 625–640, 12 nov. 2011. doi:
1647 10.2164/jandrol.111.012989. Epub 2011 Jul 15. PMID: 21764900; PMID: PMC7166903.
- 1648 HEDGER, M. P.; MEINHARDT, A. Local regulation of T cell numbers and lymphocyte-inhibiting
1649 activity in the interstitial tissue of the adult rat testis. **Journal of reproductive immunology**, v.
1650 48, n. 2, p. 69–80, out. 2000. doi: 10.1016/s0165-0378(00)00071-1. PMID: 11011073.
- 1651 HERMANN, B. P.; CHENG, K.; SINGH, A.; ROA-DE LA CRUZ, L.; MUTOJI, K. N.; CHEN, I. C.;
1652 GILDERSLEEVE, H.; LEHLE, J. D.; MAYO, M.; WESTERNSTRÖER, B.; LAW, N. C.; OATLEY,
1653 M. J.; VELTE, E. K.; NIEDENBERGER, B. A.; FRITZE, D.; SILBER, S.; GEYER, C. B.;
1654 OATLEY, J. M.; MCCARREY, J. R. The Mammalian Spermatogenesis Single-Cell
1655 Transcriptome, from Spermatogonial Stem Cells to Spermatids. **Cell Reports**, v. 25, n. 6, p.
1656 1650- 1667.e8, 11 nov. 2018. doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.026. PMID: 30404016; PMID:
1657 PMC6384825.
- 1658 HESS, R. A.; DE FRANCA, L. R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium.
1659 **Adv Exp Med Biol**. 2008; 636:1-15. doi: 10.1007/978-0-387-09597-4_1. PMID: 19856159.
- 1660 HSU, M. C.; WANG, J. Y.; LEE, Y. J.; JONG, D. S.; TSUI, K. H.; CHIU, C. H. Kisspeptin
1661 modulates fertilization capacity of mouse spermatozoa. **Reproduction**. 2014 Jun;147(6):835-
1662 45. doi: 10.1530/REP-13-0368. Epub 2014 Feb 24. PMID: 24567427.
- 1663 HU, K. L.; ZHAO, H.; CHANG, H. M.; YU, Y.; QIAO, J. Kisspeptin/Kisspeptin Receptor System
1664 in the Ovary. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. JAN, p. 365, 4 jan. 2018. doi:
1665 10.3389/fendo.2017.00365. PMID: PMC5758547 PMID: 29354093.
- 1666 IBRAHIM, A. A.; MOHAMMED, N. A.; EID, K. A.; ABOMUGHAIID, M. M.; ABDELAZIM, A. M.;
1667 ABOREGELA, A. M. Hypothyroidism: morphological and metabolic changes in the testis of adult
1668 albino rat and the amelioration by alpha-lipoic acid. **Folia Morphologica**, v. 80, n. 2, p. 352–
1669 362, 31 maio 2021. doi: 10.5603/FM. a2020.0071. Epub 2020 Jul 9. PMID: 32644186.
- 1670 IRFAN, S.; EHMCKE, J.; SHAHAB, M.; WISTUBA, J.; SCHLATT, S. Immunocytochemical
1671 localization of kisspeptin and kisspeptin receptor in the primate testis. **J Med Primatol**, v. 45, n.
1672 3, p. 105–111, 1 jun. 2016. doi: 10.1111/jmp.12212. Epub 2016 Mar 14. PMID: 26987570.
- 1673 IRFAN, S.; EHMCKE, J.; WAHAB, F.; SHAHAB, M.; SCHLATT, S. Intratesticular action of
1674 kisspeptin in rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Andrologia**, v. 46, n. 6, p. 610–617, 1 ago.
1675 2014. doi: 10.1111/and.12121. Epub 2013 Jun 12. PMID: 23758287.
- 1676 ITOH, M. Testicular Autoimmunity: A Cause of Male Infertility. 2017. DOI: 10.1007/978-4-431-
1677 54460-9

- 1678 ITOH, M.; TERAYAMA, H.; NAITO, M.; OGAWA, Y.; TAINOSHO, S. Tissue microcircumstances
1679 for leukocytic infiltration into the testis and epididymis in mice. **Journal of Reproductive**
1680 **Immunology**, v. 67, n. 1–2, p. 57–67, 2005. doi: 10.1016/j.jri.2005.06.007. Epub 2005 Aug 18.
1681 PMID: 16111766.
- 1682 JACOBO, P.; GUAZZONE, V. A.; THEAS, M. S.; LUSTIG, L. Testicular autoimmunity.
1683 **Autoimmun Rev.** 2011 Feb;10(4):201-4. doi: 10.1016/j.autrev.2010.09.026. Epub 2010 Oct 14.
1684 PMID: 20932942.
- 1685 JAMES, E. R.; CARRELL, D. T.; ASTON, K. I.; JENKINS, T. G.; YESTE, M.; SALAS-
1686 HUETOS, A. The Role of the Epididymis and the Contribution of Epididymosomes to
1687 Mammalian Reproduction. **Int J Mol Sci.** 2020 Jul 29;21(15):5377. doi:
1688 10.3390/ijms21155377. PMID: 32751076; PMCID: PMC7432785.
- 1689 JAROW, J. P.; WRIGHT, W. W.; BROWN, T. R.; YAN, X.; ZIRKIN, B. R. Bioactivity of
1690 Androgens Within the Testes and Serum of Normal Men. **J Androl.** 2005 May-Jun;26(3):343-8.
1691 doi: 10.2164/jandrol.04100. PMID: 15867001.
- 1692 JAYASENA, C. N.; ABBARA, A.; VELDHUIS, J. D.; COMNINOS, A. N.; RATNASABAPATHY,
1693 R.; DE SILVA, A.; NIJHER, G. M. K.; GANIYU-DADA, Z.; MEHTA, A.; TODD, C.; GHATEI, M.
1694 A.; BLOOM, S. R.; DHILLO, W. S. Increasing LH Pulsatility in Women With Hypothalamic
1695 Amenorrhoea Using Intravenous Infusion of Kisspeptin-54. **The Journal of Clinical**
1696 **Endocrinology and Metabolism**, v. 99, n. 6, p. E953, 2014. doi: 10.1210/jc.2013-1569. Epub
1697 2014 Feb 11. PMID: 24517142; PMCID: PMC4207927.
- 1698 JEON, B. J.; KO, Y. J.; CHA, J. J.; KIM, C.; SEO, M. Y.; LEE, S. H.; PARK, J. Y.; BAE, J. H.;
1699 TAE, B. S. Examining the Relationship Between Polystyrene Microplastics and Male Fertility:
1700 Insights From an In Vivo Study and In Vitro Sertoli Cell Culture. **J Korean Med Sci.** 2024 Oct
1701 7;39(38):e259. doi: 10.3346/jkms.2024.39. e259. PMID: 39376189; PMCID: PMC11458380.
- 1702 JHUN, H.; LEE, W. Y.; PARK, J. K.; HWANG, S. G.; PARK, H. J. Transcriptomic Analysis of
1703 Testicular Gene Expression in a Dog Model of Experimentally Induced Cryptorchidism. *Cells*, v.
1704 11, n. 16, p. 2476, 1 ago. 2022. doi: 10.3390/cells11162476. PMID: 36010553; PMCID:
1705 PMC9406621.
- 1706 JIA, Z. chao; LIU, S. jing; CHEN, T. fei; SHI, Z. zhuo; LI, X. lin; GAO, Z. wang; ZHANG, Q.;
1707 ZHONG, C. fu. Chlorogenic acid can improve spermatogenic dysfunction in rats with varicocele
1708 by regulating mitochondrial homeostasis and inhibiting the activation of NLRP3 inflammasomes
1709 by oxidative mitochondrial DNA and cGAS/STING pathway. **Bioorganic Chemistry**, v. 150, 1
1710 set. 2024. doi: 10.1016/j.bioorg.2024.107571. Epub 2024 Jun 17. PMID: 38936048.
- 1711 JO, E. K.; KIM, J. K.; SHIN, D. M.; SASAKAWA, C. Molecular mechanisms regulating NLRP3
1712 inflammasome activation. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 13, n. 2, p. 148–159, 2016.
1713 doi: 10.1038/cmi.2015.95. Epub 2015 Nov 9. PMID: 26549800; PMCID: PMC4786634.
- 1714 KALA, N.; RAVISANKAR, B.; GOVINDARAJULU, P.; ARULDHAS, M. M. Impact of foetal-onset
1715 hypothyroidism on the epididymis of mature rats. **Int J Androl**, v. 25, n. 3, p. 139–148, 2002.
1716 doi: 10.1046/j.1365-2605.2002.00338. x. PMID: 12031041.
- 1717 KANNAN, A.; PANNEERSELVAM, A.; MARIAJOSEPH-ANTONY, L. F.; LOGANATHAN, C.;
1718 PRAHALATHAN, C. Role of Aquaporins in Spermatogenesis and Testicular Steroidogenesis.
1719 **Journal of Membrane Biology**, v. 253, n. 2, p. 109–114, 1 abr. 2020. doi: 10.1007/s00232-
1720 020-00114-5. Epub 2020 Mar 26. PMID: 32219486.
