

LUIZ OTÁVIO GUIMARÃES ERVILHA

**O EFEITO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA SOBRE
PARÂMETROS TESTICULARES DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO
TREINAMENTO FÍSICO RESISTIDO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Mariana Machado Neves

Coorientadora: Ana Cláudia Ferreira Souza

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Ervilha, Luiz Otávio Guimarães, 1997-

E73e
2021

O efeito da hipertensão arterial pulmonar induzida sobre parâmetros testiculares de ratos wistar submetidos ao treinamento físico resistido / Luiz Otávio Guimarães Ervilha. – Viçosa, MG, 2021.

1 dissertação eletrônica (90 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Orientador: Mariana Machado Neves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.090>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Hipertensão pulmonar. 2. Exercícios físicos. 3. Epitélio Seminífero. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 616.24

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves CRB6/2578

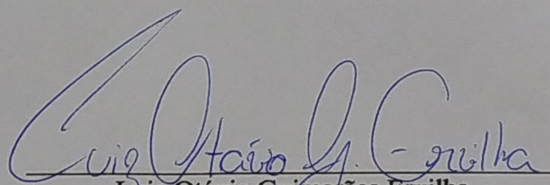
LUIZ OTÁVIO GUIMARÃES ERVILHA

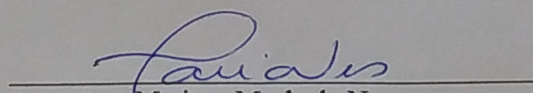
**O EFEITO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA SOBRE
PARÂMETROS TESTICULARES DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO
TREINAMENTO FÍSICO RESISTIDO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de julho de 2021.

Assentimento:


Luiz Otávio Guimarães Ervilha
Autor


Mariana Machado Neves
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter guiado meus caminhos e estar comigo nos momentos difíceis.

À minha mãe, Ana Rosa, agradeço pelo amor, suporte, força e por acreditar em mim, não medindo esforços para o meu melhor. Se hoje cheguei aqui, foi graças a você.

À minha família, por toda confiança depositada em mim, em especial à minha tia Maria Aparecida e minha prima Juliana. Aos meus entes falecidos, em especial ao meu pai Luiz Carlos e a minha avó Nilza, por terem se feito presentes a todo momento, mesmo em outro plano.

Difícilmente um trabalho acadêmico é feito só. Este não é uma exceção. De diferentes formas, igualmente importantes, muitas pessoas contribuíram para o desenvolvimento deste estudo.

Agradeço aos meus fiéis amigos de Viçosa. Obrigado Paula, Caio e Dandara. Indiscutivelmente vocês foram importantes para minha formação pessoal e profissional. Nossas conversas, risadas, cumplicidades e conselhos foram sempre de grande ajuda e merecem ser lembradas.

Aos meus amigos queridos, Liara, Marcella, Victória, Alice, Larissa, Mateus, Barbara, Vanessa, Bianca, Kemilli. Obrigado pelas conversas, companheirismo, incentivo, e por acreditarem no meu potencial.

Aos meus amigos do Laboratório de Reprodução Animal e Toxicologia (LARAT) e agregados. Em especial ao Renner, Arabela, Thainá, Mírian, Kamilla, Elizabeth, Isabela, Camila, Daniel e Felipe. Pelas lâminas cortadas, cafés às 16h, momentos de risadas, e por sempre contribuírem para o desenvolver de ideias. A companhia de vocês torna o trabalho mais leve.

À Fernanda e Elizabeth, pelas conversas diárias, dúvidas respondidas e o entusiasmo pela implementação de técnicas em nossos trabalhos.

Aos meninos da educação física, em especial ao Leôncio, pela oportunidade de colaboração. Que nosso trabalho possa nos render grandes frutos.

Aos professores do laboratório de Biologia Estrutural, Sérgio, Clóvis, Izabel e Juliana, por todo suporte e ensinamentos durante a minha formação.

Ao Prof. Dr Antonio Natali pela oportunidade de colaboração.

A Profª Drª Emily Correna Carlo Reis pelo auxílio nas análises.

Às minhas fiéis companheiras, Thainá, Isabela e Mírian. Por todos os projetos que desenvolvemos e pelos que ainda iremos construir. Obrigado pelo auxílio.

A minha co-orientadora Profª Drª Ana Cláudia, por me apresentar a pesquisa, me ensinar técnicas e possibilitar meu crescimento.

A minha orientadora Profª Drª Mariana, por ter me dado a oportunidade de trabalho e confiança, me instruindo a pensar e me ensinando a discernir o melhor caminho. Desde a graduação, são anos de convívio e ensinamentos, que levarei para toda a vida.

À Universidade Federal de Viçosa, minha querida UFV, e seus funcionários e professores, por todo apoio e suporte.

À agência de fomento CAPES pelo consentimento da bolsa.

RESUMO

GUIMARÃES-ERVILHA, Luiz Otávio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021. **O efeito da hipertensão arterial pulmonar induzida sobre parâmetros testiculares de ratos Wistar submetidos ao treinamento físico resistido.** Orientadora: Mariana Machado Neves. Coorientadora: Ana Cláudia Ferreira Souza.

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença grave e pouco conhecida, que acomete milhares de pessoas anualmente, comprometendo a qualidade de vida do indivíduo e podendo levar a óbito. Esta doença se caracteriza por vasoconstrição pulmonar excessiva que afeta principalmente pulmões e coração, sem informação sobre alterações em outros órgãos, como o testículo. Um dos tratamentos para doenças vasculares como HAP é a prática de exercício físico, como o treinamento físico de resistência (TFR). Este trabalho objetivou avaliar se a HAP afeta a organização e funcionalidade testicular e se a prática do TFR protege o testículo contra os possíveis danos causados pela HAP. Ratos Wistar machos (60 dias) foram distribuídos em quatro grupos (n = 8 animais/grupo): animais saudáveis sedentários, animais sedentários com HAP, animais saudáveis submetidos ao TFR e animais com HAP submetidos ao TFR. A HAP foi induzida usando duas injeções de monocrotalina (20 mg/kg ip). Os animais foram eutanasiados após 30 dias de TFR. Os testículos foram removidos e processados para análises histológicas, bioquímicas e enzimáticas. Coletou-se sangue para obtenção de soro e determinação da concentração sérica de testosterona (CEUA número 38/2021). Animais sedentários com HAP apresentaram redução na concentração de testosterona e acúmulo de colesterol no testículo, indicando alterações na esteroidogênese. Os testículos destes animais exibiram redução na atividade de enzimas antioxidantes e elevação na concentração de óxido nítrico, promovendo autofagia e morte celular. Alterações metabólicas e enzimáticas resultaram em desorganização na arquitetura tecidual e comprometimento na produção de espermatozoides. O TFR em animais com HAP melhorou parâmetros previamente alterados pela HAP, como elevação dos níveis de testosterona e óxido nítrico, reduzindo as alterações histológicas testiculares. Todavia, não foi possível reverter satisfatoriamente o nível de autofagia e a queda na produção espermática diária. Em conclusão, nossos resultados evidenciaram um efeito deletério da HAP na funcionalidade e organização testicular. O TRF, por sua vez, se mostrou um tratamento complementar capaz de minimizar os danos testiculares causados pela HAP.

Palavras-chave: Hipertensão pulmonar. Atividade física. Epitélio seminífero.

ABSTRACT

GUIMARÃES-ERVILHA, Luiz Otávio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2021. **The effect of induced pulmonary arterial hypertension on testicular parameters of Wistar rats submitted to resistance exercise training.** Advisor: Mariana Machado Neves. Co-advisor: Ana Cláudia Ferreira Souza.

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a serious and little-known disease that affects thousands of people annually, compromising the individual's quality of life and potentially leading to death. This disease is defined by excessive pulmonary vasoconstriction that mainly affects the lungs and heart, without information on changes in other organs, such as the testis. One of the treatments for vascular diseases such as PAH is physical exercise, such as resistance exercise training (RT). This study aimed to evaluate (i) whether PAH affects testicular organization and functionality and (ii) whether the practice of RT protects the testis against possible damage by PAH. Male Wistar rats (60 days old) were divided into four groups (n = 8 animals/group): healthy sedentary animals, sedentary animals with PAH, healthy animals subjected to RT, and animals with PAH subjected to RT. PAH was induced using two injections of monocrotaline (20 mg/kg ip). Animals were euthanized after 30 days of RT. The tests were removed and processed for histological, biochemical, and enzymatic analyses. Blood was collected to obtain serum and determine serum testosterone concentration (CEUA number 38/2021). Sedentary animals with PAH showed a reduction in the concentration of testosterone and accumulation of cholesterol in the testis, indicating alterations in steroidogenesis. The tests of these animals showed a reduction in the activity of antioxidant enzymes and an increase in the concentration of nitric oxide, promoting autophagy and cell death. Metabolic and enzymatic alterations resulted in disorganization in tissue architecture and compromised sperm production. The RT in animals with PAH improved parameters previously altered by PAH, such as increased levels of testosterone and nitric oxide, reducing testicular histological changes. However, it was not possible to satisfactorily reverse the level of autophagy and the drop in daily sperm production. In conclusion, our results showed a deleterious effect of PAH on testicular functionality and organization. RT, in turn, provided a complementary treatment of the minor testicular damage caused by PAH.

Keywords: Pulmonary hypertension. Physical exercise. Seminiferous epithelium.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	9
1. Justificativa	9
2. Objetivos	10
Objetivos gerais:.....	10
Objetivos específicos:.....	10
3. Revisão de Literatura	11
3.1 Caracterização da hipertensão e seu subtipo, a hipertensão arterial pulmonar.....	11
3.2 Aspectos histológicos e funcionais do tecido testicular.....	13
3.2.1 Espermatogênese.....	15
3.2.2 Esteroidogênese.....	17
3.3 Eventos fisiológicos que podem ocorrer em indivíduos com hipertensão.....	19
3.3.1 Autofagia.....	19
3.3.2 Estresse oxidativo.....	20
3.4 Treinamento físico resistido.....	22
4. Referências bibliográficas	23
CAPÍTULO 2	30
1. Introdução	30
2. Materiais e métodos	32
2.1 Animais.....	32
2.2 Design experimental.....	32
2.3 Protocolo do TFR.....	34
2.4 Eutanásia e coleta de material.....	34
2.5 Determinação da concentração sérica de testosterona.....	35
2.6 Biometria corporal e dos órgãos reprodutores.....	35
2.7 Determinação de colesterol, triglicérides e glicose no tecido testicular.....	35
2.8 Avaliação de marcadores de estresse oxidativo.....	36
2.9 Processamento histológico dos testículos.....	38
2.10 Análise histológica testicular.....	39
2.11 Análise estereológica e morfométrica testicular.....	39
2.12 Contagem de células germinativas no epitélio seminífero.....	41
2.13 Análise de viabilidade das células testiculares.....	42
2.14 Análise estatística.....	43
3. Resultados	43
3.1 Validação do método de indução e efeito do TFR sobre parâmetros cardíacos.....	43

3.2 Efeitos do TFR em parâmetros biométricos e testiculares de ratos sedentários	44
3.3 Biometria corporal e de órgãos reprodutores em animais com HAP	46
3.4 Concentrações séricas de testosterona	48
3.5 Bioquímica testicular	48
3.7 Morfometria e estereologia testicular	52
3.8 Contagem de células germinativas e produção espermática diária	56
3.9 Atividade de enzimas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo.....	59
3.10 Viabilidade celular e atividade de autofagia	61
4. Discussão	67
5. Conclusão	73
6. Referências bibliográficas.....	74
Tabela suplementar 1	85
CONCLUSÕES GERAIS	89
ANEXO I	90

CAPÍTULO 1

1. Justificativa

A hipertensão arterial pulmonar faz parte de um grupo de doenças que acometem a circulação, causando aumento da pressão na artéria pulmonar e, conseqüentemente, comprometendo o coração. É uma doença grave, pouco conhecida e de difícil diagnóstico, que acomete milhões de pessoas em todo o mundo, não havendo, ainda, uma cura para a doença. O tratamento se baseia na utilização de medicamentos com potencial vasodilatador para diminuição da pressão arterial.

Além disso, métodos alternativos também são utilizados como tratamento para doenças pulmonares e cardiovasculares, seja de forma isolada ou combinada com medicamentos, destacando-se a prática de atividade física. O exercício físico é uma terapia não farmacológica e acessível que tem mostrado bons resultados para o tratamento de doenças como a hipertensão arterial pulmonar, melhorando parâmetros cardíacos e pulmonares. Entre os diferentes tipos de exercícios, o treinamento físico resistido ainda não foi totalmente explorado como tratamento da hipertensão arterial pulmonar, mas resultados preliminares se mostraram promissores.

Como a doença acomete principalmente os pulmões e o coração, estudos sobre o impacto da hipertensão em outros órgãos ainda são escassos. Outros tipos de hipertensão, como a hipertensão arterial sistêmica já mostraram seus efeitos sobre parâmetros funcionais de órgãos reprodutores masculinos, comprometendo a espermatogênese e a qualidade espermática (Colli et al., 2019). Entretanto, ainda não há nenhum estudo que avalie danos testiculares decorrentes de hipertensão arterial pulmonar.

Com base no exposto acima, o presente estudo objetivou aprofundar o conhecimento sobre os problemas causados pela hipertensão arterial pulmonar em órgãos reprodutores

masculinos, testando duas hipóteses: (i) a hipertensão arterial pulmonar causa alterações em parâmetros testiculares, com conseqüente redução na produção espermática; (ii) a prática do treinamento físico resistido é capaz de minimizar os efeitos negativos da doença sobre o tecido testicular.

2. Objetivos

Objetivos gerais:

- Avaliar o efeito da hipertensão arterial pulmonar sobre a histofisiologia testicular, e se estes danos podem ser atenuados com treinamento físico resistido.

Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito da hipertensão arterial pulmonar e do treinamento físico resistido sobre a histologia e histomorfometria testicular de ratos Wistar, bem como quantificar células em processo de morte celular no parênquima testicular por meio da análise do laranja de acridina;

- Avaliar o efeito da hipertensão arterial pulmonar e do treinamento físico resistido sobre a produção espermática diária;

- Analisar o perfil antioxidante testicular e os níveis dos produtos de peroxidação lipídica e proteica nos testículos dos animais tratados;

- Analisar parâmetros bioquímicos do testículo;

- Dosar a concentração sérica de testosterona nesses animais.

3. Revisão de Literatura

3.1 – *Caracterização da hipertensão e seu subtipo, a hipertensão arterial pulmonar*

Danos estruturais e funcionais em vasos do sistema circulatório causam alterações na pressão sanguínea. A pressão arterial é aumentada de modo persistente quando da ocorrência de vasoconstrição, aumento da espessura da parede arterial e redução do lúmen dos vasos sanguíneos, resultando na patologia da hipertensão arterial. De forma genérica, a hipertensão arterial, conhecida popularmente como pressão alta, envolve alterações cardiológicas multifatoriais que se expressam por disfunções em mecanismos de regulação da pressão arterial, como fatores renais, vasculares e endócrinos, que interagem para a regulação da pressão (Oparil et al., 2018). No entanto, problemas na regulação vascular em um órgão causam alterações locais na pressão, que podem atingir outros órgãos, como o coração. Existem outros tipos de hipertensões além da hipertensão arterial sistêmica, como hipertensões renovascular, do sistema porta (hepático) e pulmonar (Thenappan et al., 2018; Hernández-Gea et al., 2018; Herrmann et al., 2019).

A hipertensão pulmonar é um grupo de doenças que atinge as artérias pulmonares, comprometendo o sistema de controle da pressão nos pulmões. Há uma rigidez das artérias pulmonares em decorrência de problemas no processo de vasoconstrição/vasodilatação, caracterizados por acúmulo de colágeno e resposta a eventos inflamatórios. Estima-se que a hipertensão pulmonar atinge cerca de 100 milhões de pacientes em todo mundo. O mau diagnóstico dificulta a identificação da condição de hipertensão pulmonar e, conseqüentemente, a adoção de medidas paliativas, uma vez que ainda não há uma cura. Atualmente, a doença é subdividida em cinco grupos de acordo com achados patológicos, características hemodinâmicas e homogeneidade dos tratamentos. O grupo 1, hipertensão arterial pulmonar (HAP) é composto por doenças relacionadas a artéria pulmonar, o grupo 2 é a hipertensão

pulmonar provocada por problemas no ventrículo esquerdo do coração. O grupo 3 é a hipertensão pulmonar em decorrência de problemas no pulmão, como problemas de desenvolvimento do órgão. A hipertensão pulmonar no grupo 4 é causada por obstruções da artéria pulmonar, e no grupo 5 a doença é resultado de fatores desconhecidos ou de múltiplos fatores (Thenappan et al., 2018; Simonneau et al., 2019).

Dentre esses grupos, a HAP é caracterizada por vasoconstrição pulmonar excessiva e remodelação vascular anormal. Estes processos geralmente afetam todas as camadas dos vasos e ocasionam perda severa da área transversal do lúmen, dificultando a passagem do sangue. Conseqüentemente, ocorre aumento na pós-carga do ventrículo direito, resultando em pressão arterial pulmonar média em repouso (PAPm) acima de 25 mmHg e pressão capilar pulmonar menor que 15 mmHg (Pan et al., 2020). A remodelação vascular pulmonar é observada nas grandes artérias pulmonares, bem como nas artérias pulmonares distais menores, e pode estar associada a eventos inflamatórios crônicos. Estes eventos acabam por alterar a homeostase corporal, afetando outros órgãos além dos pulmões e do coração, resultando em problemas severos ao indivíduo e, muitas vezes, até a morte. Dados precisos de prevalência de HAP ainda não estão disponíveis, mas sabe-se que a doença tem prognóstico ruim, evidenciado por taxas de sobrevida que podem ser inferiores a dois anos na ausência de tratamento (Zimmer et al., 2017). O comprometimento da artéria pulmonar resulta em falha direta do ventrículo direito, uma vez que o aumento da pressão pulmonar sobrecarrega a região do órgão. As terapias para o tratamento da hipertensão pulmonar consistem, sobretudo, em reduzir a pressão arterial pulmonar e a sobrecarga do ventrículo direito, já que a falha cardíaca é a principal causa de morte de pacientes com a doença (Coons et al., 2019).

A patogênese do grupo 1, HAP, ainda é dividida em subtipos, sendo o tipo 1.3 caracterizado pela doença causada por drogas e toxinas (Simonneau et al., 2019). Outros subtipos da HAP são relacionados a origens idiopáticas (grupo 1.1), hereditárias (grupo 1.2),

associadas a outras doenças (grupo 1.4), dentre outros. Ao longo dos anos, uma série de medicamentos e toxinas foram descobertos como fatores de risco, ou facilitadores, para o desenvolvimento da HAP, como o triptofano e a cocaína (Simonneau et al., 2009). Usados por períodos prolongados e/ou indiscriminadamente, esses agentes podem predispor o indivíduo a apresentar HAP. Um clássico tóxico que induz à HAP é a monocrotalina, que está presente em uma grande quantidade de plantas. Ela induz hepatotoxicidade e, por isso, tem sido usada em animais de laboratório como potente indutor da HAP. Por exemplo, uma injeção subcutânea de 60 mg/kg é capaz de alterar a vasculatura pulmonar em 2 semanas, facilitando o processo de estudo da HAP em modelos de pesquisa (Gomez-Arroyo et al., 2012).

Diante as complicações mais expressivas encontradas no pulmão e coração, estudos correlacionando a HAP com outros órgãos não são tão comuns. Todavia, trabalhos recentes demonstram que a HAP pode prejudicar o fluxo sanguíneo no cérebro (Dai et al., 2017), comprometer a função hepática aumentando os índices de ácidos graxos livres na circulação (Brittain et al., 2016), desregular a produção de hormônios tireoidianos (Richter et al., 2016), desencadear problemas renais (Nickel et al., 2019) e diversos outros distúrbios em órgãos fora da dupla pulmão/coração. Esses problemas ocorrem, principalmente, em decorrência de disfunções endoteliais e metabólicas sistêmicas e do processo inflamatório sistêmico acarretados pela HAP (Nickel et al., 2020). Ainda não há nenhum trabalho que correlacione a HAP com problemas testiculares, mas por ser um órgão altamente vascularizados (Heinrich et al., 2020), o mesmo pode ser susceptível aos danos sistêmicos causados pela HAP.

3.2 Aspectos histológicos e funcionais do tecido testicular

Os testículos são órgãos pares que se encontram no escroto, fora da cavidade abdominal. Internamente, são envoltos por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea, da qual partem septos que dividem o órgão em compartimentos, sem uma

lobulação bem delimitada. Estes compartimentos são ocupados por túbulos seminíferos e interstício que juntos formam o parênquima testicular (Junqueira e Carneiro, 2013).

Os túbulos seminíferos são formados por túnica própria, composta de lâmina basal, lâmina própria de tecido conjuntivo e camada de células mioides, epitélio seminífero e lúmen tubular (Fijak et al., 2006; Junqueira e Carneiro, 2013). No epitélio germinativo estão presentes as células de Sertoli e células da linhagem germinativa. As células de Sertoli realizam diversas funções que favorecem a atividade das células germinativas, como nutrição, sustentação, proteção, produção e liberação de fatores de crescimento (Russell et al., 1990; Fijak et al., 2006). As células mioides da túnica própria, por sua vez, tem elementos contráteis no seu citoplasma que auxiliam na contração do túbulo seminífero, favorecendo a movimentação do conteúdo luminal por movimentos peristálticos. Já o interstício é formado por tecido conjuntivo frouxo, no qual encontramos vasos sanguíneos, vasos linfáticos, células do sistema de defesa e células intersticiais, também chamadas de células de Leydig. As extremidades dos túbulos seminíferos são contínuas aos túbulos retos, os quais se comunicam com os ductos eferentes que conectam à rede testicular ao ducto epididimário (Russell e França, 1995; Fijak et al., 2006; Junqueira e Carneiro, 2013). Neste sistema de ductos, fluidos e gametas produzidos nos túbulos seminíferos podem progredir pelos ductos extra-testiculares até chegarem no epidídimo.

O testículo apresenta duas funções principais, realizadas em compartimentos distintos. A primeira, uma função endócrina, consiste na produção de hormônios esteroides, que atuam em células do epitélio seminífero, além de serem transportados pela corrente sanguínea, mais precisamente do hormônio testosterona. A ação é realizada no compartimento intertubular pelas células de Leydig, cujo processo é chamado de esteroidogênese. A segunda função principal, uma função exócrina, é a produção do gameta masculino no compartimento tubular. Através do processo de espermatogênese, as células germinativas dão origem aos espermatozoides que serão liberados no lúmen tubular (Navarro et al., 2004).

Os espermatozoides são conhecidos por serem células pequenas e móveis, com a função única de fecundar o ovócito. Por serem células haploides, sua produção dentro dos túbulos seminíferos exige uma proteção no epitélio seminífero contra o reconhecimento da sua presença pelo sistema imunológico. Por isso, o epitélio seminífero conta com a formação da barreira hemato-testicular pelas células de Sertoli. Para isso, células de Sertoli vizinhas formam zônulas de oclusão entre elas que são capazes de impedir a passagem de macromoléculas ao longo de todo o epitélio, criando uma diferença entre as moléculas presentes nas suas porções basal e adluminal. A porção basal do epitélio é formada por espermatogônias, espermatócitos em leptóteno e espermatócitos em zigóteno, enquanto a porção adluminal é composta por espermatócitos em paquíteno, espermatócitos secundários, espermátides e espermatozoides. Assim, a principal função da barreira hemato-testicular é proteger as células germinativas do sistema imunológico. Mesmo assim, o testículo é capaz de produzir respostas inflamatórias em decorrência de diferentes estímulos. Porém, essa resposta limita-se, em condições saudáveis, ao interstício e compartimento basal do epitélio seminífero (Cheng e Mruk, 2012).

3.2.1 *Espermatogênese*

Em mamíferos, a espermatogênese consiste na passagem de células germinativas diploides pelos processos de mitose e meiose, originando células haploides que resultaram em espermatozoides, a partir de modificações nucleares e citoplasmáticas. Esse processo é contínuo durante a vida reprodutiva do homem e de animais machos, o que requer uma população de células tronco chamadas de espermatogônias, além de um grande mecanismo de controle e organização (Griswold et al., 2016). A população de células tronco espermatogoniais deve ser capaz de se auto-renovar e se diferenciar para manter a produção espermática ao longo do tempo.

Além de ser um processo contínuo, a espermatogênese é um processo cíclico, com o objetivo de garantir uma concentração adequada de espermatozoides por ejaculado. O ciclo do epitélio seminífero corresponde a uma série de associações celulares que vão se diferenciando ao longo do túbulo seminífero. Portanto, um túbulo seminífero pode apresentar diferenças na sua composição de células germinativas de acordo com a fase do ciclo do epitélio seminífero (LeBlond e Clermont, 1952). O ciclo pode ser dividido em estádios, que tem número e duração constante dentro de uma mesma espécie, sendo variável entre espécies. Os segmentos de estádios adjacentes são dispostos em sequência linear ao longo do túbulo, de modo que em qualquer ponto do túbulo seminífero há vários tipos de célula germinativa em formação. O ponto chave para compreender e determinar o estágio em questão é relacionado às etapas da meiose (Griswold et al., 2016). A determinação do tipo celular em cada estágio do ciclo segue um padrão e pode ser determinado pela morfologia celular, que se baseia na morfologia e localização das células no epitélio, ou através do sistema de determinação acrossômica, que se baseia em alterações do sistema acrossômico e na morfologia celular. O método de determinação vai implicar em diferenças entre o número de estádios entre as espécies (Leblond1952; Griswold et al., 2016; Amann, 2008).

Dentre os efeitos celulares sucessivos que ocorrem com as espermatogônias durante a espermatogênese podemos elencar, mitose, meiose e diferenciação celular. Na fase proliferativa ocorre a divisão mitótica das espermatogônias, que marca o início do processo coordenado da formação do gameta. A vitamina A na forma de ácido retinoico parece ser fundamental nesse processo de diferenciação da espermatogônia e advém da célula de Sertoli. Ao final desta fase são originadas células chamadas de espermatócitos. Na fase meiótica, os espermatócitos sofrem meiose e o material genético é recombinado e segregado. É durante essa fase que podemos encontrar no tecido espermatócitos I na etapa reducional da meiose, principalmente em leptóteno e paquíteno, ou espermatócitos II na fase equacional da meiose. Esta última, no

entanto, é observada com menos frequência na lâmina devido a rapidez desta fase. Por fim, na fase de diferenciação celular, também chamada de espermiogênese, é caracterizada pelas modificações citoplasmáticas e nucleares das células espermátides, produto final da meiose. Portanto, essas células passam do formato arredondado para o formato alongado, até se diferenciarem em espermatozoides. Neste momento, ocorre a quebra das estruturas de ligação entre a célula de Sertoli e os espermatozoides, que são liberados do epitélio seminífero para o lúmen tubular. Este processo é chamado de espermição, compreendendo o fim da espermatogênese (Russell et al., 1990; Hermo et al., 2010).

Além de formar a barreira hemato-testicular, interceder na ação do ácido retinoico, nutrir as células germinativas e proporcionar suporte, a célula de Sertoli é fundamental para o processo de espermiogênese. É através das células de Sertoli que a testosterona produzida pelas células de Leydig chega às células germinativas e induzem a transformação celular no processo de espermiogênese. A célula, controlada pelo hormônio folículo estimulante (FSH) e pela testosterona, secreta a proteína ligante de andrógeno (ABP) que concentra a testosterona nos túbulos seminíferos. (Holdcraft e Braun, 2004; Griswold et al., 2016). Além disso, a célula de Sertoli é capaz de fagocitar restos residuais do processo de espermatogênese e permitir a passagem pela barreira Sertoli-Sertoli, durante a fase meiótica, de espermátocitos preleptóteno/leptóteno do compartimento basal ao compartimento adluminal (Smith e Braun, 2012; França et al., 2016).

3.2.2 *Esteroidogênese*

As células intersticiais, ou células de Leydig, são células responsáveis pela síntese da testosterona, o principal hormônio masculino. Este andrógeno é importante na manutenção e produção adequada dos gametas masculinos, além de influenciar em fenótipos masculinos secundários. A célula apresenta retículo endoplasmático desenvolvido, grande número de

mitocôndrias e presença de vesículas contendo lipídio, indicando ser uma célula com intensa atividade metabólica (Junqueira e Carneiro, 2013; Zirkin e Papadopoulos, 2017).

O eixo hipotálamo-hipófise-gônada está intimamente relacionado com a atividade das células de Leydig. O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) produzido no hipotálamo estimula a síntese e secreção do hormônio luteinizante (LH) na hipófise que, por sua vez, atua sobre as células de Leydig estimulando a produção de testosterona (Kaprra e Huhtaniemi, 2018).