- 1721 KATO, T.; MIZUNO, K.; NISHIO, H.; MORITOKI, Y.; KAMISAWA, H.; KUROKAWA, S.;
1722 NAKANE, A.; MARUYAMA, T.; ANDO, R.; HAYASHI, Y.; YASUI, T. Disorganization of claudin-
1723 11 and dysfunction of the blood-testis barrier during puberty in a cryptorchid rat model.
1724 **Andrology**, v. 8, n. 5, p. 1398–1408, 1 set. 2020. doi: 10.1111/andr.12788. Epub 2020 Apr 13.
1725 PMID: 32196966.

- 1726 KAUFFMAN, A. S.; GOTTSCH, M. L.; ROA, J.; BYQUIST, A. C.; CROWN, A.; CLIFTON, D. K.;
1727 HOFFMAN, G. E.; STEINER, R. A.; TENA-SEMPERE, M. Sexual Differentiation of Kiss1 Gene
1728 Expression in the Brain of the Rat. **Endocrinology**, v. 148, n. 4, p. 1774–1783, 1 abr. 2007. doi:
1729 10.1210/en.2006-1540. Epub 2007 Jan 4. PMID: 17204549.
- 1730 KAUR, G.; THOMPSON, L. A.; DUFOUR, J. M. Sertoli cells- Immunological sentinels of
1731 spermatogenesis. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 0, p. 36, 2014a. doi:
1732 10.1016/j.semcdb.2014.02.011. Epub 2014 Mar 3. PMID: 24603046; PMCID: PMC4043859.
- 1733 KAUR, G.; VADALA, S.; DUFOUR, J. M. An overview of a Sertoli cell transplantation model to
1734 study testis morphogenesis and the role of the Sertoli cells in immune privilege. **Environmental**
1735 **Epigenetics**, v. 3, n. 3, p. dvx012, 1 jul. 2017. doi: 10.1093/eep/dvx012. PMID: 29492314;
1736 PMCID: PMC5804552.
- 1737 KAUR, G.; WRIGHT, K.; VERMA, S.; HAYNES, A.; DUFOUR, J. M. The Good, the Bad and the
1738 Ugly of Testicular Immune Regulation: A Delicate Balance Between Immune Function and
1739 Immune Privilege. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1288, p. 21–47,
1740 2021. doi: 10.1007/978-3-030-77779-1_2. PMID: 34453730.
- 1741 KIM, B.; BRETON, S. The MAPK/ERK-Signaling Pathway Regulates the Expression and
1742 Distribution of Tight Junction Proteins in the Mouse Proximal Epididymis. **Biology of**
1743 **Reproduction**, v. 94, n. 1, p. 22, 1 jan. 2015. doi: 10.1095/biolreprod.115.134965. Epub 2015
1744 Dec 9. PMID: 26658708; PMCID: PMC4809559.
- 1745 KIM, S. W.; JEONG, Y. Da; LEE, G. Y.; LEE, J.; LEE, J. Y.; KIM, C. L.; KO, Y. G.; LEE, S. S.;
1746 KIM, B. Differential expression and localization of tight junction proteins in the goat epididymis.
1747 **Journal of Animal Science and Technology**, v. 64, n. 3, p. 500, 1 maio 2022a. doi:
1748 10.5187/jast. 2022.e13. Epub 2022 May 31. PMID: 35709128; PMCID: PMC9184707.
- 1749 KLEIN, B.; BHUSHAN, S.; GÜNTHER, S.; MIDDENDORFF, R.; LOVELAND, K. L.; HEDGER,
1750 M. P.; MEINHARDT, A. Differential tissue-specific damage caused by bacterial epididymo-
1751 orchitis in the mouse. **Molecular Human Reproduction**, v. 26, n. 4, p. 215, 15 abr. 2020. doi:
1752 10.1093/molehr/gaaa011. PMCID: PMC7187874 PMID: 32011693
- 1753 KORAH, N.; SMITH, C. E.; D'AZZO, A.; MUI, J.; HERMO, L. Characterization of Cell- and
1754 Region-Specific Abnormalities in the Epididymis of Cathepsin A Deficient Mice. **Molecular**
1755 **Reproduction and Development**, v. 66, n. 4, p. 358–373, 2003. doi: 10.1002/mrd.10359.
1756 PMID: 14579412.
- 1757 KOVATS, S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. **Cellular**
1758 **immunology**, v. 294, n. 2, p. 63, 2015. doi: 10.1016/j.cellimm.2015.01.018. Epub 2015 Feb 7.
1759 PMID: 25682174; PMCID: PMC4380804.
- 1760 KUMAR, B. J.; KHURANA, M. L.; AMMINI, A. C.; KARMARKAR, M. G.; AHUJA, M. M. S.
1761 Reproductive Endocrine Functions in Men with Primary Hypothyroidism: Effect of Thyroxine
1762 Replacement. **Hormone Research**, v. 34, n. 5–6, p. 215–218, 31 dez. 1990. doi:
1763 10.1159/000181828. PMID: 2100278.
- 1764 LAINEZ, N. M.; COSS, D. Obesity, Neuroinflammation, and Reproductive Function.
1765 **Endocrinology**, v. 160, n. 11, p. 2719, 1 nov. 2019. doi: 10.1210/en.2019-00487. PMID:
1766 31513269; PMCID: PMC6806266.
- 1767 LARA, N. L. M.; COSTA, G. M. J.; AVELAR, G. F.; LACERDA, S. M. S. N.; HESS, R. A.;
1768 FRANÇA, L. R. Testis physiology-overview and histology. **Encyclopedia of Reproduction**, v.
1769 1, p. 105–116, 2018. DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.64567-1
- 1770 LAURENT, M. R.; VANDERSCHUEREN, D. Functional effects of sex hormone-binding globulin
1771 variants. **Nature Reviews Endocrinology** 2014 10:9, v. 10, n. 9, p. 516–517, 22 jul. 2014. doi:
1772 10.1038/nrendo.2014.120. Epub 2014 Jul 22. PMID: 25048036.

- 1773 LEE, J. H.; MIELE, M. E.; HICKS, D. J.; PHILLIPS, K. K.; TRENT, J. M.; WEISSMAN, B. E.;
1774 WELCH, D. R. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene.
1775 **Journal of the National Cancer Institute**, v. 88, n. 23, p. 1731–1737, 1996. doi:
1776 10.1093/jnci/88.23.1731. Erratum in: J Natl Cancer Inst 1997 Oct 15;89(20):1549. PMID:
1777 8944003.
- 1778 LEE, V.; HINTON, B. T.; HIRASHIMA, T. Collective cell dynamics and luminal fluid flow in the
1779 epididymis: A mechanobiological perspective. **Andrology**, v. 12, n. 5, p. 939, 1 jul. 2023. doi:
1780 10.1111/andr.13490. Epub 2023 Jul 17. PMID: 37415418; PMCID: PMC11278975.
- 1781 LEHMAN, M. N.; COOLEN, L. M.; GOODMAN, R. L. Minireview: Kisspeptin/Neurokinin
1782 B/Dynorphin (KNDy) Cells of the Arcuate Nucleus: A Central Node in the Control of
1783 Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion. **Endocrinology**, v. 151, n. 8, p. 3479, ago.
1784 2010. doi: 10.1210/en.2010-0022. Epub 2010 May 25. PMID: 20501670; PMCID:
1785 PMC2940527.
- 1786 LEONE, M. G.; HAQ, H. A.; SASO, L. Lipocalin type prostaglandin D-synthase: Which role in
1787 male fertility? **Contraception**, v. 65, n. 4, p. 293–295, 1 abr. 2002. doi: 10.1016/s0010-
1788 7824(02)00280-9. PMID: 12020781.
- 1789 LI, H.; WANG, X. R.; HU, Y. F.; XIONG, Y. W.; ZHU, H. L.; HUANG, Y. C.; WANG, H. Advances
1790 in immunology of male reproductive toxicity induced by common environmental pollutants.
1791 **Environment International**, v. 190, p. 108898, 1 ago. 2024. doi: 10.1016/j.envint.2024.108898.
1792 Epub 2024 Jul 19. PMID: 39047547.
- 1793 LI, M. W. M.; XIA, W.; MRUK, D. D.; WANG, C. Q. F.; YAN, H. H. N.; SIU, M. K. Y.; LUI, W. Y.;
1794 LEE, W. M.; CHENG, C. Y. Tumor necrosis factor α reversibly disrupts the blood–testis barrier
1795 and impairs Sertoli–germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes.
1796 **Journal of Endocrinology**, v. 190, n. 2, p. 313–329, 1 ago. 2006. doi: 10.1677/joe.1.06781.
1797 PMID: 16899565.
- 1798 LI, N.; WANG, T.; HAN, D. Structural, cellular and molecular aspects of immune privilege in the
1799 testis. **Front Immunol**. 2012 Jun 11; 3:152. doi: 10.3389/fimmu.2012.00152. PMID: 22701457;
1800 PMCID: PMC3371599.
- 1801 LI, W.; CAO, T.; LUO, C.; CAI, J.; ZHOU, X.; XIAO, X.; LIU, S. Crosstalk between ER stress,
1802 NLRP3 inflammasome, and inflammation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 104,
1803 n. 14, p. 6129–6140, 24 maio 2020. doi: 10.1007/s00253-020-10614-y. Epub 2020 May 24.