Com o estímulo do LH, o colesterol armazenado em diversos locais das células como gotas lipídicas e na membrana plasmática, deve ser transportado para a membrana mitocondrial externa e depois translocado para a membrana mitocondrial interna. Este último passo é determinante na taxa de sucesso da esteroidogênese (Papadopoulos et al., 2012; Zirkin e Papadopoulos, 2018). Este processo de translocação é realizado pela proteína StAR (proteína reguladora aguda esteroidogênica), enquanto a enzima P450scc (enzima de clivagem de cadeia lateral de colesterol), também chamada de CYP11a1, converte o colesterol em pregnenolona. A partir daí, temos diferentes caminhos para a produção de testosterona. No retículo endoplasmático liso, a pregnenolona é transformada em progesterona pela ação da enzima 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (HSD) ou em 17OH-Pregnenolona pela enzima P450c17. A 17OH-Pregnenolona é convertida em desidroepiandrosterona pela enzima 17,20 liase, que é convertida em androstenediona pela 3 β HSD. Já a progesterona é convertida pela enzima P450c17 em 17OH-Progesterona e pela enzima 17,20 liase é convertida em androstenediona. A androstenediona, nos dois caminhos, é convertida em testosterona pela enzima 17 β HSD (Miller, 2017). A testosterona pode ser convertida em estrógeno ainda na célula de Leydig ou metabolizada para sua forma ativa de di-hidrotestosterona, atuando nas células do epitélio seminífero, por intermédio de Sertoli, no processo de espermatogênese (Miller, 2017).

3.3 Eventos fisiológicos que podem ocorrer em indivíduos com hipertensão

3.3.1 Autofagia

A autofagia em níveis basais é um processo fisiológico do corpo e necessário para a reciclagem de moléculas, proteção contra patógenos e na manutenção da homeostase celular (Racanelli et al., 2018). Os componentes cujo destino é a degradação ou reciclagem são destinados aos lisossomos, organelas com enzimas hidrolíticas no seu interior que, em pH ácido, possibilitam a digestão intracelular. Durante o processo de autofagia, as organelas podem ser entregues aos lisossomos por três caminhos diferentes, caracterizando a macroautofagia, microautofagia ou autofagia mediada por chaperonas (Klionsky, 2005). A microautofagia relaciona-se com a invaginação direta da membrana do lisossomo, capturando organelas e substâncias para o interior da vesícula ácida. Já a autofagia mediada por chaperonas relaciona-se com sequências específicas de proteínas que as direciona aos lisossomos com auxílio de proteínas chaperonas. Por fim, a macroautofagia, o tipo mais comumente encontrado, está associado com a formação de uma vesícula com membrana dupla, o autofagossomo, que irá se fundir com o lisossomo formando o autolisossomo. Ao mencionar autofagia, estamos trabalhando a macroautofagia (Murrow e Debnath, 2013).

O processo autofágico pode ser iniciado por uma variedade de estímulos, como hipóxia e acúmulo de espécies reativas de oxigênio, relacionadas com uma série de doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial pulmonar (Chen et al., 2018). O processo tem origem com o desenvolvimento de uma membrana dupla, o fagóforo, que passa por uma fase de alongamento capturando cargas citoplasmáticas, por fim forma-se uma vesícula, o autofagossomo, com o conteúdo destinado a degradação. Durante esse processo de montagem do autofagossomo, uma série de proteínas são necessárias (Racanelli et al., 2018). Durante a fase de alongamento do fagóforo, destaca-se o sistema de conjugação ATG5-ATG12 e o

sistema de conjugação da cadeia leve 3 da proteína associada ao microtúbulo (LC3)/ATG8, fundamentais para a formação do autofagossomo. A proteína LC3 é encontrada na forma de LC3-I no citosol e a sua derivada LC3-II na membrana do fagóforo. A LC3 é processada e alterada pela Atg4 à LC3-I que é processada a LC3-II (Mizushima1 e Komatsu, 2011). A quantificação da LC3-II é um bom indicativo da abundância de autofagossomos maduros (Glick et al. 2010).

Diversas proteínas regulam a atividade autofágica. Por exemplo, as proteínas do complexo mTOR auxiliam a célula na percepção de alterações do meio, funcionando como sensores, e intermediando várias funções nas células, como a tradução de proteínas e crescimento celular. Além disso, as diversas proteínas do complexo mTOR podem ser influenciadas a inibir ou a promover autofagia, sendo o principal complexo na regulação da atividade autofágica. Outro exemplo de regulador autofágico é a proteína Bcl2, que possui tanto membros pró-apoptóticos como anti-apoptóticos (Mizushima1 e Komatsu, 2011).

Nas células do testículo, o processo basal de autofagia é importante para a manutenção da esteroidogênese e espermatogênese. Nas células de Leydig, o processo autofágico participa da síntese de testosterona pela degradação das vesículas lipídicas liberando colesterol para a formação da testosterona, atuando também o consumo do colesterol através da degradação de proteínas reguladoras negativas da síntese do andrógeno. No processo de espermatogênese, a autofagia auxilia na manutenção da barreira hematotesticular, na formação morfológica adequada dos espermatozoides e na manutenção correta do citoesqueleto, que implica diretamente na motilidade espermática (Gao et al., 2018; Zhu et al., 2019).

3.3.2 *Estresse oxidativo*

O estresse oxidativo é o processo de desequilíbrio entre a produção e neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou nitrogênio (ERNs). Essas espécies reativas são

naturalmente produzidas no corpo. No entanto, quando há maior produção de radicais reativos, o processo passa a ser danoso às células, afetando a atividade de enzimas, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Persson et al., 2014). Exemplo de EROs são radicais superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), enquanto um exemplo de ERNs é o óxido nítrico (NO). Evidências apontam um papel do estresse oxidativo na progressão de várias doenças, incluindo doenças cardiovasculares (Rajendran et al., 2014; Pizzino et al., 2017; Tan et al., 2018).

A produção dessas espécies ocorre como subprodutos de atividade metabólicas das células. Um exemplo é a formação do superóxido no processo de respiração celular, que ocorre na mitocôndria. Rapidamente, as EROs são processadas por um complexo sistema de defesa antioxidante, que começa com a enzima superóxido dismutase (SOD) convertendo o superóxido em H_2O_2 , um não radical, que posteriormente é decomposto em água e oxigênio pela ação de duas outras enzimas, a catalase (CAT) e a glutathione S-transferase (GST). O H_2O_2 é menos reativo que o superóxido, mas seu acúmulo também pode trazer riscos às estruturas celulares (Hermes-Lima 2004). O radical óxido nítrico ($NO\bullet$) é gerado pela oxidação da arginina em citrulina pelo óxido nítrico sintase (NOS). O NO tem vários papéis metabólicos importantes, como o processo de vasodilatação. No entanto, o acúmulo do radical também pode trazer problemas para os constituintes celulares (Droge, 2002).

Os danos causados por desequilíbrios na produção e neutralização desses radicais são mensurados por alguns marcadores. Um exemplo é o malondialdeído, que é o produto da peroxidação lipídica iniciada pela ação destes radicais livres. O malondialdeído se acumula na célula podendo ser mensurado e indicar um processo de dano (Rahal et al., 2014). Outro marcador é o acúmulo de proteínas carboniladas, geradas a partir de reações com radicais que resultam na oxidação de resíduos de lisina, arginina, prolina e treonina. O processo de oxidação gera derivados carbonilados que podem gerar danos ao processo de transcrição e atividade mitocondrial (Hauck et al., 2018).

No sistema reprodutor masculino, o estresse oxidativo pode causar danos ao DNA das células germinativas e gerar espermatozoides defeituosos, que são extremamente susceptíveis aos danos dos radicais livres (Aitken et al., 2009). Mudanças no estilo de vida, incluindo a prática de exercícios físicos, podem contribuir para uma maior atividade antioxidante e proteger as células germinativas dos danos causados pelo estresse (Bish et al., 2017).

3.4 *Treinamento físico resistido*

O exercício físico é uma forma econômica e efetiva na diminuição da mortalidade em decorrência de doenças vasculares (Moraes-Silva et al., 2017). Diversos tipos e variações de exercícios físicos são conhecidos, como os exercícios aeróbicos e de flexibilidade. Após a prática de exercício físico, os níveis de pressão arterial diminuem e se mantêm baixos por um período posterior ao da prática física. A hipotensão pós-exercício é um fenômeno estudado para a hipertensão arterial sistêmica e que pode vir a ocorrer, também, com a HAP (Laterza et al., 2007). Entre os diferentes tipos de exercícios físicos, destacamos o treinamento físico resistido (TFR), praticado com o intuito de aumento dos níveis de hipertrofia muscular.

O TFR é reconhecido e recomendado como uma ferramenta benéfica para a saúde (Pollock et al., 2000), sendo que a *American Heart Association* aprova a sua inclusão como parte de um programa de exercícios para a promoção da saúde e prevenção de doenças cardiovasculares (Pollock et al., 2000; Braith e Stewart, 2006). O TFR promove efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular e pode, potencialmente, ser um tratamento eficaz para várias condições clínicas. O exercício consiste em um método especializado de condicionamento que utiliza cargas resistivas, como o próprio peso corporal, pesos e halteres (Stricker et al., 2020).

Vários estudos já mostraram os efeitos benéficos do TFR para a saúde humana. A prática do TFR melhora parâmetros cardiovasculares, na composição corporal, perfis de lipídios

no sangue, além da hipertrofia muscular (Faigenbaum e Myer, 2009; Lauersen et al., 2018;). Para o sistema reprodutor masculino, o TFR tem demonstrado ser benéfico para parâmetros espermáticos, diminuindo a presença de EROs no sêmen, marcadores inflamatórios como citocinas, aumentando a presença de enzimas antioxidantes no sêmen e melhorando a motilidade, morfologia e concentração espermática (Maleki et al., 2017; Maleki e Tartibian, 2018).

4. Referências bibliográficas

- Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., McLachlan, R. I. 2009. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *International Journal Of Andrology*, 32(1), 46-56. doi: 10.1111/j.1365-2605.2008.00943.x
- Amann, R. P. 2008. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit?. *Journal of andrology*, 29(5), 469-487. doi: 10.2164/jandrol.107.004655
- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., Dada, R. 2017. Oxidative stress and male infertility. *Nature Reviews Urology*, 14(8), 470-485. doi: 10.1038/nrurol.2017.69.
- Braith, R. W., Stewart. J. K., 2006. Resistance Exercise Training: Its Role in the Prevention of Cardiovascular Disease. *Circulation*, 113(22), 2642–2650. doi:10.1161/circulationaha.105.584060
- Brittain, E. L., Talati, M., Fessel, J. P., Zhu, H., Penner, N., Calcutt, M. W., Hemnes, A. R., 2016. Fatty Acid Metabolic Defects and Right Ventricular Lipotoxicity in Human Pulmonary Arterial Hypertension Clinical Perspective. *Circulation*, 133(20), 1936–1944. doi:10.1161/circulationaha.115.019351
- Chen, R., Jiang, M., Li, B. O., Zhong, W., Wang, Z., Yuan, W., Yan, J. 2018. The role of autophagy in pulmonary hypertension: a double-edge sword. *Apoptosis*, 23(9), 459-469. doi: 10.1007/s10495-018-1477-4.

- Cheng, C. Y., Mruk, D. D. 2012. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological reviews*, 64(1), 16-64.
- Colli, L. G., Belardin, L. B., Echem, C., Akamine, E. H., Antoniassi, M. P., Andretta, R. R., Mathias, L. S., Rodrigues, S. F. P., Bertolla, R. P., Carvalho, M. H. C., 2019. Systemic arterial hypertension leads to decreased semen quality and alterations in the testicular microcirculation in rats. *Scientific Reports*, 9:11047.
- Coons, J. C., Pogue, K., Kolodziej, A. R., Hirsch, G. A., George, M. P., 2019. Pulmonary Arterial Hypertension: a Pharmacotherapeutic Update. *Current Cardiology Reports*, 21(11). Doi:10.1007/s11886-019-1235-4
- Droge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001.
- Faigenbaum, A. D., Myer, G. D. 2009. Resistance training among young athletes: safety, efficacy and injury prevention effects. *British journal of sports medicine*, 44(1), 56-63. doi: 10.1136/bjism.2009.068098
- Fijak, M., Meinhardt, A. 2006. The testis in immune privilege. *Immunological reviews*, 213(1), 66-81.
- França, L. R., Hess, R. A., Dufour, J. M., Hofmann, M. C., Griswold, M. D. 2016. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology*, 4(2), 189-212. doi: 10.1111/andr.12165
- Gao, F., Li, G., Liu, C., Gao, H., Wang, H., Liu, W., Li, W. 2018. Autophagy regulates testosterone synthesis by facilitating cholesterol uptake in Leydig cells. *Journal of Cell Biology*, 217(6), 2103-2119. doi: 10.1083/jcb.201710078
- Glick, D., Barth, S., Macleod, K. F. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal Of Pathology*, 221(1), 3-12. doi: 10.1002/path.2697

- Gomez-Arroyo, J. G., Farkas, L., Alhussaini, A. A., Farkas, D., Kraskauskas, D., Voelkel, N. F., Bogaard, H. J., 2012. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 302(4), L363–L369. doi:10.1152/ajplung.00212.2011
- Hauck, A. K., Huang, Y., Hertzler, A. V., Bernlohr, D. A. 2018. Adipose oxidative stress and protein carbonylation. *Journal of Biological Chemistry*, 294(4), 1083-1088. doi: 10.1074/jbc.r118.003214
- Heinrich, A., DeFalco, T., 2019. Essential Roles of Interstitial Cells in Testicular Development and Function. *Andrology*. doi:10.1111/andr.12703
- Hermes-Lima, M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional metabolism: regulation and adaptation*, 319-368.
- Hermo, L., Pelletier, R. M., Cyr, D. G., Smith, C. E. 2010. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: Background to Spermatogenesis, Spermatogonia, and Spermatocytes. *Microscopy research and technique*, 73(4), 409-494. doi: 10.1002/jemt.20783.
- Hernández-Gea, V., Baiges, A., Turon, F., Garcia-Pagán, J. C. 2018. Idiopathic portal hypertension. *Hepatology*, 68(6), 2413-2423. doi: 10.1002/hep.30132.
- Herrmann, S. M., Textor, S. C. 2019. Renovascular hypertension. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 48(4), 765-778. doi: 10.1016/j.ecl.2019.08.007.
- Holdcraft, R. W., Braun, R. E. 2004. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development*, 131(2). 459-467. doi: 10.1242/dev.00957
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., (2004) Aparelho reprodutor Masculino. In: Junqueira, L. C.; Carneiro, J. *Histologia Básica. Texto e Atlas*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 10 ed, p:415-431, 2004.

- Kaprara, A., Huhtaniemi, I. T. 2018. The hypothalamus-pituitary-gonad axis: tales of mice and men. *Metabolism*, 86, 3-17. doi: 10.1016/j.metabol.2017.11.018.
- Klionsky, D. J., 2005. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *Journal of Cell Science*, 118(1), 7–18. doi:10.1242/jcs.01620
- Laterza, M. C., Rondon, M. U. P. B., Negrão, C. E. 2007. Efeito anti-hipertensivo do exercício. *Rev Bras Hipertens*, 14(2), 104-11.
- Lauersen, J. B., Andersen, T. E., Andersen, L. B. 2018. Strength training as superior, dose-dependent and safe prevention of acute and overuse sports injuries: a systematic review, qualitative analysis and meta-analysis. *British Journal Of Sports Medicine*, 52(24), 1557-1563. doi: 10.1136/bjsports-2018-099078.
- Leblond, C. P., Clermont, Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 55(4), 548-573.
- Malenfant, S., Brassard, P., Paquette, M., Le Blanc, O., Chouinard, A., Nadeau, V., Provencher, S., 2017. *Compromised Cerebrovascular Regulation and Cerebral Oxygenation in Pulmonary Arterial Hypertension*. *Journal of the American Heart Association*, 6(10), e006126. doi:10.1161/jaha.117.006126
- Maleki, B. H., Tartibian, B., Chehrazi, M. 2017. Effects of aerobic, resistance, and combined exercise on markers of male reproduction in healthy human subjects: a randomized controlled trial. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 33(4), 1130-1145. doi: 10.1519/jsc.0000000000002389.
- Maleki, B. H., Tartibian, B. 2018. Resistance exercise modulates male factor infertility through anti-inflammatory and antioxidative mechanisms in infertile men: A RCT. *Life Sciences*, 203, 150-160. doi: 10.1016/j.lfs.2018.04.039.
- Miller, W. L. 2017. Steroidogenesis: unanswered questions. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(11), 771-793. doi: 10.1016/j.tem.2017.09.002.

- Mizushima, N., Komatsu, M. 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147(4), 728-741. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026.
- Moraes-Silva, I. C., Mostarda, C. T., Silva-Filho, A. C., Irigoyen, M. C. 2017. Hypertension and exercise training: evidence from clinical studies. In *Exercise for Cardiovascular Disease Prevention and Treatment* (pp. 65-84). Springer, Singapore.
- Murrow, L., Debnath, J. 2013. Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 8, 105-137.
- Navarro, R. D., Paula, T. A. R. D., Matta, S. L. P. D., Fonseca, C. C., Neves, M. T. D. D. 2004. Efeito da exposição pré e pós-natal ao ultra-som de baixa intensidade sobre a célula de Leydig e demais componentes do espaço intertubular do testículo de camundongos adultos. *Revista Ceres*. 296 (111). 445-455.
- Nickel, N., Perez, V. A. de J., Fessel, J. P., Cogan, J., Hamid, R., West, J. D., Austin, E., 2019. Low-Grade Albuminuria in Pulmonary Arterial Hypertension. *Pulmonary Circulation*, 204589401882456. doi:10.1177/2045894018824564
- Nickel, N. P., Yuan, K., Dorfuller, P., Provencher, S., Lai, Y., Bonnet, S., Austin, E. D., Koch, C. D., Morris, A., Perros, F., Montani, D., Zamania, R. T., Perez, V. A. J., 2019. Beyond the Lungs: Systemic Manifestations of Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 201 (2): 148-157.
- Oparil, Suzanne *et al.* 2018. Hypertension. *Nature Reviews Disease Primers*. 4(1), 1-48. doi: 10.1038/nrdp.2018.14.
- Pan, T., Zhang, L., Miao, K., Wang, Y., 2020. A crucial role of endoplasmic reticulum stress in cellular responses during pulmonary arterial hypertension. *Am J Transl Res*. 12(5): 1481–1490.

- Papadopoulos, V., Miller, W. L. 2012. Role of mitochondria in steroidogenesis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 26(6), 771-790. doi: 10.1016/j.beem.2012.05.002.
- Persson, T., Popescu, B. O., Cedazo-Minguez, A., 2014. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Why Did Antioxidant Therapy Fail? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1–11. doi:10.1155/2014/427318
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Bitto, A., 2017. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–13. doi:10.1155/2017/8416763
- Pollock, M. L., Franklin, B. A., Balady, G. J., Chaitman, B. L., Fleg, J. L., Fletcher, B., Bazzarre, T., 2000. Resistance Exercise in Individuals With and Without Cardiovascular Disease : Benefits, Rationale, Safety, and Prescription An Advisory From the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, American Heart Association. *Circulation*, 101(7), 828–833. doi:10.1161/01.cir.101.7.828
- Racanelli, A. C., Kikkers, S. A., Choi, A. M., Cloonan, S. M. 2018. Autophagy and inflammation in chronic respiratory disease. *Autophagy*, 14(2), 221-232. doi: 10.1080/15548627.2017.1389823
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K. 2014. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Research International*, 2014. 1-19. doi: 10.1155/2014/761264.
- Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E. N., Lakshminarasiah, U., ... Nishigaki, I. 2014. Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*, 436, 332-347. doi: 10.1016/j.cca.2014.06.004.
- Russell, L. D., Ettlin, R. A., Hikim, A. P. S., Clegg, E. D. 1993. Histological and histopathological evaluation of the testis.

- Russell, L. D., De França, L. R. 1995. Building a testis. *Tissue and Cell*, 27(2), 129-147.
- Simonneau, G., Gatzoulis, M. A., Adatia, I., Celermajer, D., Denton, C., Ghofrani, A., Souza, R., 2013. Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(25), D34–D41. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.029
- Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D. S., Denton, C. P., Gatzoulis, M. A., Krowka, M., Souza, R., 2018. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*, 1801913. doi:10.1183/13993003.01913-2018
- Smith, B. E., Braun, R. E. 2012. Germ cell migration across Sertoli cell tight junctions. *Science*, 338(6108), 798-802. doi: 10.1126/science.1219969.
- Stricker, P. R., Faigenbaum, A. D., McCambridge, T. M. 2020. Resistance training for children and adolescents. *Pediatrics*, 145(6). doi: 10.1542/peds.2020-1011
- Tan, B. L., Norhaizan, M. E., Liew, W. P. P. 2018. Nutrients and oxidative stress: friend or foe?. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2018. 1-24. doi:10.1155/2018/9719584
- Thenappan, T., Ormiston, M. L., Ryan, J. J., Archer, S. L. 2018. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *BMJ*, 360. 1-27. doi: 10.1136/bmj.j5492.
- Zhu, Y., Yin, Q., Wei, D., Yang, Z., Du, Y., Ma, Y. 2019. Autophagy in male reproduction. *Systems biology in reproductive medicine*, 65(4), 265-272. doi: 10.1080/19396368.2019.1606361.
- Zimmer, A., Teixeira, R. B., Bonetto, J. H. P., Siqueira, R., Carraro, C. C., Donatti, L. M., Belló-Klein, A., 2017. Effects of aerobic exercise training on metabolism of nitric oxide and endothelin-1 in lung parenchyma of rats with pulmonary arterial hypertension. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 429(1-2), 73–89. doi:10.1007/s11010-016-2937-1
- Zirkin, B. R., Papadopoulos, V. 2018. Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biology Of Reproduction*, 99(1), 101-111. doi: 10.1093/biolre/iy059.

CAPÍTULO 2

1. Introdução

A hipertensão pulmonar é uma doença crônica, progressiva e com várias origens, desde as doenças cardíacas quanto a problemas na artéria pulmonar. O prognóstico dessa doença é geralmente desfavorável, desenvolvendo uma disfunção direta do coração. A patologia da doença consiste na sobrecarga do coração devido a uma resistência na passagem do sangue pelas veias e artérias dos pulmões, promovendo um aumento da pressão sanguínea. Em condições saudáveis, quando há uma necessidade maior de oxigenação corporal, os vasos sanguíneos dos pulmões conseguem regular seu diâmetro, permitindo uma passagem maior de sangue e, conseqüentemente, aumentando as trocas gasosas no local. Todavia, na condição patológica da hipertensão pulmonar, esses vasos não apresentam essa característica, o que dificulta a passagem do sangue e resulta na necessidade de um bombeamento maior do coração, com aumento da pressão sanguínea (Stenmark et al., 2009; Montani et al., 2013; Guazzi e Naeije, 2017). Com todas as suas formas variantes, estima-se que a doença afete até 100 milhões de pessoas em todo o mundo (Simonneau et al., 2018; Schermuly et al., 2011).

Modelos murinos têm sido amplamente utilizados para avaliar os efeitos da hipertensão arterial pulmonar (HAP) e possíveis tratamentos (Stenmark et al., 2009). A HAP pode ser induzida experimentalmente por hipóxia ou por uso de drogas e toxinas, como a monocrotalina. Animais com HAP induzida por hipóxia apresentaram uma redução no volume do fluxo das artérias pulmonares devido ao estreitamento do lúmen e espessamento da parede, sem envolver vasoconstrição. Esse espessamento ocorre pelo aumento de colágeno na parede arterial de grandes artérias pulmonares, em resposta a eventos inflamatórios iniciais desencadeados pela indução e também presente nesta doença (Tozzi et al., 1994; Tabima e Chesler, 2010; Schermuly et al., 2011). Uma vez induzida a inflamação, as células vasculares

pulmonares produzem quimiocinas e citocinas que, por sua vez, recrutam células inflamatórias, como macrófagos, células dendríticas, mastócitos, células B e células T reguladoras. Sob coordenação dos mediadores inflamatórios, estas células contribuem para a liberação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Ao final, esses processos levam à remodelação vascular por remodelação da matriz, deposição de colágeno, proliferação de células vasculares, migração e trombose (Schermuly et al., 2011). Níveis reduzidos de óxido nítrico (ON), importante vasodilatador e antiproliferativo, e de monofosfato de guanosina cíclico também são descritos na doença vascular pulmonar (Moudgil et al., 2006; Schermuly et al., 2011). Estes eventos combinados induzem aumentos nos índices de autofagia, que já sabe-se ser um processo intimamente relacionado com a progressão da HAP (Ornatowski et al., 2020).

A doença HAP ainda não tem cura. Por isso, tratamentos têm sido propostos com o intuito de diminuir a pressão arterial pulmonar, minimizando danos aos pulmões e coração, utilizando principalmente medicamentos com potencial vasodilatador (Coons et al., 2019). Adicionalmente, o treinamento físico resistido (TFR) é reconhecido e recomendado como uma ferramenta complementar benéfica para a saúde de pacientes com HAP (Pollock et al., 2000). O TFR consiste em uma atividade onde cada força de ação é executada contra uma força de oposição específica. De acordo com De Sousa et al. (2017), estudos usando modelos de hipertensão arterial sistêmica em animais de laboratório e humanos relataram efeitos benéficos do TFR, como aumento na produção de ON e relaxamento dependente do endotélio. No caso de pacientes com hipertensão arterial grave, por exemplo, houve uma diminuição da pressão arterial, preservação da função cardíaca e aumento da força máxima após o TFR (De Sousa et al., 2017).

Não obstante, a fertilidade masculina e a saúde do homem são fatores correlatos. Diversos trabalhos vêm demonstrando relação entre a ocorrência de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares e alterações metabólicas com baixas taxas de fertilidade e redução na

qualidade do sêmen. De fato, o estilo de vida interfere negativamente em parâmetros reprodutivos (Sharpe e Franks, 2002; Craig et al., 2017; Deng et al., 2018; Colli et al., 2019; Martins et al., 2019). Ainda não há trabalhos que avaliem os efeitos da HAP nos órgãos reprodutores, destacando-se os testículos e epidídimos, que estão diretamente associados à produção e qualidade dos espermatozoides, bem como à fertilidade masculina. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da HAP sobre parâmetros morfológicos e funcionais testiculares. Além disso, foi avaliado se o TFR minimiza os possíveis efeitos negativos causados pela HAP no testículo.

2. Materiais e métodos

2.1 Animais

Ratos Wistar machos (n = 32, 60 dias de idade) foram fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os animais foram alocados em gaiolas de polipropileno, quatro animais por gaiola, onde receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos em temperatura e fotoperíodo controlados (22 °C, 12h claro/escuro). Quantidade adequada de raspas de madeira foram depositadas como cama para os animais, sendo trocadas periodicamente. Os ratos passaram por uma semana de aclimação antes do início do experimento. Este estudo foi realizado em estrita conformidade com as recomendações do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). Todos os procedimentos experimentais foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética e Uso de Experimentação Animal da UFV (processo CEUA número 38/2021).

2.2 Design experimental

Os animais experimentais foram divididos, aleatoriamente, em quatro grupos experimentais (n = 8 animais/grupo). Primeiramente, realizou-se a indução da HAP em 16

animais. A HAP foi induzida utilizando-se duas injeções intraperitoniais de monocrotalina (20 mg/kg de peso corporal; 0,5 mL) dissolvida em solução salina, havendo um intervalo de uma semana entre as doses (Benoist et al., 2014; Soares et al., 2019). Os animais saudáveis que não foram submetidos a este protocolo receberam doses equivalentes de solução salina (0,5 mL) nas mesmas datas. Este procedimento visa fazer com que todos os animais sejam submetidos às mesmas condições de estresse na manipulação.

Após as duas doses de monocrotalina, os animais foram distribuídos entre os grupos para início do período experimental. O Grupo 1 foi composto por animais saudáveis que não praticaram exercício físico (controle sedentário), enquanto animais do Grupo 2 foram submetidos à indução experimental da HAP por MCT e não praticaram exercício físico (HAP sedentário). Adicionalmente, os Grupos 3 e 4 compreenderam, respectivamente, animais saudáveis (controle TFR) e hipertensos (HAP + TFR) que foram submetidos ao TFR durante 30 dias.

No 28º dia após a primeira injeção de monocrotalina foi realizada a análise ecocardiográfica, para avaliar a função cardíaca. Para isso, os animais foram anestesiados (Isoflurano 1,5% e oxigênio 100% com fluxo constante de 1L/min), sendo as imagens obtidas enquanto os animais permaneceram em decúbito lateral. Estudos bidimensionais com uma taxa de amostragem rápida de 120 fps no modo M foram realizados usando o sistema de ultrassom MyLabTM30 (Esaote, Genoa, Itália) e transdutores de frequência nominal de 11 MHz. A ecocardiografia transtorácica bidimensional e modo M foram obtidas em uma velocidade de varredura de 200 mm ajustada de acordo com a frequência cardíaca. Para caracterizar a HAP, foi determinada a excursão sistólica do plano anular tricúspide (Soares et al., 2019).