1804 PMID: 32447438
- 1805 LI, X.; LI, L.; OUYANG, D.; ZHU, Y.; YUAN, T. The abnormal expression of kisspeptin regulates
1806 pro-inflammatory cytokines, cell viability and apoptosis of macrophages in hyperandrogenism
1807 induced by testosterone. **Gynecological Endocrinology**, v. 37, n. 1, p. 72–77, 2021. doi:
1808 10.1080/09513590.2020.1811964. Epub 2020 Sep 29. PMID: 32988245.
- 1809 LIU, B. Y.; ZHANG, B. L.; GAO, D. Y.; LI, Q.; XU, X. Y.; SHUM, W. Epididymal
1810 epithelial degeneration and lipid metabolism impairment account for male infertility in
1811 occludin knockout mice. **Front Endocrinol (Lausanne)**. 2022 Nov 28; 13:1069319.
1812 doi: 10.3389/fendo.2022.1069319. PMID: 36518247; PMCID: PMC9742356.
- 1813 LOOSEN, S. H.; LUEDDE, M.; LURJE, G.; SPEHLMANN, M.; PAFFENHOLZ, P.; ULMER, T.
1814 F.; TACKE, F.; VUCUR, M.; TRAUTWEIN, C.; NEUMANN, U. P.; LUEDDE, T.; RODERBURG,
1815 C. Serum Levels of Kisspeptin Are Elevated in Patients with Pancreatic Cancer. **Disease**
1816 **Markers**, v. 2019, p. 5603474, 2019. doi: 10.1155/2019/5603474. PMID: 31772690; PMCID:
1817 PMC6854939.
- 1818 MANDON, M.; HERMO, L.; CYR, D. G. Isolated Rat Epididymal Basal Cells Share Common
1819 Properties with Adult Stem Cells. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 5, p. 115–116, 1 nov.
1820 2015. doi: 10.1095/biolreprod.115.133967. Epub 2015 Sep 23. PMID: 26400399; PMCID:
1821 PMC4712003.

- 1822 MARKOV, A. G.; ASCHENBACH, J. R.; AMASHEH, S. Claudin clusters as determinants of
1823 epithelial barrier function. **IUBMB Life**, v. 67, n. 1, p. 29–35, 1 jan. 2015. doi: 10.1002/iub.1347.
1824 Epub 2015 Mar 18. PMID: 25788154.
- 1825 MATTEUCCI, K. C.; PEREIRA, G. J. S.; WEINLICH, R.; BORTOLUCI, K. R. Frontline Science:
1826 Autophagy is a cell autonomous effector mechanism mediated by NLRP3 to control
1827 Trypanosoma cruzi infection. **Leukoc Biol.** 2019 Sep;106(3):531-540. doi:
1828 10.1002/JLB.HI1118-461R. Epub 2019 May 9. PMID: 31071239.
- 1829 MAZZILLI, R.; MEDENICA, S.; DI TOMMASO, A. M.; FABOZZI, G.; ZAMPONI, V.;
1830 CIMADOMO, D.; RIENZI, L.; UBALDI, F. M.; WATANABE, M.; FAGGIANO, A.; LA VIGNERA,
1831 S.; DEFEUDIS, G. The role of thyroid function in female and male infertility: a narrative review.
1832 **Journal of endocrinological investigation**, v. 46, n. 1, p. 15–26, 1 jan. 2023. doi:
1833 10.1007/s40618-022-01883-7. Epub 2022 Aug 9. PMID: 35945393; PMCID: PMC9829629. doi:
1834 10.4103/1008-682X.163189.
- 1835 MCCABE, M.; FOO, C.; DINGER, M.; SMOOKER, P.; STANTON, P. Claudin-11 and occludin
1836 are major contributors to Sertoli cell tight junction function, in vitro. **Asian Journal of**
1837 **Andrology**, v. 18, n. 4, p. 620–626, 1 jul. 2016. PMCID: PMC4955190 PMID: 26585695
- 1838 MEEKER, J. D.; GODFREY-BAILEY, L.; HAUSER, R. Relationships between serum hormone
1839 levels and semen quality among men from an infertility clinic. *Journal of Andrology*, v. 28, n. 3,
1840 p. 397–406, maio 2007. doi: 10.2164/jandrol.106.001545. Epub 2006 Nov 29. PMID: 17135633.
- 1841 MELE, E.; D'AURIA, R.; SCAFURO, M.; MARINO, M.; FASANO, S.; VIGGIANO, A.;
1842 PIERANTONI, R.; SANTORO, A.; MECCARIELLO, R. Differential Expression of Kisspeptin
1843 System and Kisspeptin Receptor Trafficking during Spermatozoa Transit in the Epididymis.
1844 **Genes (Basel)**. 2022 Feb 2;13(2):295. doi: 10.3390/genes13020295. PMID: 35205340; PMCID:
1845 PMC8871750.
- 1846 MENG, J.; GREENLEE, A. R.; TAUB, C. J.; BRAUN, R. E. Sertoli cell-specific deletion of the
1847 androgen receptor compromises testicular immune privilege in mice. **Biology of Reproduction**,
1848 v. 85, n. 2, p. 254–260, 2011. doi: 10.1095/biolreprod.110.090621. Epub 2011 May 4. PMID:
1849 21543771; PMCID: PMC3142254.
- 1850 MICHELI, L.; COLLODEL, G.; CERRETANI, D.; MENCHIARI, A.; NOTO, D.; SIGNORINI, C.;
1851 MORETTI, E. Relationships between Ghrelin and Obestatin with MDA, Proinflammatory
1852 Cytokines, GSH/GSSG Ratio, Catalase Activity, and Semen Parameters in Infertile Patients with
1853 Leukocytospermia and Varicocele. **Oxid Med Cell Longev.** 2019 Oct 21; 2019:7261842. doi:
1854 10.1155/2019/7261842. PMCID: PMC6855048 PMID: 31781347
- 1855 MINUTOLI, L.; PUZZOLO, D.; RINALDI, M.; IRRERA, N.; MARINI, H.; ARCORACI, V.; BITTO,
1856 A.; CREA, G.; PISANI, A.; SQUADRITO, F.; TRICHILO, V.; BRUSCHETTA, D.; MICALI, A.;
1857 ALTAVILLA, D. ROS-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation in Brain, Heart, Kidney, and
1858 Testis Ischemia/Reperfusion Injury. **Oxid Med Cell Longev.** 2016; 2016:2183026. doi:
1859 10.1155/2016/2183026. Epub 2016 Apr 5. PMID: 27127546; PMCID: PMC4835650.
- 1860 MITA, P.; HINTON, B. T.; DUFOUR, J. M. The Blood-Testis and Blood-Epididymis Barriers Are
1861 More than Just Their Tight Junctions. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 5, p. 851, maio 2011.
1862 doi: 10.1095/biolreprod.110.087452. Epub 2011 Jan 5. PMID: 21209417; PMCID:
1863 PMC4574632.
- 1864 MIYASO, H.; OGAWA, Y.; ITOH, M. Microenvironment for spermatogenesis and sperm
1865 maturation. **Histochem Cell Biol.** 2022 Mar;157(3):273-285. doi: 10.1007/s00418-021-02071-
1866 z. Epub 2022 Mar 5. PMID: 35247091.
- 1867 MORGAN, D. H.; GHRIBI, O.; HUI, L.; GEIGER, J. D.; CHEN, X. Cholesterol-enriched diet
1868 disrupts the blood-testis barrier in rabbits. *American Journal of Physiology - Endocrinology*
1869 **and Metabolism**, v. 307, n. 12, p. E1125, 15 dez. 2014. doi:10.1152/ajpendo.00416.2014.
1870 Epub 2014 Oct 21. PMID: 25336525; PMCID: PMC4269676.

1871

- 1872 MORROW, C. M. K.; MRUK, D.; CHENG, C. Y.; HESS, R. A. Claudin and occludin expression
1873 and function in the seminiferous epithelium. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 2010 May
1874 27;365(1546):1679-96. doi: 10.1098/rstb.2010.0025. PMID: 20403878; PMCID: PMC2871928.
- 1875 MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation.
1876 **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 5, p. 564, 2015. doi: 10.1210/er.2015-1127.2016.1.test. Erratum
1877 in: *Endocr Rev.* 2015 Dec;36(6):681. doi: 10.1210/er.2015-1127. PMID: 26357922; PMCID:
1878 PMC4591527.
- 1879 MULDER, J.; HADDAD, M. N.; VERNON, K.; BAUM, M.; QUIGLEY, R. Hypothyroidism
1880 Increases Osmotic Water Permeability (Pf) in the Developing Renal Brush Border Membrane.
1881 **Pediatr Res.** 2003 Jun;53(6):1001-7. doi: 10.1203/01.PDR.0000061567.32928.8B. Epub 2003
1882 Mar 5. PMID: 12621104.
- 1883 MURASHIMA, A.; KISHIGAMI, S.; THOMSON, A.; YAMADA, G. Androgens and mammalian
1884 male reproductive tract development. **Biochim Biophys Acta.** 2015 Feb;1849(2):163-70. doi:
1885 10.1016/j.bbagr.2014.05.020. Epub 2014 May 27. PMID: 24875095.