2.3 Protocolo do TFR

Durante uma semana, antes da indução da HAP nos grupos, os animais dos Grupos 3 e 4 foram treinados seguindo o protocolo de TFR (adaptado de Hornberger e Farrar, 2004). Para isso, utilizou-se uma escada de 1,1 m de altura e com inclinação de 80°, onde os animais subiam três vezes, com intervalos de repouso de 2 minutos e carga máxima determinada a partir de um teste previamente realizado. Neste último, o teste consistiu em subir escadas com carga inicial de 75% do peso corporal, que foi progressivamente aumentado em mais 15% nas subidas subsequentes até que o animal não conseguisse mais subir. Esta carga foi fixada na cauda do rato. As subidas foram intercaladas com intervalos de descanso de 1 minuto. A carga máxima de suporte foi usada como índice de tolerância ao esforço físico. Os animais exercitados foram submetidos a um programa de TFR, 5 vezes/semana durante o período experimental até o dia anterior à eutanásia. A carga de TFR foi de 55-65% da carga máxima de suporte, seguindo as recomendações para pacientes com doenças cardiovasculares. Cada sessão de treinamento consistiu em 15 subidas intercaladas com intervalo de 1 minuto.

2.4 Eutanásia e coleta de material

Após o período experimental, os animais foram pesados e eutanasiados por decapitação. Em seguida, o sangue foi coletado para determinação da concentração sérica de testosterona. Após abertura da cavidade abdominal, os testículos foram removidos, dissecados e pesados. O órgão do lado esquerdo foi direcionado para análises biométricas, histológicas e estereológicas. Já o testículo direito foi congelado em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C, para análises enzimáticas e bioquímicas. Outros órgãos do sistema reprodutor masculino, como epidídimos, próstata ventral e vesícula seminal, foram retirados para análise biométrica.

2.5 Determinação da concentração sérica de testosterona

O sangue coletado no momento da eutanásia (n = 5/grupo) foi centrifugado a 2.000 xg por 15 min, e o soro armazenado a -80 ° C para posterior uso na quantificação da testosterona sérica (Souza et al., 2016). Esta quantificação foi realizada no Laboratório Veterinário da Tecsa[®] (Belo Horizonte/Brasil), utilizando-se a metodologia de quimioluminescência. Os resultados foram expressos em nanogramas por decilitro (ng/dL).

2.6 *Biometria corporal e dos órgãos reprodutores*

Através da subtração dos valores de peso final pelo valor do peso inicial dos animais, obtivemos a média de ganho de peso dos animais (n = 8/grupo). Testículos, epidídimos, próstata ventral e vesícula seminal (n = 8/grupo) foram pesados em balança analítica (0.0001g; BEL Mark 160) para obtenção do peso absoluto. O peso relativo de cada órgão foi obtido pela multiplicação do peso absoluto por 100, sendo o resultado dividido pelo peso final do animal. Posteriormente, a túnica albugínea do testículo esquerdo foi retirada para obtenção do peso do parênquima testicular.

2.7 *Determinação de colesterol, triglicérides e glicose no tecido testicular*

Fragmentos de testículo congelados (100mg; n = 5/grupo) foram diluídos (1: 1) em 100 µL de tampão fosfato (pH 7.4) e centrifugados a 15.000g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a determinação de colesterol, triglicérides e glicose testicular. Todos os ensaios foram realizados utilizando-se kit específico (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante.

Para determinação do colesterol, o princípio do ensaio baseou-se na ação da lipoproteína lipase, que hidrolisa ésteres de colesterol, resultando em colesterol livre e ácidos graxos. A oxidação enzimática subsequente libera peróxido de hidrogênio e colesterol-4-en-

ona. O peróxido é medido por uma reação cromogênica na presença de peroxidase. A substância cromogênica tem absorvância máxima no comprimento de onda de 500 nm, sendo a intensidade da cor proporcional à concentração de colesterol na amostra. A determinação de triglicérides também se baseia na ação da lipoproteína lipase, que promove a hidrólise dos triglicérides liberando glicerol, que é convertido, pela ação da glicerolquinase, em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e p-clorofenol, catalisada pela peroxidase, originando um composto de cor cereja, cuja intensidade da cor foi medida a 500 nm e é proporcional a concentração de triglicérides. Por último, a determinação de glicose considerou a atividade da glicose oxidase, que oxida a glicose gerando ácido glucónico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, na presença da peroxidase reage com a 4-aminoantipirina e fenol, formando um cromógeno vermelho cereja cuja intensidade de cor foi medida a 505 nm e é proporcional à concentração de glicose.

2.8 Avaliação de marcadores de estresse oxidativo

Amostras de testículos congelados (100 mg; n = 5/grupo) foram separadas, homogeneizadas em tampão fosfato (1 mL; pH 7.4) e centrifugadas a 15.000g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi separado para análises de enzimas antioxidantes, metabólitos do estresse oxidativo e capacidade antioxidante total (FRAP). Já o *pellet* foi utilizado na determinação de proteína carbonilada. Estas análises foram realizadas em um leitor de microplaca ELISA (Multiskan GO, Thermo Scientific) ou em espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu).

Com relação aos ensaios enzimáticos, a atividade da superóxido dismutase (SOD) foi estimada pelo método do pirogalol, com base na capacidade desta enzima em catalisar as

reações de superóxido e peróxido de hidrogênio, de como descrito por Dieterich et al. (2000). A atividade da enzima foi calculada como unidades (U) por miligrama de proteína, onde um U da enzima é definido como a quantidade que inibiu a taxa de autoxidação do pirogalol em 50%. A atividade da catalase (CAT) foi avaliada medindo-se a taxa de decomposição do H_2O_2 , de acordo com o descrito por Aebi (1984). Uma unidade de atividade da CAT foi definida como a quantidade da enzima que se decompõe por 1 min. A atividade de CAT foi calculada como U por miligrama de proteína. Finalmente, a atividade da glutathione-s-transferase (GST) foi estimada em espectrômetro conforme descrito por Habig et al. (1974), e testado de acordo com a formação de 2,4-dinitroclorobenzeno conjugado com glutathione (CDNB). O coeficiente de extinção molar usado para CDBN foi $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Uma unidade de atividade de GST foi definida como a quantidade da enzima que catalisou a formação de um μmol de produto $\times \text{min}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$. A atividade de GST foi expressa como U por miligrama de proteína.

A concentração de ON foi mensurada através do reativo de Griess (1 % de sulfanilamida e 0,1 % naftil-etileno-diamina em 2,5 % H_3PO_4). Neste ensaio, a quantidade de nitrito foi determinada nas amostras e utilizada como indicador da síntese de ON. O sobrenadante das amostras foi adicionado com igual volume do Reativo de Griess e placas de leitura, incubado e em seguida realizado a determinação das absorbâncias em leitor de microplacas. O nível de ON das amostras de testículo foi determinado através da curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (Tsikas, 2007).

O conteúdo de malondialdeído (MDA) nas amostras foi determinado conforme metodologia descrita por Buege e Aust (1978). O sobrenadante do tecido foi misturado, em igual proporção, com solução de ácido tricloroacético (15%)/ácido clorídrico (0,25 M)/ácido tiobarbitúrico (0,375%). A mistura reacional total foi mantida em banho-maria em ebulição ($\sim 90^\circ\text{C}$) durante 40 minutos. Após a retirada do banho maria, as amostras foram refrigeradas

sobre placa de gelo e adicionou-se álcool butílico. A mistura foi levada ao vórtex para homogeneização. A amostra foi levada à centrifuga e o sobrenadante retirado para análise. Os níveis totais de MDA em cada amostra foi determinado por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMPO). Finalmente, os grupos carbonila nas proteínas foram mensurados segundo descrito por Levine et al. (1994). Os pellets dos homogenatos teciduais foram utilizados. Os danos às proteínas foram determinados baseados nos grupos carbonila da reação com DNPH e mensurados em leitor de microplacas.

A capacidade antioxidante total (FRAP) foi determinada pelo método descrito por Benzie e Strain (1996). O FRAP consiste em uma dosagem colorimétrica baseada no princípio de redução do complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) em tripiridiltriazina ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ) pelos antioxidantes de uma amostra. A reação foi realizada adicionando 10 μ L de amostra, ou padrão, com 220 μ L da solução de FRAP em microplacas. A mistura foi incubada no escuro por 30 minutos, e levadas ao leitor de microplacas.

2.9 Processamento histológico dos testículos

Testículos esquerdos foram imersos em solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2) por 24 horas (Karnovsky, 1965). Fragmentos do órgão fixado ($n = 6$ /grupo) foram desidratados em séries crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100%) e incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin[®], Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha). Cortes semi seriados de 1 ou 3 μ m de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo (RM 2255, Leica, Nussloch, Alemanha). Os cortes de 3 μ m foram corados com azul de toluidina/borato de sódio (1%) e montados com Entellan (Merck, Alemanha), enquanto os cortes com 1 μ m foram destinados a análise de viabilidade celular e montados com glicerina.

2.10 Contagem de túbulos seminíferos normais e patológicos

A análise histológica foi realizada através da observação de 200 túbulos seminíferos por animal, totalizando 1.200 túbulos analisados por grupo (adaptado de Johnsen, 1970; Dias et al., 2019). Os achados patológicos foram agrupados em três níveis. No *nível 1*, os túbulos seminíferos não apresentaram alterações, sendo compostos por epitélio germinativo padrão, com células dispostas em camadas, não havendo presença de vacúolos, descamação ou células germinativas no lúmen dos túbulos. No *nível 2*, os túbulos seminíferos apresentam vacúolos entremeando as células germinativas, consideramos o nível 2 como patologias de grau leve. Já o *nível 3*, foi marcado por túbulos contendo células germinativas no lúmen e descamação do epitélio seminífero, sendo considerado um grau moderado de achados patológicos. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem.

2.11 Análise estereológica e morfométrica testicular

A análise estereológica e morfométrica do testículo foi realizada por meio do software Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Para estimar a proporção dos componentes do parênquima testicular, foi utilizada uma grade com 266 interseções em 10 imagens aleatórias do parênquima testicular de cada animal, obtidas em um microscópio de campo claro (Olympus BX-53, Tóquio, Japão) equipado com uma câmera digital (Olympus DP73, Tóquio, Japão), totalizando 2.660 pontos por animal e 15.960 pontos por grupo. Pontos de correspondência na túnica própria, epitélio seminífero e lúmen (juntos formando o compartimento tubular) e pontos no espaço intertubular foram registrados. O percentual de pontos em cada componente foi calculado pela fórmula:

$$\text{Proporção volumétrica (\%)} = \frac{\text{número de pontos na estrutura de interesse}}{\text{pontos totais (2.660 por animal)}} \times 100$$

O volume foi considerado igual ao peso do parênquima (Tae et al., 2005). O diâmetro tubular médio, a altura do epitélio e o diâmetro luminal (μm) foram obtidos em 30 cortes transversais de túbulos seminíferos por animal, sendo utilizado a média de duas retas opostas (formando ângulo de 90° na intersecção), utilizando os túbulos de contorno o mais circular (Johnson e Neaves, 1981).

A proporção volumétrica dos componentes do intertúbulo foi obtida pela contagem de 1.000 pontos nas imagens do compartimento intertubular por animal, totalizando 6.000 pontos por grupo. Os pontos foram contados no núcleo e citoplasma da célula de Leydig, espaço linfático, vasos sanguíneos, macrófagos e tecido conjuntivo. O percentual de pontos em cada componente foi calculado pela fórmula:

$$\begin{aligned} & \textit{Proporção do componente intertubular de interesse (\%)} \\ & = \frac{\textit{número de pontos no componente de interesse}}{\textit{pontos totais (1000 por animal)}} \times 100 \end{aligned}$$

Análises estereológicas das células de Leydig também foram realizadas. O diâmetro nuclear de 30 células de Leydig foi medido em aumento de 400x, permitindo o cálculo do volume ocupado por seu núcleo e citoplasma, bem como o volume total das células. O volume do núcleo de Leydig foi obtido por meio do diâmetro nuclear médio e da fórmula:

$$\textit{Volume nuclear de Leydig (\mu m^3)} = \frac{4}{3} \pi R^3$$

$R = \textit{diâmetro nuclear}/2$.

O volume celular de Leydig foi estimado pela adição entre os volumes nucleares e citoplasmáticos (Russell et al., 1990; Dias et al., 2020). A partir dos cálculos apresentados por

Dias et al. (2020), foi possível obter o número total de células de Leydig no testículo dividindo o volume total ocupado pelas células de Leydig no parênquima testicular pelo volume individual de uma célula de Leydig.

2.12 Contagem de células germinativas no epitélio seminífero

As contagens de células germinativas e de células de Sertoli foram realizadas em seções de túbulos seminíferos no estágio 1 do ciclo da espermatogênese (Amann e Schanbacher, 1983). Em 20 seções de túbulos seminíferos, o número de espermatogônias do tipo A (SgA), espermatócitos primários em preleptoteno/leptoteno (PLL), espermatócitos primários em paquíteno (Paq), o número de espermatídes arredondadas (EAR) e o número de células de Sertoli (Ser) foram contados. Para obter o número corrigido dessas células, o diâmetro do núcleo, ou nucléolo no caso das células de Sertoli, foi medido em 30 células de cada tipo e pela fórmula descrita por Amann e Almquist (1962), obteve-se o número corrigido de células do epitélio germinativo. Posteriormente, foi possível calcular o número de células germinativas do epitélio (n° de células germinativas = n° SgA + n° PLL + n° Paq + n° EAR), índice mitótico ($\frac{n^\circ PLL}{n^\circ SgA}$), índice meiótico ($\frac{n^\circ EAR}{n^\circ Paq}$), índice de células de Sertoli ($\frac{n^\circ EAR}{n^\circ SgA}$), número de células de Sertoli por testículo ($\frac{\text{comprimento total de túbulos seminíferos (m)} \times n^\circ Ser}{\text{espessura do corte}}$), capacidade de suporte total da célula de Sertoli ($\frac{n^\circ SgA + n^\circ PLL + n^\circ Paq + n^\circ Ear}{n^\circ Ser}$) e rendimento da espermatogênese ($\frac{n^\circ Ear}{n^\circ SgA}$).

A produção espermática diária foi calculada usando a fórmula:

$$PED = \frac{\text{volume total de túbulos seminíferos} \times n^\circ Ear}{12,9 \times \text{área da secção transversal do túbulo no estadio 1} \times \text{espessura do corte}}$$

Onde 12,9 é a duração, em dias, do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar (Amann, 1961).

2.13 Análise de viabilidade das células testiculares

Secções histológicas de 1 μm foram coradas com corante duplo de laranja de acridina e iodeto de propídio (Lima et al., 2018) para avaliação das alterações morfológicas envolvendo danos de DNA, autofagia e apoptose celular. As imagens digitais foram capturadas pelo fotomicroscópio de fluorescência EVOS fl (Life Technologies, Carlsbad, Canadá). O laranja de acridina é um marcador fluorescente sem carga capaz de atravessar membranas plasmáticas em meio básico. Quando em meio de pH ácido, o marcador recebe prótons e passa a não conseguir atravessar membranas, se acumulando no local (Traganos et al., 1994). Diante dessa propriedade, o laranja de acridina é um marcador que tende a se acumular em organelas ácidas como o lisossomo, tornando-se um bom marcador de autofagossomos maduros (Thomé et al., 2016). Nas células marcadas com o acridina, os núcleos e citoplasmas tendem a fluorescer na cor verde enquanto compartimentos ácidos tendem a fluorescer na cor vermelha (Shin et al., 2012). Já o iodeto de propídio marca apenas células que perderam a integridade da membrana, pois é um marcador que não consegue atravessar membranas intactas. Na célula com membrana defeituosa, o iodeto se liga ao núcleo fluorescendo na cor vermelha (Aswathanarayan et al., 2017). Os critérios morfológicos utilizados para a classificação de células viáveis, células inviáveis e células com intensa atividade autofágica foram a cor do núcleo; verde indicava uma célula viável, amarelo início de um processo de dano e vermelho uma célula danificada, e a presença de fluorescência vermelha/alaranjada no citoplasma da célula (adaptado de Lima et al., 2018; Dias et al., 2019). As imagens digitalizadas foram enviadas para o programa Image J e as áreas reveladas com a dupla marcação laranja de acridina/iodeto de propídio foram selecionadas por meio da distribuição de cor como parâmetro discriminante. Uma grade com 266 interseções foi utilizada em dez imagens digitais por grupo para distinguir células viáveis/com dano inicial/danificadas e com presença ou ausência de autofagia, tanto no

compartimento intertubular quanto no compartimento tubular. Os valores obtidos foram transformados e apresentados em porcentagem.

2.14 *Análise estatística*

Os resultados foram submetidos a avaliação de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Como os animais hipertensos treinados apresentam duas condições fisiológicas diferentes dos animais do grupo controle, três Testes *t* de *Student* foram realizados em separado. Dessa forma, os dados dos animais do grupo hipertenso sedentário (HAP sedentário) foi comparado com os resultados do grupo controle sedentário, para avaliar se há efeitos da doença nos parâmetros analisados. Em seguida, outro Teste *t* de *Student* foi realizado entre os dados dos grupos controle sedentário e controle TFR, como forma de avaliar se o TFR pode, sozinho, causar alterações testiculares. Por fim, um último Teste *t* foi realizado entre os grupos HAP sedentário e HAP + TFR para avaliarmos se o treinamento físico foi capaz de minimizar os potenciais danos testiculares causados pela HAP. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., SanDiego, CA, USA). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média (D.P.M).

3. Resultados

3.1 *Validação do método de indução da HAP e efeito do TFR sobre parâmetros cardíacos*

O sucesso na indução da HAP em ratos Wistar foi analisado através dos valores de excursão sistólica do plano anular tricúspide. Os animais do grupo HAP sedentário exibiram valores menores do que os animais do grupo controle sedentário ($p < 0,05$; Fig. 1). Dados ecocardiográficos e histológicos também indicaram comprometimento do coração, confirmando o sucesso na indução da HAP (dados não mostrados). Animais do grupo HAP +

TFR apresentaram aumento da função ventricular em relação aos animais do grupo HAP sedentário ($p < 0,05$; Fig. 1).

3.2 Efeitos do TFR em parâmetros biométricos e testiculares de ratos saudáveis

A biometria corporal e peso de órgãos reprodutores masculinos, bem como morfometria e estereologia testicular não foram alterados entre animais saudáveis submetidos ou não ao TFR ($p > 0,05$; Tabela suplementar 1). Da mesma forma, a contagem de população de células germinativas, produção espermática diária, patologia do túbulo seminífero, análise de viabilidade celular e atividade autofágica não diferiram entre animais controle sedentários e animais controle TFR ($p > 0,05$; Tabela suplementar 1). Por fim, a maior parte dos dados bioquímicos e marcadores do estresse oxidativo também não foram alterados entre os grupos controle sedentário e controle TFR ($p > 0,05$; Tabela suplementar 1). Somente observou-se um aumento de ON e redução de glicose testicular em animais do grupo controle TFR comparado aos animais do grupo controle sedentário ($p < 0,05$; Tabela suplementar 1).

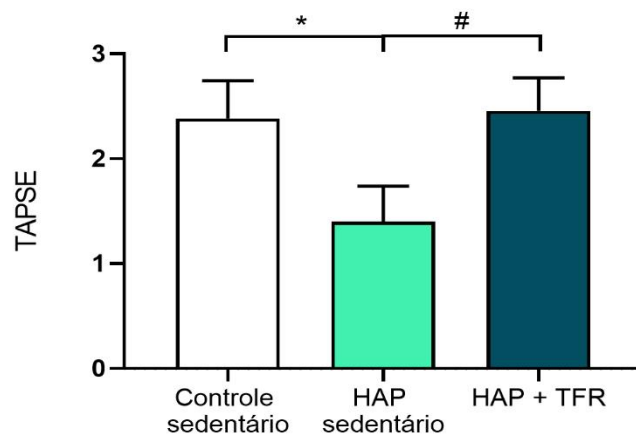
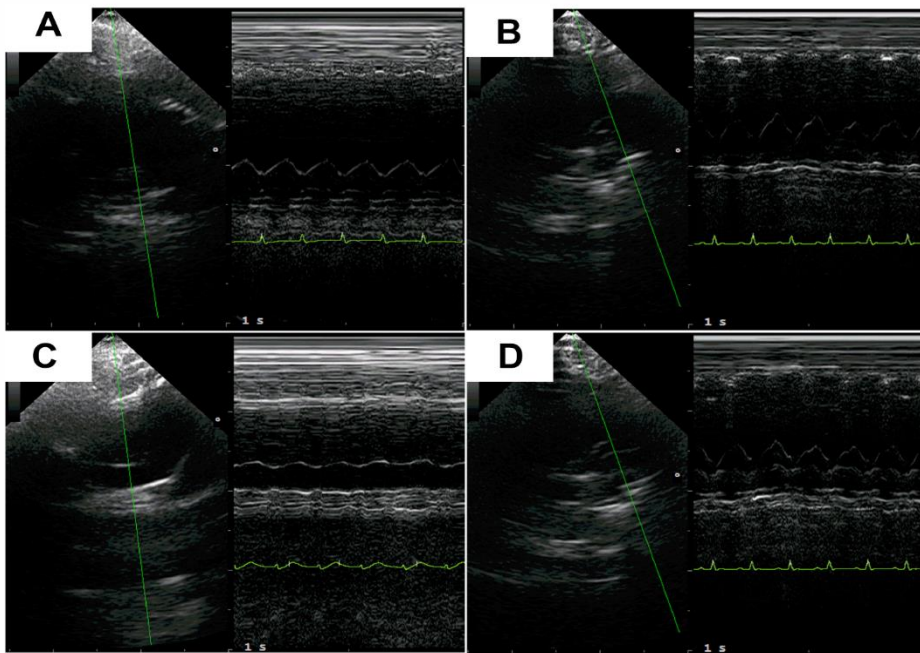


Figura 1: Efeitos da hipertensão arterial pulmonar (HAP) e do treinamento físico resistido (TFR) sob a função do ventrículo esquerdo, medido pela excursão sistólica do plano anular tricúspide (TAPSE). A análise ocorreu no 28º dia após as duas doses de injeções intraperitoneais de monocrotalina (20 mg/kg de peso corporal). A = grupo controle sedentário; B = controle TFR; C = HAP sedentário; D = HAP + TFR. (n = 7/ grupo). Valores expressos como média ± D.P.M. *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre animais do grupo controle sedentário e HAP sedentário pelo Teste t de *Student*. #Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos HAP sedentário e HAP + TFR pelo teste t de *Student*

3.3 Biometria corporal e de órgãos reprodutores em animais com HAP

Animais do grupo HAP sedentário apresentaram uma diminuição no ganho de peso corporal, com conseqüente diminuição do peso corporal final, quando comparados aos animais do grupo controle sedentário ($p < 0,05$; Tabela 1). O peso absoluto dos testículos, epidídimos e da próstata ventral também foi reduzido nos animais do grupo HAP sedentário comparados aos animais do grupo controle sedentário ($p < 0,05$; Tabela 1). Já os pesos relativos de testículo e epidídimo aumentaram em animais com HAP ($p < 0,05$; Tabela 1). O peso absoluto da vesícula seminal e os pesos relativos da próstata ventral e da vesícula seminal dos animais do grupo HAP sedentário não foram alterados comparados aos pesos dos animais do grupo controle sedentário ($p > 0,05$; Tabela 1).

Animais hipertensos submetidos ao TFR apresentaram um aumento no ganho de peso e no peso corporal final comparado com animais do grupo HAP sedentário ($p < 0,05$; Tabela 1). Igualmente, animais hipertensos que praticaram o TFR tiveram um aumento no peso absoluto do epidídimo e da próstata ventral, assim como no peso relativo da próstata ventral, comparado ao grupo HAP sedentário ($p < 0,05$; Tabela 1). Adicionalmente, a prática do TFR possibilitou uma diminuição do peso relativo do testículo e do epidídimo dos animais com HAP comparando-se aos dos animais com HAP sedentários ($p < 0,05$; Tabela 1). Por outro lado, os animais do grupo HAP + TFR não tiveram alterações no peso absoluto do testículo e da vesícula seminal, bem como o peso relativo da vesícula seminal, quando comparado aos animais do grupo HAP sedentário ($p > 0,05$; Tabela 1).

Tabela 1: Peso corporal e parâmetros biométricos de órgãos reprodutores masculinos de ratos Wistar saudáveis (controle sedentário) ou com hipertensão arterial pulmonar (HAP) induzida por monocrotalina, submetidos ou não ao treinamento físico de resistência (TFR).

Parâmetros	Controle sedentário	HAP sedentário	HAP + TFR
Peso corporal inicial (g)	204,102 ± 11,792	204,010 ± 15,60	205,10 ± 16,03
Peso corporal final (g)	296,60 ± 16,61	224,10 ± 32,48*	259,82 ± 20,46 [#]
Ganho de peso corporal (g)	92,50 ± 14,56	16,25 ± 25,63*	53,00 ± 27,51 [#]
Testículo (g)	1,62 ± 0,07	1,42 ± 0,10*	1,51 ± 0,09
Testículo (g/100g)	0,53 ± 0,04	0,72 ± 0,15*	0,58 ± 0,02 [#]
Epidídimo (mg)	50,34 ± 2,76	46,41 ± 3,93*	51,86 ± 3,51 [#]
Epidídimo (mg/100g)	16,80 ± 1,20	22,03 ± 4,61*	18,94 ± 1,41 [#]
Próstata ventral (mg)	50,67 ± 12,87	32,11 ± 6,38*	52,67 ± 14,58 [#]
Próstata ventral (mg/100 g)	16,11 ± 4,05	15,85 ± 2,92	20,11 ± 4,24
Vesícula seminal (mg)	103,21 ± 27,28	91,43 ± 18,95	94,59 ± 18,65
Vesícula seminal (mg/100 g)	34,90 ± 9,67	37,27 ± 5,30	36,30 ± 6,12

Valores expressos em média ± D.P.M. *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre animais dos grupos controle sedentário e HAP sedentário pelo teste t de *Student*. [#]Diferença significativa ($p < 0,05$) entre animais dos grupos HAP sedentário e HAP treinado (HAP + TFR) pelo teste t de *Student*. (n = 6 animais/grupo)

3.4 Concentrações séricas de testosterona

Animais sedentários com HAP apresentaram uma redução na concentração de testosterona sérica quando comparado aos animais saudáveis do grupo controle sedentário ($p < 0,05$; Fig. 2A). Animais com HAP submetidos ao TFR apresentaram um aumento no valor médio desse parâmetro comparado aos animais com HAP sedentários (Figura 2A).

3.5 Bioquímica testicular

A concentração de colesterol testicular foi maior nos animais do grupo HAP sedentário quando comparado aos animais do grupo controle sedentário ($p < 0,05$; Fig. 2B). Animais com HAP que praticaram o TFR tiveram a concentração média de colesterol menor quando comparado aos animais do grupo HAP sedentário ($p < 0,05$; Fig. 2B). As concentrações testiculares de glicose e de triglicérides não foram alteradas nos animais do grupo HAP sedentário comparado aos animais do grupo controle sedentário, ou do grupo TFR + HAP quando comparado aos animais do grupo HAP sedentário ($p > 0,05$; Figura 2C-D).

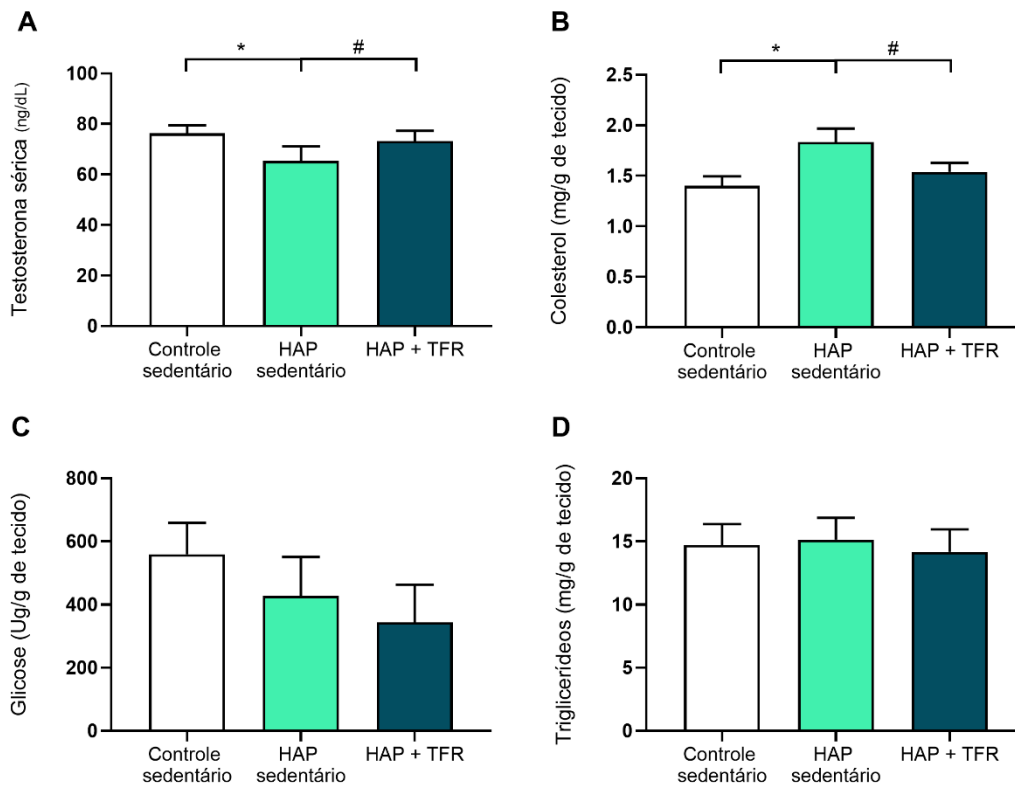


Figura 2: Efeitos da hipertensão arterial pulmonar (HAP) e do treinamento físico resistido (TFR) sobre valores de testosterona sérica e parâmetros bioquímicos testiculares de ratos Wistar. *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre animais saudáveis (controle sedentário) e animais com HAP (HAP sedentário) pelo Teste t de *Student*. #Diferença significativa ($p < 0,05$) entre animais sedentários com HAP e animais com HAP submetidos ao TFR (HAP + TFR) pelo teste t de *Student*. Valores expressos como média \pm D.P.M. ($n = 5$ animais/grupo)

3.6 Contagem de túbulos seminíferos normais e patológicos

Animais saudáveis sedentários apresentaram poucos túbulos seminíferos com alterações em sua histologia (Fig. 3A-C). Já animais sedentários com HAP apresentaram uma diminuição no percentual de túbulos seminíferos normais comparados aos animais do grupo controle sedentário ($p < 0,05$; Fig. 3A). Conseqüentemente, houve um aumento no percentual

de túbulos seminíferos com patologias leves ou moderadas em animais do grupo HAP sedentário ($p < 0,05$; Fig. 3B e C). Animais do grupo HAP + TFR apresentaram diminuição na porcentagem de túbulos com patologias, tanto leves como moderadas, e consequente aumento na porcentagem de túbulos seminíferos normais comparados aos animais do grupo HAP ($p < 0,05$; Fig. 3A-C). Fotomicrografias representativas dos túbulos seminíferos dos animais dos grupos controle sedentário, HAP sedentário, HAP + TFR e controle TFR são mostradas na Figura 4.