- 1886 NAITO, M.; ITOH, M. Patterns of infiltration of lymphocytes into the testis under normal and
1887 pathological conditions in mice. **Am J Reprod Immunol.** 2008 Jan;59(1):55-61. doi:
1888 10.1111/j.1600-0897.2007.00556.x. PMID: 18154596.
- 1889 NAKANISHI, Y.; SHIRATSUCHI, A. Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by
1890 sertoli cells: Mechanisms and consequences. **Biol Pharm Bull.** 2004 Jan;27(1):13-6. doi:
1891 10.1248/bpb.27.13. PMID: 14709891.
- 1892 NAVARRO, V. M.; CASTELLANO, J. M.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R.; TOVAR, S.; ROA, J.;
1893 MAYEN, A.; NOGUEIRAS, R.; VAZQUEZ, M. J.; BARREIRO, M. L.; MAGNI, P.; AGUILAR, E.;
1894 DIEGUEZ, C.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. Characterization of the Potent Luteinizing
1895 Hormone-Releasing Activity of KiSS-1 Peptide, the Natural Ligand of GPR54. **Endocrinology.**
1896 2005 Jan;146(1):156-63. doi: 10.1210/en.2004-0836. Epub 2004 Sep 16. PMID: 15375028.
- 1897 NIE, J.; CHEN, H.; ZHAO, X.; ADVANCEMENT, P.; NIE, J.; CHEN, H.; ZHAO, X. Advancement
1898 and Potential Applications of Epididymal Organoids. **Biomolecules.** 2024 Aug 17;14(8):1026.
1899 doi: 10.3390/biom14081026. PMID: 39199413; PMCID: PMC11352229.
- 1900 OBERSKA, P.; GRABOWSKA, M.; MARYNOWSKA, M.; MURAWSKI, M.; GAŃCZARZEWICZ,
1901 D.; SYCZEWSKI, A.; MICHAŁEK, K. Cellular Distribution of Aquaporin 3, 7 and 9 in the Male
1902 Reproductive System: A Lesson from Bovine Study (*Bos taurus*). **Int J Mol Sci.** 2024 Jan
1903 26;25(3):1567. doi: 10.3390/ijms25031567. PMID: 38338845; PMCID: PMC10855163.
- 1904 O'Donnell L, Stanton P, de Kretser DM. Endocrinology of the Male Reproductive System and
1905 Spermatogenesis. 2017 Jan 11. PMID: 25905260.
- 1906 OH, Y. S.; JO, N. H.; PARK, J. K.; GYE, M. C. Changes in Inflammatory Cytokines Accompany
1907 Deregulation of Claudin-11, Resulting in Inter-Sertoli Tight Junctions in Varicocele Rat Testes. **J**
1908 **Urol.** 2016 Oct;196(4):1303-12. doi: 10.1016/j.juro.2016.05.004. Epub 2016 May 7. PMID:
1909 27164517.
- 1910 O'HARA, L.; SMITH, L. B. Androgen receptor roles in spermatogenesis and infertility. **Best**
1911 **Pract Res Clin Endocrinol Metab.** 2015 Aug;29(4):595-605. doi: 10.1016/j.beem.2015.04.006.
1912 Epub 2015 Apr 25. PMID: 26303086.
- 1913 ORNING, P.; LIEN, E.; FITZGERALD, K. A. Gasdermins and their role in immunity and
1914 inflammation. **J Exp Med.** 2019 Nov 4;216(11):2453-2465. doi: 10.1084/jem.20190545. Epub
1915 2019 Sep 23. PMID: 31548300; PMCID: PMC6829603.
- 1916 OZU, M.; ALVEAR-ARIAS, J. J.; FERNANDEZ, M.; CAVIGLIA, A.; PEÑA-PICHICOI, A.;
1917 CARRILLO, C.; CARMONA, E.; OTERO-GONZALEZ, A.; GARATE, J. A.; AMODEO, G.;

- 1918 GONZALEZ, C. Aquaporin Gating: A New Twist to Unravel Permeation through Water
1919 Channels. **Int J Mol Sci**. 2022 Oct 14;23(20):12317. doi: 10.3390/ijms232012317. PMID:
1920 36293170; PMCID: PMC9604103.
- 1921 PAIVA, R. V. N.; MONDES, P. H. de L.; BRANDÃO, B. de J.; SANT'ANNA, J. N.; FREIRE DOS
1922 SANTOS, M. E.; FIGHERA, Y. M.; SANTOS, L. C.; MARKUS, R. P.; FERNANDES, P. A. C. M.;
1923 SILVA, J. F.; TAMURA, E. K. Effects of acute hypothyroidism on plasma melatonin and Aanat
1924 and Asmt expression in the pineal gland and gonads of rats. **Front Endocrinol (Lausanne)**.
1925 2024 Aug 1; 15:1322867. doi: 10.3389/fendo.2024.1322867. PMID: 39149125; PMCID:
1926 PMC11324505.
- 1927 PAN, J.; ZHU, Z.; XU, G.; NIU, L.; YU, L.; LUO, Z.; YAN, J. Expression of claudin 11 in a rat
1928 model of varicocele and its effects on the blood testis barrier. *Mol Med Rep*. 2018
1929 Dec;18(6):5647-5651. doi: 10.3892/mmr.2018.9603. Epub 2018 Oct 26. PMID: 30365105;
1930 PMCID: PMC6236223.
- 1931 PARK, J.-S.; CHEON, Y.-P.; CHOI, D.; LEE, S.-H. Expression of Kisspeptin in the Adult
1932 Hamster Testis. **Dev Reprod**. 2022 Sep;26(3):107-115. doi: 10.12717/DR.2022.26.3.107. Epub
1933 2022 Sep 30. PMID: 36285151; PMCID: PMC9578319.
- 1934 PARK, Y. J.; BATTISTONE, M. A.; KIM, B.; BRETON, S. Relative contribution of clear cells and
1935 principal cells to luminal pH in the mouse epididymis. **Biol Reprod**. 2017 Feb 1;96(2):366-375.
1936 doi: 10.1095/biolreprod.116.144857. Erratum in: *Biol Reprod*. 2017 Apr 1;96(4):937. doi:
1937 10.1093/biolre/iox011. PMID: 28203710; PMCID: PMC6213081.
- 1938 PASTOR-SOLER, N. M.; FISHER, J. S.; SHARPE, R.; HILL, E.; VAN HOEK, A.; BROWN, D.;
1939 BRETON, S. Aquaporin 9 expression in the developing rat epididymis is modulated by steroid
1940 hormones. **Reproduction**. 2010 Mar;139(3):613-21. doi: 10.1530/REP-09-0284. Epub 2009
1941 Nov 30. PMID: 19948840; PMCID: PMC3773695.
- 1942 PATEL, N.; KASHANIAN, J. A. Thyroid Dysfunction and Male Reproductive Physiology. **Semin**
1943 **Reprod Med**. 2016 Nov;34(6):356-360. doi: 10.1055/s-0036-1593491. Epub 2016 Oct 14.
1944 PMID: 27741548.
- 1945 PATIL, A. A.; CAI, Y.; SANG, Y.; BLECHA, F.; ZHANG, G. Cross-species analysis of the
1946 mammalian β -defensin gene family: Presence of syntenic gene clusters and preferential
1947 expression in the male reproductive tract. **Physiol Genomics**. 2005 Sep 21;23(1):5-17. doi:
1948 10.1152/physiolgenomics.00104.2005. Epub 2005 Jul 20. PMID: 16033865.
- 1949 PAUL, N.; TALLURI, T. R.; NAG, P.; KUMARESAN, A. Epididymosomes: A potential male
1950 fertility influencer. **Andrologia**. 2021 Oct;53(9):e14155. doi: 10.1111/and.14155. Epub 2021 Jul
1951 2. PMID: 34213814.
- 1952 PENTIKÄINEN, V.; ERKKILÄ, K.; SUOMALAINEN, L.; OTALA, M.; PENTIKÄINEN, M. O.;
1953 PARVINEN, M.; DUNKEL, L. TNFalpha down-regulates the Fas ligand and inhibits germ cell
1954 apoptosis in the human testis. **J Clin Endocrinol Metab**. 2001 Sep;86(9):4480-8. doi:
1955 10.1210/jcem.86.9.7861. PMID: 11549697.
- 1956 PÉREZ, C. V.; SOBARZO, C. M.; JACOBO, P. V.; PELLIZZARI, E. H.; CIGORRAGA, S. B.;
1957 DENDUCHIS, B.; LUSTIG, L. Loss of occludin expression and impairment of blood-testis barrier
1958 permeability in rats with autoimmune orchitis: effect of interleukin 6 on Sertoli cell tight junctions.
1959 **Biology of reproduction**, v. 87, n. 5, 2012a. doi.org/10.1095/biolreprod.112.101709.
- 1960 PIHLAJAMAA, P.; SAHU, B.; LYLÄ, L.; AITTOÄKI, V.; HAUTANIEMI, S.; JÄNNE, O. A.
1961 Tissue-specific pioneer factors associate with androgen receptor cisosomes and transcription
1962 programs. **EMBO J**. 2014 Feb 18;33(4):312-26. doi: 10.1002/embj.201385895. Epub 2014 Jan
1963 22. PMID: 24451200; PMCID: PMC3989639.

- 1964 PINILLA, L.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.; MILLAR, R. P.; TENA-SEMPERE, M. Kisspeptins and
 1965 reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. **Physiol Rev.** 2012
 1966 Jul;92(3):1235-316. doi: 10.1152/physrev.00037.2010. PMID: 22811428.
- 1967 PINTO, F. M.; CEJUDO-ROMÁN, A.; RAVINA, C. G.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, M.; MARTÍN-
 1968 LOZANO, D.; ILLANES, M.; TENA-SEMPERE, M.; CANDENAS, M. L. Characterization of the
 1969 kisspeptin system in human spermatozoa. **Int J Androl.** 2012 Feb;35(1):63-73. doi:
 1970 10.1111/j.1365-2605.2011.01177. x. Epub 2011 Jun 9. PMID: 21651574.
- 1971 PLEUGER, C.; AI, D.; HOPPE, M. L.; WINTER, L. T.; BOHNERT, D.; KARL, D.; GUENTHER,
 1972 S.; EPELMAN, S.; KANTORES, C.; FIJAK, M.; RAVENS, S.; MIDDENDORFF, R.; MAYER, J.
 1973 U.; LOVELAND, K. L.; HEDGER, M.; BHUSHAN, S.; MEINHARDT, A. The regional distribution
 1974 of resident immune cells shapes distinct immunological environments along the murine
 1975 epididymis. **Elife.** 2022 Dec 14;11:e82193. doi: 10.7554/eLife.82193. PMID: 36515584; PMCID:
 1976 PMC9750176.
- 1977 POLAT, E. C.; BOZKURT, A. S.; KESKIN CIMEN, F.; GULABOGLU, M.; ALTUNER, D. The
 1978 investigation of the protective effects of nimesulide on experimental testicular ischemia-
 1979 reperfusion injury in rats. **Rev Int Androl.** 2020 Apr-Jun;18(2):55-62. doi:
 1980 10.1016/j.androl.2018.08.001. Epub 2018 Nov 23. PMID: 30477960.
- 1981 PONTE, R.; DUPUY, F. P.; BRIMO, F.; MEHRAJ, V.; BRASSARD, P.; BELANGER, M.;
 1982 YURCHENKO, E.; JENABIAN, M. A.; BERNARD, N. F.; ROUTY, J. P. Characterization of
 1983 myeloid cell populations in human testes collected after sex reassignment surgery. **J Reprod**
 1984 **Immunol.** 2018 Feb; 125:16-24. doi: 10.1016/j.jri.2017.10.043. Epub 2017 Oct 14. PMID:
 1985 29136520.
- 1986 PRÓCHNICKI, T.; LATZ, E. Inflammasomes on the Crossroads of Innate Immune Recognition
 1987 and Metabolic Control. **Cell Metab.** 2017 Jul 5;26(1):71-93. doi: 10.1016/j.cmet.2017.06.018.
 1988 PMID: 28683296.
- 1989 QU, N.; OGAWA, Y.; KURAMASU, M.; NAGAHORI, K.; SAKABE, K.; ITOH, M. Immunological
 1990 microenvironment in the testis. **Reprod Med Biol.** 2019 Aug 29;19(1):24-31. doi:
 1991 10.1002/rmb2.12293. PMID: 31956282; PMCID: PMC6955586.
- 1992 QUARMBY, V. E.; YARBROUGH, W. G.; LUBAHN, D. B.; FRENCH, F. S.; WILSON, E. M.
 1993 Autologous Down-Regulation of Androgen Receptor Messenger Ribonucleic Acid. **Mol**
 1994 **Endocrinol.** 1990 Jan;4(1):22-8. doi: 10.1210/mend-4-1-22. PMID: 2325667.
- 1995 RAMEZANIKHAH, H.; FARROKHI, A.; NEJATBAKHSR, R.; SHOKRI, S.; ZENDEDEL, A.;
 1996 ABDANIPOUR, A. Involvement of Asc and Nlrp3 inflammasomes in the testes following spinal
 1997 cord injury. **Endocr Regul.** 2020 Apr 1;54(2):96-108. doi: 10.2478/enr-2020-0012. PMID:
 1998 32597153.
- 1999 RATO, L.; ALVES, M. G.; SOCORRO, S.; DUARTE, A. I.; CAVACO, J. E.; OLIVEIRA, P. F.
 2000 Metabolic regulation is important for spermatogenesis. **Nat Rev Urol.** 2012 May 1;9(6):330-8.
 2001 doi: 10.1038/nrurol.2012.77. PMID: 22549313.
- 2002 RIBEIRO, C. M.; ROMANO, R. M.; AVELLAR, M. C. W.; RIBEIRO, C. M.; ROMANO, R. M.;
 2003 AVELLAR, M. C. W. Beta-defensins in the epididymis: clues to multifunctional roles. **Animal**
 2004 **Reproduction (AR)**, v. 9, n. 4, p. 751–759, 26 jul. 2018.
- 2005 RIBEIRO, C. M.; SILVA, E. J. R.; HINTON, B. T.; AVELLAR, M. C. W. β -defensins and the
 2006 epididymis: contrasting influences of prenatal, postnatal, and adult scenarios. **Asian Journal of**
 2007 **Andrology**, v. 18, n. 2, p. 323–328, 1 mar. 2016. doi: 10.4103/1008-682X.168791.
- 2008 RINALDI, V. D.; DONNARD, E.; GELLATLY, K. J.; RASMUSSEN, M.; KUCUKURAL, A.;
 2009 YUKSELEN, O.; GARBER, M.; SHARMA, U.; RANDO, O. J. An atlas of cell types in the mouse
 2010 epididymis and vas deferens. **Elife.** 2020 Jul 30;9:e55474. doi: 10.7554/eLife.55474. PMID:
 2011 32729827; PMCID: PMC7426093.

- 2012 ROBAIRE, B.; SEENUNDUN, S.; HAMZEH, M.; LAMOUR, S. A. Androgenic regulation of novel
2013 genes in the epididymis. **Asian J Androl.** 2007 Jul;9(4):545-53. doi: 10.1111/j.1745-
2014 7262.2007.00316. x. PMID: 17589794.
- 2015 ROMANO, R. M.; GOMES, S. N.; CARDOSO, N. C. S.; SCHIESSL, L.; ROMANO, M. A.;
2016 OLIVEIRA, C. A. New insights for male infertility revealed by alterations in spermatic function
2017 and differential testicular expression of thyroid-related genes. **Endocrine.** 2017 Feb;55(2):607-
2018 617. doi: 10.1007/s12020-016-0952-3. Epub 2016 Apr 11. PMID: 27066791.
- 2019 ROMETO, A. M.; KRAJEWSKI, S. J.; VOYTKO, M. Lou; RANCE, N. E. Hypertrophy and
2020 increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of
2021 postmenopausal women and ovariectomized monkeys. **J Clin Endocrinol Metab.** 2007
2022 Jul;92(7):2744-50. doi: 10.1210/jc.2007-0553. Epub 2007 May 8. PMID: 17488799.
- 2023 SANTACROCE, L.; IMBIMBO, C.; BALLINI, A.; CROCCETTO, F.; SCACCO, S.; CANTORE, S.;
2024 DI ZAZZO, E.; COLELLA, M.; JIRILLO, E. Testicular Immunity and Its Connection with the
2025 Microbiota. Physiological and Clinical Implications in the Light of Personalized Medicine. **J Pers**
2026 **Med.** 2022 Aug 20;12(8):1335. doi: 10.3390/jpm12081335. PMID: 36013286; PMCID:
2027 PMC9409709.
- 2028 SANTOS, B. R.; DOS ANJOS CORDEIRO, J. M.; SANTOS, L. C.; DE OLIVEIRA, L. S.;
2029 MENDONÇA, L. D.; SANTOS, E. O.; DE MACEDO, I. O.; SZAWKA, R. E.; SERAKIDES, R.;
2030 SILVA, J. F. Maternal hypothyroidism reduces the expression of the kisspeptin/Kiss1r system in
2031 the maternal-fetal interface of rats. **Reprod Biol.** 2022 Jun;22(2):100615. doi:
2032 10.1016/j.repbio.2022.100615. Epub 2022 Feb 15. PMID: 35180577.