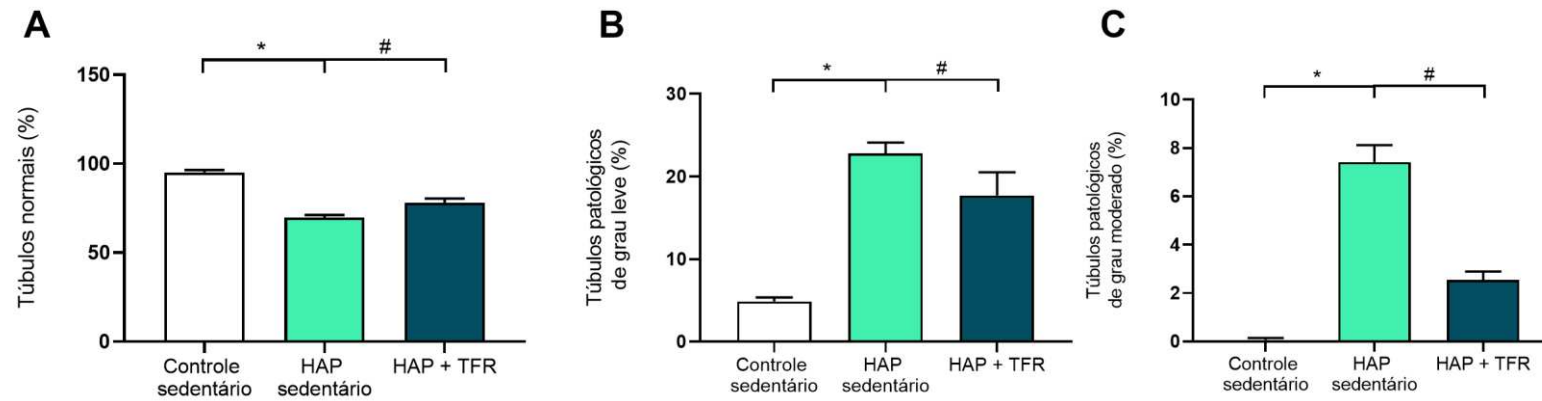


Figura 3: Efeitos da hipertensão arterial pulmonar (HAP) e do treinamento físico resistido (TFR) na histopatologia de túbulos seminíferos de ratos Wistar. *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre animais saudáveis (controle sedentário) e animais com HAP (HAP sedentário) pelo Teste t de *Student*. #Diferença significativa ($p < 0,05$) entre animais com HAP sedentários e animais com HAP submetidos ao TFR (HAP + TFR) pelo teste t de *Student*. Valores expressos como média \pm D.P.M. ($n = 5$ animais/grupo)

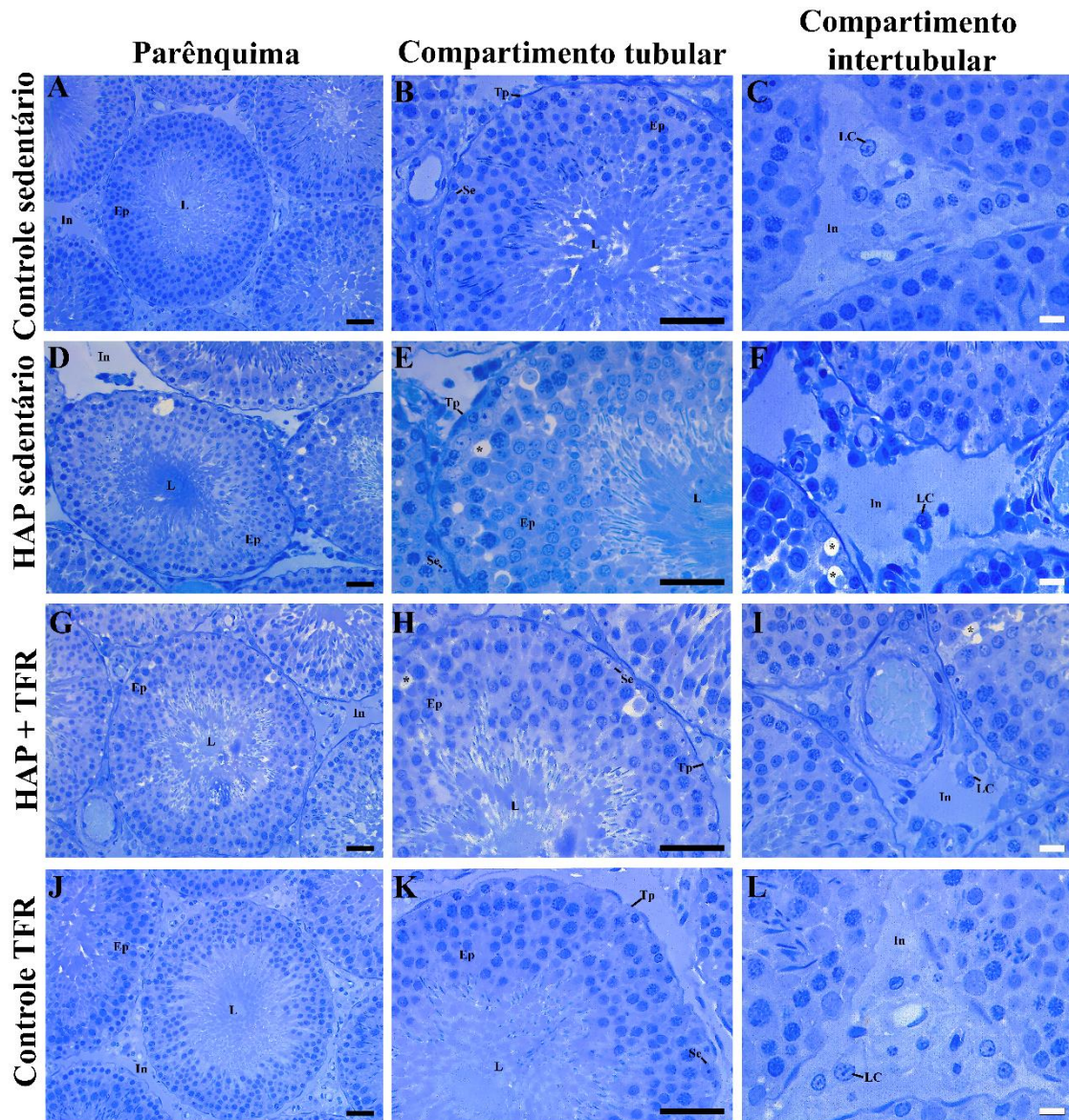


Figura 4: Fotomicrografias representativas do parênquima testicular de ratos Wistar. Controle sedentário = animais saudáveis sedentários; HAP sedentário = animais sedentários induzidos experimentalmente à hipertensão arterial pulmonar (HAP). HAP + TFR = animais com HAP submetidos ao treinamento físico resistido (TFR); Controle TFR = animais saudáveis submetidos ao TFR. L = lúmen do túbulo seminífero; Ep = epitélio seminífero; In = compartimento intertubular; Se = célula de Sertoli; Tp = túnica própria; * = vacúolos no epitélio seminífero. Azul de toluidina. Barra escura = 50µm; Barra clara = 10 µm

3.7 Morfometria e estereologia testicular

Animais sedentários com HAP apresentaram várias alterações morfológicas no testículo. Os valores de diâmetro tubular, altura do epitélio, porcentagem do compartimento tubular, túnica própria e lúmen do túbulo seminífero foram reduzidos nos animais do grupo HAP sedentário comparados aos animais do grupo controle sedentário ($p < 0,05$; Tabela 2). Já a porcentagem de compartimento intertubular e epitélio seminífero aumentaram nos animais com HAP sedentários comparados aos animais sedentários controle ($p < 0,05$; Tabela 2). Animais com HAP submetidos ao TFR apresentaram aumento de diâmetro do tubular, altura do epitélio, proporção de compartimento tubular, túnica própria e lúmen, com uma redução na proporção de compartimento intertubular quando comparado aos animais sedentários com HAP ($p < 0,05$; Tabela 2).

As proporções e volumes dos componentes do intertúbulo de animais do grupo HAP sedentários também foi alterada. Animais sedentários doentes apresentaram uma redução na porcentagem de células de Leydig quando comparados aos animais do grupo controle sedentário ($p < 0,05$; Tabela 3). Por outro lado, os animais do grupo HAP sedentário tiveram aumento tanto no volume quanto na proporção de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e macrófagos no compartimento intertubular comparados aos animais controles sedentários ($p < 0,05$; Tabela 3). Animais sedentários com HAP não apresentaram alterações da proporção e o volume do espaço linfático comparados com os animais do grupo controle sedentário ($p > 0,05$; Tabela 3). Animais com HAP que praticaram o TFR tiveram uma redução na proporção de tecido conjuntivo e macrófagos comparados aos animais sedentários com a doença ($p < 0,05$; Tabela 3). Curiosamente, os animais doentes que praticaram o TFR não tiveram aumento na porcentagem das células de Leydig comparado aos animais do grupo HAP sedentários ($p < 0,05$; Tabela 3).

Tabela 2: Parâmetros histomorfométricos e estereológicos testiculares de ratos Wistar saudáveis (controle sedentário) ou com hipertensão arterial pulmonar (HAP) induzida por monocrotalina, submetidos ou não ao treinamento físico de resistência (TFR).

Parâmetros	Controle sedentário	HAP sedentário	HAP + TFR
<i>Morfometria testicular</i>			
Diâmetro tubular (μm)	289,31 \pm 6,14	269,00 \pm 4,25*	307,90 \pm 10,67 [#]
Diâmetro luminal (μm)	169,52 \pm 11,74	171,60 \pm 5,82	185,24 \pm 15,19
Altura do epitélio (μm)	59,90 \pm 5,60	48,73 \pm 3,51*	61,36 \pm 4,02 [#]
<i>Proporção volumétrica</i>			
Compartimento tubular (%)	84,96 \pm 0,21	83,61 \pm 0,75*	86,62 \pm 0,59 [#]
Epitélio seminífero (%)	59,17 \pm 0,62	61,21 \pm 0,63*	60,59 \pm 1,18
Túnica própria (%)	5,08 \pm 0,14	4,47 \pm 0,30*	5,38 \pm 0,47 [#]
Lúmen (%)	20,71 \pm 0,69	18,15 \pm 1,45*	20,64 \pm 0,89 [#]
Compartimento intertubular (%)	15,04 \pm 0,21	16,39 \pm 0,75*	13,38 \pm 0,59 [#]

Valores expressos em média \pm D.P.M. *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre animais dos grupos controle sedentário e HAP sedentário pelo Teste t de *Student*. [#]Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os animais dos grupos HAP sedentário e HAP treinado (HAP + TFR) pelo Teste t de *Student*. (n = 6 animais/grupo)

Por fim, animais sedentários com HAP apresentaram alterações nas análises morfométricas da célula de Leydig quando comparados aos animais controle. O diâmetro nuclear, a porcentagem citoplasmática e nuclear, o volume do núcleo e o número de células de Leydig por testículo diminuíram em animais do grupo HAP sedentário comparados aos animais do grupo controle sedentário ($p < 0,05$; Tabela 4). Animais do grupo HAP + TFR apresentaram alterações em todos os parâmetros analisados, ocorrendo um aumento no diâmetro nuclear, na porcentagem e volume do núcleo, bem como no número de células de Leydig no testículo destes animais quando comparados aos animais do grupo HAP sedentário ($p < 0,05$, Tabela 4).

Entretanto, animais hipertensos que praticaram o TFR apresentaram o volume da célula de Leydig menor que os animais sedentários doentes, assim como uma diminuição no volume e porcentagem do citoplasma da célula ($p < 0,05$; Tabela 4).

Tabela 3: Proporção volumétrica e volume de componentes do intertúbulo de ratos Wistar saudáveis (controle sedentário) ou com hipertensão arterial pulmonar (HAP) induzida por monocrotalina, submetidos ou não ao treinamento físico de resistência (TFR).

Parâmetros	Controle sedentário	HAP sedentário	HAP + TFR
<i>Proporção volumétrica</i>			
Tecido conjuntivo (%)	2,87 ± 0,60	4,24 ± 0,55*	2,67 ± 0,27 [#]
Espaço linfático (%)	0,38 ± 0,24	0,34 ± 0,22	0,28 ± 0,07
Vaso sanguíneo (%)	1,39 ± 0,54	2,69 ± 0,89*	2,03 ± 0,30
Macrófagos (%)	0,47 ± 0,10	0,85 ± 0,21*	0,67 ± 0,15 [#]
Célula de Leydig (%)	9,94 ± 0,84	8,31 ± 0,52*	7,74 ± 0,39
<i>Volume</i>			
Tecido conjuntivo (mL)	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,02*	0,08 ± 0,009 [#]
Espaço linfático (mL)	0,01 ± 0,008	0,01 ± 0,006	0,01 ± 0,002
Vaso sanguíneos (mL)	0,04 ± 0,02	0,08 ± 0,02*	0,06 ± 0,01
Macrófagos (mL)	0,01 ± 0,005	0,02 ± 0,006*	0,02 ± 0,004
Células de Leydig (mL)	0,30 ± 0,07	0,24 ± 0,02	0,22 ± 0,01

Valores expressos em média ± D.P.M. *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre animais saudáveis (controle sedentário) e animais com HAP (HAP sedentário) pelo Teste t de *Student*.