- 2033 SANTOS, B. R.; MARTINHA, J.; SANTOS, L. C.; SANTANA, S. Kisspeptin Suppresses
2034 Inflammasome-NLRP3 Activation and Pyroptosis Caused by Hypothyroidism at the Maternal-
2035 Fetal Interface of Rats. **Int J Mol Sci.** 2023 Apr 6;24(7):6820. doi: 10.3390/ijms24076820.
2036 PMID: 37047793; PMCID: PMC10095583.
- 2037 SANTOS, L. C.; DOS ANJOS CORDEIRO, J. M.; CUNHA, M. C. da S. G.; SANTOS, B. R.;
2038 OLIVEIRA, L. S. de; DA SILVA, A. L.; BARBOSA, E. M.; NIELLA, R. V.; DE FREITAS, G. J. C.;
2039 SANTOS, D. de A.; SERAKIDES, R.; OCARINO, N. de M.; BORGES, S. C.; DE LAVOR, M. S.
2040 L.; SILVA, J. F. Kisspeptin-10 Improves Testicular Redox Status but Does Not Alter the
2041 Unfolded Protein Response (UPR) That Is Downregulated by Hypothyroidism in a Rat Model.
2042 **Int. J. Mol. Sci.** 2024, 25(3), 1514; doi.org/10.3390/ijms25031514.
- 2043 SANTOS, L. C.; DOS ANJOS CORDEIRO, J. M.; DA SILVA SANTANA, L.; BARBOSA, E. M.;
2044 SANTOS, B. R.; MENDONÇA, L. D.; CUNHA, M. C. da S. G.; MACHADO, W. M.; SANTANA, L.
2045 R.; KERSUL, M. G.; HENRIQUES, P. C.; LOPES, R. A.; SNOECK, P. P. das N.; SZAWKA, R.
2046 E.; SILVA, J. F. Kisspeptin treatment reverses high prolactin levels and improves gonadal
2047 function in hypothyroid male rats. **Sci Rep.** 2023 Oct 5;13(1):16819. doi: 10.1038/s41598-023-
2048 44056-z. PMID: 37798396; PMCID: PMC10556046.
- 2049 SANTOS, L. C.; DOS ANJOS CORDEIRO, J. M.; SANTANA, L. da S.; SANTOS, B. R.;
2050 BARBOSA, E. M.; DA SILVA, T. Q. M.; CORRÊA, J. M. X.; NIELLA, R. V.; LAVOR, M. S. L.; DA
2051 SILVA, E. B.; DE MELO OCARINO, N.; SERAKIDES, R.; SILVA, J. F. Kisspeptin/Kiss1r system
2052 and angiogenic and immunological mediators at the maternal-fetal interface of domestic cats.
2053 **Biol Reprod.** 2021 Jul 2;105(1):217-231. doi: 10.1093/biolre/ioab061. PMID: 33774655.
- 2054 SCHIMMING, B. C.; BAUMAM, C. A. E.; PINHEIRO, P. F. F.; DE MATTEIS, R.; DOMENICONI,
2055 R. F. Aquaporin 9 is expressed in the epididymis of immature and mature pigs. **Reprod Domest**
2056 **Anim.** 2017 Aug;52(4):617-624. doi: 10.1111/rda.12957. Epub 2017 Mar 30. PMID: 28370569.
- 2057 SELAWRY, H. P.; WHITTINGTON, K. B.; FORSTER, H. G. Intratesticular islet xenograft
2058 survival in relation to tissue cyclosporine levels. **Am J Med Sci.** 1988 Jun;295(6):497-502. doi:
2059 10.1097/0000441-198806000-00001. PMID: 3133946.

- 2060 SEMINARA, S. B.; MESSENGER, S.; CHATZIDAKI, E. E.; THRESHER, R. R.; ACIERNO, J. S.;
2061 SHAGOURY, J. K.; BO-ABBAS, Y.; KUOHUNG, W.; SCHWINOF, K. M.; HENDRICK, A. G.;
2062 ZAHN, D.; DIXON, J.; KAISER, U. B.; SLAUGENHAUPT, S. A.; GUSELLA, J. F.; O'RAHILLY,
2063 S.; CARLTON, M. B. L.; CROWLEY, W. F.; APARICIO, S. A. J. R.; COLLEDGE, W. H. The
2064 GPR54 gene as a regulator of puberty. **N Engl J Med**. 2003 Oct 23;349(17):1614-27. doi:
2065 10.1056/NEJMoa035322. PMID: 14573733.
- 2066 SENGUPTA, P.; DUTTA, S.; KARKADA, I. R.; CHINNI, S. V. Endocrinopathies and Male
2067 Infertility. **Life (Basel)**. 2021 Dec 22;12(1):10. doi: 10.3390/life12010010. PMID: 35054403;
2068 PMCID: PMC8779600.
- 2069 SETCHELL, B. P. The testis and tissue transplantation: historical aspects. **J Reprod Immunol**.
2070 1990 Aug;18(1):1-8. doi: 10.1016/0165-0378(90)90020-7. PMID: 2213727.
- 2071 SETCHELL, B. P. Blood-testis barrier, junctional and transport proteins and spermatogenesis.
2072 **Adv Exp Med Biol**. 2008; 636:212-33. doi: 10.1007/978-0-387-09597-4_12. PMID: 19856170.
- 2073 SHARMA, A.; THAVENTHIRAN, T.; MINHAS, S.; DHILLO, W. S.; JAYASENA, C. N. Kisspeptin
2074 and Testicular Function—Is It Necessary? **Int J Mol Sci**. 2020 Apr 22;21(8):2958. doi:
2075 10.3390/ijms21082958. PMID: 32331420; PMCID: PMC7216047.
- 2076 SHENG, Z.; GAO, N.; FAN, D.; WU, N.; ZHANG, Y.; HAN, D.; ZHANG, Y.; TAN, W.; WANG, P.;
2077 AN, J. Zika virus disrupts the barrier structure and Absorption/Secretion functions of the
2078 epididymis in mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 3, p. e0009211, 1 mar. 2021.
2079 doi: 10.1371/journal.pntd.0009211. PMCID: PMC7968736 PMID: 33667230.
- 2080 SHI, J.; ZHAO, Y.; WANG, K.; SHI, X.; WANG, Y.; HUANG, H.; ZHUANG, Y.; CAI, T.; WANG,
2081 F.; SHAO, F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death.
2082 **Nature**. 2015 Oct 29;526(7575):660-5. doi: 10.1038/nature15514. Epub 2015 Sep 16. PMID:
2083 26375003.
- 2084 SHUM, W. W. C.; DA SILVA, N.; MCKEE, M.; SMITH, P. J. S.; BROWN, D.; BRETON, S.
2085 Transepithelial Projections from Basal Cells Are Luminal Sensors in Pseudostratified Epithelia.
2086 **Cell**. 2008 Dec 12;135(6):1108-17. doi: 10.1016/j.cell.2008.10.020. PMID: 19070580; PMCID:
2087 PMC2646085.
- 2088 SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Thyroid hormones and female reproduction.
2089 **Biol Reprod**. 2018 Nov 1;99(5):907-921. doi: 10.1093/biolre/ioy115. PMID: 29767691.
- 2090 SIMORANGKIR, D. R.; WREFORD, N. G.; DE KRETZER, D. M. Impaired Germ Cell
2091 Development in the Testes of Immature Rats With Neonatal Hypothyroidism. **J Androl**. 1997
2092 Mar-Apr;18(2):186-93. PMID: 9154513.
- 2093 SMITH, L. B.; WALKER, W. H. The Regulation of Spermatogenesis by Androgens. **Semin Cell**
2094 **Dev Biol**. 2014 Jun; 30:2-13. doi: 10.1016/j.semcd.2014.02.012. Epub 2014 Mar 2. PMID:
2095 24598768; PMCID: PMC4043871.
- 2096 SONG, K.; YANG, X.; AN, G.; XIA, X.; ZHAO, J.; XU, X.; WAN, C.; LIU, T.; ZHENG, Y.; REN,
2097 S.; WANG, M.; CHANG, G.; CRONIN, S. J. F.; PENNINGER, J. M.; JING, T.; OU, X.; RAO, S.;
2098 LIU, Z.; ZHAO, X. Y. Targeting APLN/APJ restores blood-testis barrier and improves
2099 spermatogenesis in murine and human diabetic models. **Nature Communications**, v. 13, n. 1,
2100 1 dez. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34990-3> PMID: 36443325 PMCID:
2101 PMC9705293
- 2102 STANTON, P. G. Regulation of the blood-testis barrier. **Semin Cell Dev Biol**. 2016 Nov;
2103 59:166-173. doi: 10.1016/j.semcd.2016.06.018. Epub 2016 Jun 25. PMID: 27353840.
- 2104 ST-PIERRE, N.; DUFRESNE, J.; ROONEY, A. A.; CYR, D. G. Neonatal hypothyroidism alters
2105 the localization of gap junctional protein connexin 43 in the testis and messenger RNA levels in
2106 the epididymis of the rat. **Biol Reprod**. 2003 Apr;68(4):1232-40. doi:
2107 10.1095/biolreprod.102.010504. Epub 2002 Oct 30. PMID: 12606457.

- 2108 SU, L.; WANG, Z.; XIE, S.; HU, D.; CHENG, Y. C.; MRUK, D. D.; GUAN, Y. Testin regulates the
2109 blood-testis barrier via disturbing occludin/ZO-1 association and actin organization. **J Cell**
2110 **Physiol.** 2020 Sep;235(9):6127-6138. doi: 10.1002/jcp.29541. Epub 2020 Jan 24. PMID:
2111 31975378
- 2112 SU, X.; PENG, H.; CHEN, X.; WU, X.; WANG, B. Hyperlipidemia and hypothyroidism. **Clin**
2113 **Chim Acta.** 2022 Feb 15; 527:61-70. doi: 10.1016/j.cca.2022.01.006. Epub 2022 Jan 14. PMID:
2114 35038435.
- 2115 SU, Y.; ZHANG, Y.; HU, Z.; HE, L.; WANG, W.; XU, J.; FAN, Z.; LIU, C.; ZHANG, H.; ZHAO, K.
2116 Prokineticin 2 via Calcium-Sensing Receptor Activated NLRP3 Inflammasome Pathway in the
2117 Testicular Macrophages of Uropathogenic Escherichia coli- Induced Orchitis. **Front Immunol.**
2118 2020 Oct 23; 11:570872. doi: 10.3389/fimmu.2020.570872. PMID: 33193351; PMCID:
2119 PMC7644440.
- 2120 SUH, J. H.; GONG, E. Y.; HONG, C. Y.; PARK, E.; AHN, R. S.; PARK, K. S.; LEE, K. Reduced
2121 testicular steroidogenesis in tumor necrosis factor- α knockout mice. **The J Steroid Biochem**
2122 **Mol Biol.** 2008 Nov;112(1-3):117-21. doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.09.003. Epub 2008 Sep 11.
2123 PMID: 18832037.
- 2124 SULLIVAN, R.; MIEUSSET, R. The human epididymis: its function in sperm maturation. **Hum**
2125 **Reprod Update.** 2016 Sep;22(5):574-87. doi: 10.1093/humupd/dmw015. Epub 2016 Jun 15.
2126 PMID: 27307387.
- 2127 SULLIVAN, R.; SAEZ, F. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in
2128 mammalian male reproductive physiology. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 146, n. 1,
2129 jul. 2013. DOI:10.1530/REP-13-0058.
- 2130 SUZUKI, F.; NAGANO, T. Development of tight junctions in the caput epididymal epithelium of
2131 the mouse. **Dev Biol.** 1978 Apr;63(2):321-34. doi: 10.1016/0012-1606(78)90137-9. PMID:
2132 640222.
- 2133 TARIQ, A. R.; SHAHAB, M.; CLARKE, I. J.; PEREIRA, A.; SMITH, J. T.; KHAN, S. ul H.;
2134 SULTAN, J.; JAVED, S.; ANWAR, T. Kiss1 and Kiss1 receptor expression in the rhesus monkey
2135 testis: A possible local regulator of testicular function. **Central European Journal of Biology**, v.
2136 8, n. 10, p. 968–974, 1 nov. 2013. doi.org/10.2478/s11535-013-0219-4.
- 2137 TRAISH, A.; BOLANOS, J.; NAIR, S.; SAAD, F.; MORGENTALER, A. Do androgens modulate
2138 the pathophysiological pathways of inflammation? Appraising the contemporary evidence. **J**
2139 **Clin Med.** 2018 Dec 14;7(12):549. doi: 10.3390/jcm7120549. PMID: 30558178; PMCID:
2140 PMC6306858.
- 2141 TREVISAN, C. M.; MONTAGNA, E.; DE OLIVEIRA, R.; CHRISTOFOLINI, D. M.; BARBOSA, C.
2142 P.; CRANDALL, K. A.; BIANCO, B. Kisspeptin/GPR54 System: What Do We Know About Its
2143 Role in Human Reproduction? **Cellular Physiology and Biochemistry** (2018) 49 (4): 1259–
2144 1276. doi.org/10.1159/000493406.
- 2145 TSOU, W. I.; NGUYEN, K. Q. N.; CALARESE, D. A.; GARFORTH, S. J.; ANTES, A. L.;
2146 SMIRNOV, S. V.; ALMO, S. C.; BIRGE, R. B.; KOTENKO, S. V. Receptor tyrosine kinases,
2147 TYRO3, AXL, and MER, demonstrate distinct patterns and complex regulation of ligand-induced
2148 activation. **J Biol Chem.** 2014 Sep 12;289(37):25750-63. doi: 10.1074/jbc.M114.569020. Epub
2149 2014 Jul 29. PMID: 25074926; PMCID: PMC4162177.
- 2150 VOSS, J. J. L. P.; STERMER, A. R.; GHAFFARI, R.; TIWARY, R.; RICHBURG, J. H. MEHP-
2151 Induced Rat Testicular Inflammation Does Not Exacerbate Germ Cell Apoptosis.
2152 **Reproduction.** 2018 Jul;156(1):35-46. doi: 10.1530/REP-18-0093. Epub 2018 May 9. PMID:
2153 29743262; PMCID: PMC6021206.

- 2154 WAGNER, M. S.; WAJNER, S. M.; MAIA, A. L. The role of thyroid hormone in testicular
2155 development and function. **J Endocrinol**. 2008 Dec;199(3):351-65. doi: 10.1677/JOE-08-0218.
2156 Epub 2008 Aug 26. PMID: 18728126; PMCID: PMC2799043.
- 2157 WALENTA, L.; SCHMID, N.; ULLRICH SCHWARZER, J.; KÖHN, F. M.; URBANSKI, H. F.;
2158 BEHR, R.; STRAUSS, L.; POUTANEN, M.; MAYERHOFER, A. NLRP3 in Somatic Non-Immune
2159 Cells of Rodent and Primate Testes. **Reproduction**. 2018 Jun 15;156(3):231–238. doi:
2160 10.1530/REP-18-0111. PMCID: PMC6098733.
- 2161 WANG, J. L.; ZHANG, H. J.; WANG, H. L.; WANG, J. W.; GOU, P. H.; YE, Z. H.; WANG, Y. L.
2162 Influence of hypothyroidism on oxidative stress, c-Fos expression, cell cycle, and apoptosis in
2163 rats testes. **Toxicological & Environmental Chemistry**, 97(10), 1394–1407.
2164 doi.org/10.1080/02772248.2015.1101110.
- 2165 WANG, J. Y.; HSU, M. C.; TSENG, T. H.; WU, L. S.; YANG, K. T.; CHIU, C. H. Kisspeptin
2166 expression in mouse Leydig cells correlates with age. **J Chin Med Assoc**. 2015 Apr;78(4):249-
2167 57. doi: 10.1016/j.jcma.2015.01.004. Epub 2015 Feb 27. PMID: 25732868.
- 2168 WANG, M.; YANG, Y.; CANSEVER, D.; WANG, Y.; KANTORES, C.; MESSIAEN, S.; MOISON,
2169 D.; LIVERA, G.; CHAKAROV, S.; WEINBERGER, T.; STREMMEL, C.; FIJAK, M.; KLEIN, B.;
2170 PLEUGER, C.; LIAN, Z.; MA, W.; LIU, Q.; KLEE, K.; HÄNDLER, K.; ULAS, T.; SCHLITZER, A.;
2171 SCHULTZE, J. L.; BECHER, B.; GRETER, M.; LIU, Z.; GINHOUX, F.; EPELMAN, S.; SCHULZ,
2172 C.; MEINHARDT, A.; BHUSHAN, S. Two populations of self-maintaining monocyte-independent
2173 macrophages exist in adult epididymis and testis. **Proceedings of the National Academy of
2174 Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 1, 5 jan. 2021.
2175 doi.org/10.1073/pnas.2013686117 PMID: 33372158 PMCID: PMC7817195.
- 2176 WANG, X. N.; LI, Z. S.; REN, Y.; JIANG, T.; WANG, Y. Q.; CHEN, M.; ZHANG, J.; HAO, J. X.;
2177 WANG, Y. B.; SHA, R. N.; HUANG, Y.; LIU, X.; HU, J. C.; SUN, G. Q.; LI, H. G.; XIONG, C. L.;
2178 XIE, J.; JIANG, Z. M.; CAI, Z. M.; WANG, J.; WANG, J.; HUFF, V.; GUI, Y. T.; GAO, F. The
2179 Wilms Tumor Gene, *Wt1*, Is Critical for Mouse Spermatogenesis via Regulation of Sertoli Cell
2180 Polarity and Is Associated with Non-Obstructive Azoospermia in Humans. **PLOS Genetics**, v. 9,
2181 n. 8, p. e1003645, ago. 2013. doi.org/10.1016/j.juro.2014.01.066 PMID: 24703150.
- 2182 WANJARI, U. R.; GOPALAKRISHNAN, A. V. Blood-testis barrier: a review on regulators in
2183 maintaining cell junction integrity between Sertoli cells. **Cell Tissue Res**. 2024 May;396(2):157-
2184 175. doi: 10.1007/s00441-024-03894-7. Epub 2024 Apr 2. PMID: 38564020.
- 2185 WEIGEL MUÑOZ, M.; COHEN, D. J.; DA ROS, V. G.; GONZÁLEZ, S. N.; REBAGLIATI CID, A.;
2186 SULZYK, V.; CUASNICU, P. S. Physiological and pathological aspects of epididymal sperm
2187 maturation. **Mol Aspects Med**. 2024 Dec; 100:101321. doi: 10.1016/j.mam.2024.101321. Epub
2188 2024 Sep 27. PMID: 39340983.
- 2189 WINNALL, W. R.; MUIR, J. A.; HEDGER, M. P. Rat resident testicular macrophages have an
2190 alternatively activated phenotype and constitutively produce interleukin-10 in vitro. **J Leukoc
2191 Biol**. 2011 Jul;90(1):133-43. doi: 10.1189/jlb.1010557. Epub 2011 Apr 15. PMID: 21498587.
- 2192 WOLFE, A.; HUSSAIN, M. A. The emerging role(s) for kisspeptin in metabolism in mammals.
2193 **Front Endocrinol (Lausanne)**. 2018 Apr 24; 9:184. doi: 10.3389/fendo.2018.00184. PMID:
2194 29740399; PMCID: PMC5928256.
- 2195 WU, H.; JIANG, X.; GAO, Y.; LIU, W.; WANG, F.; GONG, M.; CHEN, R.; YU, X.; ZHANG, W.;
2196 GAO, B.; SONG, C.; HAN, D. Mumps virus infection disrupts blood-testis barrier through the
2197 induction of TNF- α in Sertoli cells. **FASEB J**. 2019 Nov;33(11):12528-12540. doi:
2198 10.1096/fj.201901089R. Epub 2019 Aug 26. PMID: 31450968; PMCID: PMC6902681.
- 2199 WU, S.; YAN, M.; GE, R.; CHENG, C. Y. Crosstalk between Sertoli and Germ Cells in Male
2200 Fertility. **Trends Mol Med**. 2020 Feb;26(2):215-231. doi: 10.1016/j.molmed.2019.09.006. Epub
2201 2019 Nov 11. PMID: 31727542.

- 2202 XIAO, L.; FANG, Z.; WANG, Q.; SHENG, X.; QI, X.; XING, K.; GUO, Y.; NI, H.; WANG, X.;
2203 ZHANG, Y. Curcumin Ameliorates Age-Induced Tight Junction Impaired in Porcine Sertoli Cells
2204 by Inactivating the NLRP3 Inflammasome through the AMPK/SIRT3/SOD2/mtROS Signaling
2205 Pathway. **Oxid Med Cell Longev**. 2023 Feb 17; 2023:1708251. doi: 10.1155/2023/1708251.
2206 PMID: 36846717; PMCID: PMC9957632.
- 2207 XIE, Q.; KANG, Y.; ZHANG, C.; XIE, Y.; WANG, C.; LIU, J.; YU, C.; ZHAO, H.; HUANG, D. The
2208 Role of Kisspeptin in the Control of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis and Reproduction.
2209 **Front Endocrinol (Lausanne)**. 2022 Jun 28; 13:925206. doi: 10.3389/fendo.2022.925206.
2210 PMID: 35837314; PMCID: PMC9273750.
- 2211 YAN, H. H. N.; MRUK, D. D.; LEE, W. M.; YAN CHENG, C. Blood-testis barrier dynamics are
2212 regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein
2213 endocytosis and recycling in Sertoli cells. **FASEB J**. 2008 Jun;22(6):1945-59. doi: 10.1096/fj.06-
2214 070342. Epub 2008 Jan 11. PMID: 18192323; PMCID: PMC2804916.
- 2215 YANG, Y.; SONG, S.; GU, S.; GU, Y.; ZHAO, P.; LI, D.; CHENG, W.; LIU, C.; ZHANG, H.
2216 Kisspeptin prevents pregnancy loss by modulating the immune microenvironment at the
2217 maternal-fetal interface in recurrent spontaneous abortion. **Am J Reprod Immunol**. 2024
2218 Feb;91(2):e13818. doi: 10.1111/aji.13818. PMID: 38414308.
- 2219 YE, L.; HUANG, W.; LIU, S.; CAI, S.; HONG, L.; XIAO, W.; THIELE, K.; ZENG, Y.; SONG, M.;
2220 DIAO, L. Impacts of Immunometabolism on Male Reproduction. **Front Immunol**. 2021 Jul 21;
2221 12:658432. doi: 10.3389/fimmu.2021.658432. PMID: 34367130; PMCID: PMC8334851.
- 2222 YEUM, C. H.; KIM, S. W.; KIM, N. H.; CHOI, K. C.; LEE, J. INCREASED EXPRESSION OF
2223 AQUAPORIN WATER CHANNELS IN HYPOTHYROID RAT KIDNEY. **Pharmacol Res**. 2002
2224 Jul;46(1):85-8. doi: 10.1016/s1043-6618(02)00036-1. PMID: 12208125.
- 2225 YOSHIHARA, A.; LUO, Y.; ISHIDO, Y.; USUKURA, K.; ODA, K.; SUE, M.; KAWASHIMA, A.;
2226 HIROI, N.; SUZUKI, K. Inhibitory effects of methimazole and propylthiouracil on iodotyrosine
2227 deiodinase 1 in thyrocytes. **Endocr J**. 2019 Apr 25;66(4):349-357. doi: 10.1507/endocrj. EJ18-
2228 0380. Epub 2019 Feb 27. PMID: 30814441.
- 2229 YOUNG, J.; GEORGE, J. T.; TELLO, J. A.; FRANCOU, B.; BOULIGAND, J.; GUIOCHON-
2230 MANTEL, A.; BRAILLY-TABARD, S.; ANDERSON, R. A.; MILLAR, R. P. Kisspeptin Restores
2231 Pulsatile LH Secretion in Patients with Neurokinin B Signaling Deficiencies: Physiological,
2232 Pathophysiological and Therapeutic Implications. **Neuroendocrinology**. 2013;97(2):193-202.
2233 doi: 10.1159/000336376. Epub 2012 Feb 24. PMID: 22377698; PMCID: PMC3902960.
- 2234 ZHANG, G.; SUN, Y.; GUAN, M.; LIU, M.; SUN, S. Single-cell and spatial transcriptomic
2235 investigation reveals the spatiotemporal specificity of the beta-defensin gene family during
2236 mouse sperm maturation. **Cell Commun Signal**. 2024 May 14;22(1):267. doi: 10.1186/s12964-
2237 024-01637-3. PMID: 38745232; PMCID: PMC11092205.
- 2238 ZHANG, H.; YIN, Y.; WANG, G.; LIU, Z.; LIU, L.; SUN, F. Interleukin-6 disrupts blood-testis
2239 barrier through inhibiting protein degradation or activating phosphorylated ERK in Sertoli cells.
2240 **Scientific Reports**, v. 4, p. 4260, 3 mar. 2014. doi: 10.1038/srep04260. PMID: 24584780;
2241 PMCID: PMC3939460.
- 2242 ZHANG, W. X.; QIN, J. C.; WANG, R.; WANG, L.; ZHANG, J. [Radiation-induced oxidative
2243 stress and claudin-11 mRNA expression in the testis]. **National Journal of Andrology**, v. 19, n.
2244 4, p. 306–310, 1 abr. 2013. PMID: 23678707.
- 2245 ZHAO, H.; YU, C.; HE, C.; MEI, C.; LIAO, A.; HUANG, D. The Immune Characteristics of the
2246 Epididymis and the Immune Pathway of the Epididymitis Caused by Different Pathogens.
2247 **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. September, p. 1–12, 2020. doi:
2248 10.3389/fimmu.2020.02115. PMID: 33117332; PMCID: PMC7561410.

- 2249 ZHAO, S.; ZHU, W.; XUE, S.; HAN, D. Testicular defense systems: Immune privilege and innate
2250 immunity. **Cell Mol Immunol**. 2014 Sep;11(5):428-37. doi: 10.1038/cmi.2014.38. Epub 2014
2251 Jun 23. PMID: 24954222; PMCID: PMC4197207.
- 2252 ZHAO, X.; NIE, J.; ZHOU, W.; ZENG, X.; SUN, X. The metabolomics changes in epididymal
2253 lumen fluid of CABS1 deficient male mice potentially contribute to sperm deformity. **Front**
2254 **Endocrinol (Lausanne)**. 2024 Aug 21; 15:1432612. doi: 10.3389/fendo.2024.1432612. PMID:
2255 39234505; PMCID: PMC11371703.
- 2256 ZHAO, Y.; DIAO, H.; NI, Z.; HU, S.; YU, H.; ZHANG, Y. The epididymis-specific antimicrobial
2257 peptide β -defensin 15 is required for sperm motility and male fertility in the rat (*Rattus*
2258 *norvegicus*). **Cell Mol Life Sci**. 2011 Feb;68(4):697-708. doi: 10.1007/s00018-010-0478-4.
2259 Epub 2010 Aug 8. PMID: 20694738; PMCID: PMC11114747.
- 2260 ZHU, C. L.; WANG, L.; ZHAO, X. Q.; YANG, R.; ZHANG, B. Y.; ZHAO, Y. Y.; XIA, X. J.;
2261 ZHANG, H. H.; CHEN, S. J.; JIANG, J. Q.; HU, J. H.; ZHANG, G. P.; BAI, Y. yu; LEI, L. C.;
2262 ZHANG, X. M. Antimicrobial peptide MPX attenuates LPS-induced inflammatory response and
2263 blood-testis barrier dysfunction in Sertoli cells. **Theriogenology**. 2022 Sep 1; 189:301-312. doi:
2264 10.1016/j.theriogenology.2022.07.001. Epub 2022 Jul 7. PMID: 35842953.
- 2265