[#]Diferença significativa ($p < 0,05$) entre animais com HAP sedentários e animais com HAP submetidos ao TFR (HAP + TFR) pelo teste t de *Student*. (n = 6 animais/grupo)

Tabela 4: Análises morfométricas das células de Leydig de ratos Wistar saudáveis (controle sedentário) ou com hipertensão arterial pulmonar (HAP) induzida por monocrotalina, submetidos ou não ao treinamento físico de resistência (TFR).

Parâmetros	Controle sedentário	HAP sedentário	HAP + TFR
<i>Morfometria das células de Leydig</i>			
Diâmetro nuclear (μm)	6,80 \pm 0,25	6,33 \pm 0,17*	6,62 \pm 0,24 [#]
Porcentagem nuclear (%)	1,78 \pm 0,60	1,34 \pm 0,22*	1,72 \pm 0,14 [#]
Porcentagem citoplasmática (%)	8,16 \pm 0,55	6,97 \pm 0,62*	6,02 \pm 0,41 [#]
Volume nuclear (μm^3)	165,48 \pm 18,85	133,54 \pm 12,75*	155,03 \pm 15,71 [#]
Volume citoplasmático (μm^3)	833,19 \pm 276,98	711,68 \pm 156,07	594,90 \pm 62,88 [#]
Volume celular (μm^3)	998,67 \pm 258,61	845,22 \pm 155,20	756,13 \pm 87,20 [#]
Número de células/testículo ($\times 10^6$)	3645,28 \pm 31,51	2514,19 \pm 71,89*	3177,51 \pm 37,04 [#]

Valores expressos em média \pm D.P.M. *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre animais dos grupos controle sedentário e HAP sedentário pelo Teste t de *Student*. [#]Diferença significativa ($p < 0,05$) entre animais com HAP sedentários e animais com HAP submetidos ao TFR (HAP + TFR) pelo teste t de *Student*. (n = 6 animais/grupo)

3.8 Contagem de células germinativas e produção espermática diária

A contagem de células germinativas no epitélio seminífero de túbulos no estágio 1 da espermatogênese, bem como os índices obtidos a partir dessa contagem estão apresentados na Tabela 5. Animais sedentários doentes apresentaram uma redução do número de células de Sertoli, espermátides arredondadas e, conseqüentemente, do número total de células germinativas ($p < 0,05$; Tabela 5). Apesar dessa redução, os animais do grupo HAP sedentário não tiveram o número de espermatogônias do tipo A, de espermátócitos primários em preleptóteno/leptóteno e de espermátócitos primários em paquíteno alterados em relação aos animais do grupo controle sedentário ($p > 0,05$; Tabela 5). Com essas alterações nas células do epitélio seminífero, os índices mitóticos e de Sertoli também sofreram uma redução nos animais

doentes sedentários comparados aos animais saudáveis sedentários ($p < 0,05$; Tabela 5). Por fim, animais doentes tiveram uma redução na capacidade de suporte da célula de Sertoli, no rendimento da espermatogênese e na produção espermática diária comparados aos animais do grupo controle sedentário ($p < 0,05$; Tabela 5). Animais doentes que praticaram o TFR apresentaram um aumento em quase todos os parâmetros afetados pela doença quando comparados ao grupo HAP sedentário, havendo um aumento desde o número de espermátides arredondadas ao rendimento da espermatogênese ($p < 0,05$; Tabela 5). Todavia, o índice de produção espermática diária não foi aumentado nos animais do grupo HAP + TFR comparados aos animais do grupo HAP sedentário ($p > 0,05$; Tabela 5).

Tabela 5: Contagem de células do epitélio seminífero de túbulos no estágio 1 da espermatogênese de ratos Wistar saudáveis (controle sedentário) ou com hipertensão arterial pulmonar (HAP) induzida por monocrotalina, submetidos ou não ao treinamento físico de resistência (TFR).

Parâmetros	Controle sedentário	HAP sedentário	HAP + TFR
<i>Morfometria da secção tubular em estágio I</i>			
Espermatogônia do tipo A	3,37 ± 0,35	3,30 ± 0,91	3,90 ± 0,49 [#]
Espermatócito primário em préleptóteno/leptóteno	33,45 ± 2,48	33,60 ± 2,49	30,60 ± 2,60
Espermatócito primário em paquíteno	44,67 ± 4,62	42,07 ± 2,42	40,17 ± 2,74
Espermátide arredondada	103,30 ± 13,78	68,52 ± 12,69 [*]	101,22 ± 4,52 [#]
Número de células germinativas	184,82 ± 8,98	147,94 ± 7,02 [*]	175,26 ± 4,03 [#]
Célula de Sertoli	7,29 ± 0,81	6,31 ± 0,36 [*]	7,14 ± 0,36 [#]
Índice mitótico	10,25 ± 1,31	7,56 ± 1,87 [*]	8,61 ± 0,60 [#]
Índice meiótico	2,30 ± 0,17	1,75 ± 0,42	2,78 ± 0,11 [#]
Índice de célula de Sertoli	15,36 ± 2,58	9,78 ± 0,87 [*]	15,32 ± 0,84 [#]
Número de células de Sertoli/testículo (x10 ⁶)	9,07 ± 1,96	7,01 ± 2,53 [*]	8,94 ± 3,91 [#]
Número de células de Sertoli/g/testículo (x10 ⁶)	6,94 ± 1,66	4,74 ± 1,84	6,74 ± 1,04
Capacidade de suporte da célula de Sertoli	27,29 ± 3,77	19,11 ± 2,83 [*]	25,29 ± 1,31 [#]
Rendimento da espermatogênese	31,48 ± 3,48	21,24 ± 2,68 [*]	24,81 ± 2,41 [#]
Produção espermática diária (x10 ⁶)	27,11 ± 3,96	13,98 ± 4,17 [*]	18,86 ± 2,17
Produção espermática diária /g/testículo (x10 ⁶)	18,32 ± 4,29	9,58 ± 3,53 [*]	12,81 ± 3,70

Valores expressos em média ± D.P.M. ^{*}Diferença significativa (p < 0,05) entre animais saudáveis (controle sedentário) e com HAP (HAP sedentário) pelo Teste t de *Student*.

[#]Diferença significativa (p < 0,05) entre animais com HAP sedentários e animais com HAP submetidos ao TFR (HAP + TFR) pelo teste t de *Student*. (n = 6 animais/grupo)

3.9 Atividade de enzimas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo

A atividade da SOD não foi alterada em animais sedentário com HAP comparados aos animais controle sedentários ($p > 0,05$; Fig. 5A). CAT e GST, enzimas da segunda linha da defesa antioxidante, tiveram redução no nível de atividade em animais do grupo HAP sedentário comparados aos animais do grupo controle sedentário ($p < 0,05$; Fig. 5B e C). A prática do TFR pelos animais com HAP não aumentou a atividade de GST e aumentou CAT em relação aos animais do grupo HAP sedentário ($p > 0,05$; Fig. 5B e C). A atividade do ON também sofreu alterações pela doença, animais sedentários com HAP apresentaram menor concentração de ON que animais dos grupos controles ($p < 0,05$; Fig. 5D). Animais do grupo HAP + TFR apresentaram aumento na concentração de ON comparado aos animais sedentários com HAP ($p < 0,05$; Fig. 5D). Os animais com HAP não apresentaram alterações nos valores de MDA e PC, quando comparados aos animais do grupo controle sedentário ($p > 0,05$; Fig. 5E e F), assim como a capacidade antioxidante total (FRAP) ($p > 0,05$; Fig. 5G). Da mesma forma, animais doentes submetidos ao TFR não apresentaram alterações nos valores desses marcadores, e do FRAP, quando comparados aos animais sedentários com HAP ($p > 0,05$; Fig. 5E-G).

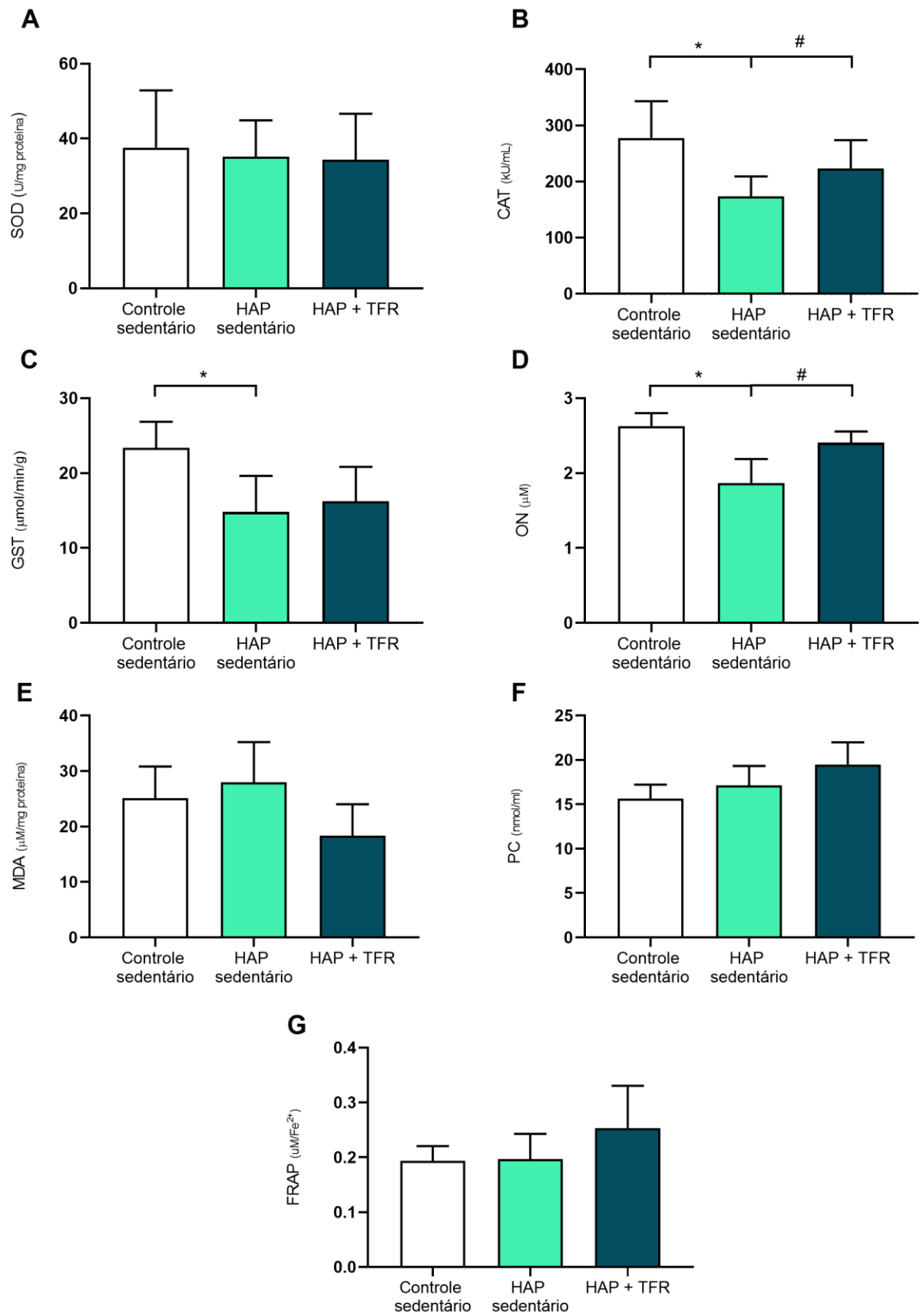
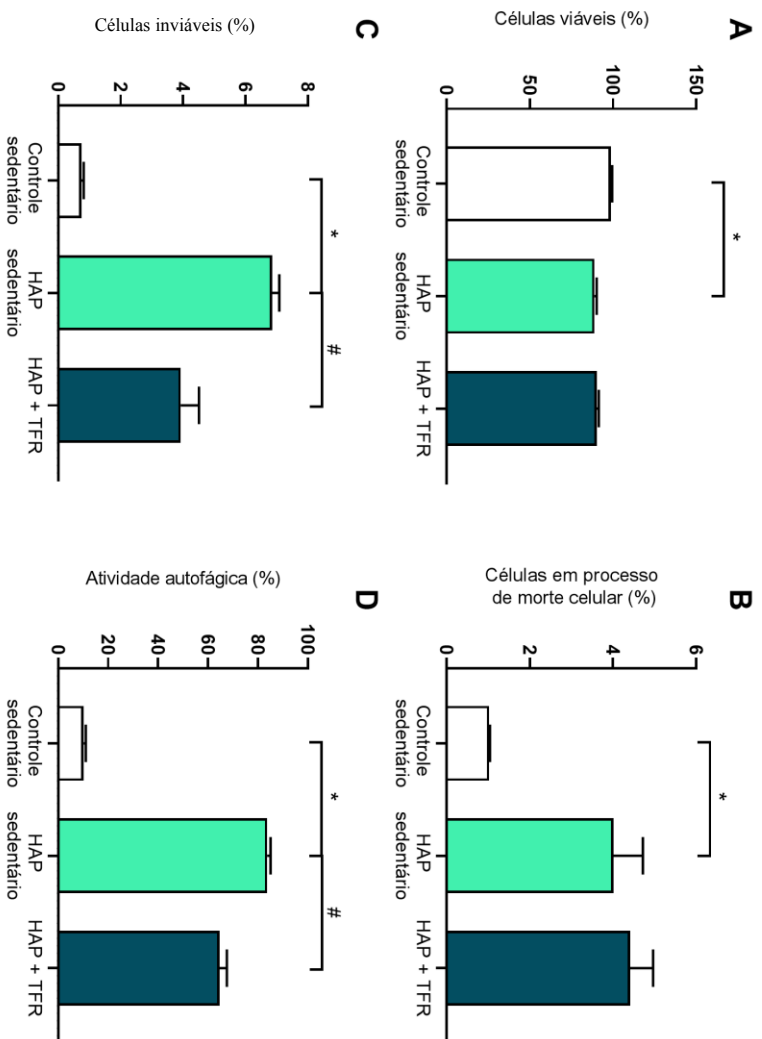


Figura 5: Efeitos da hipertensão arterial pulmonar (HAP) e do treinamento físico resistido (TFR) sobre atividade de enzimas antioxidantes, produtos do estresse oxidativo e capacidade antioxidante total em testículos de ratos Wistar. *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre animais saudáveis (controle sedentário) e animais com HAP (HAP sedentário) pelo Teste t de *Student*. #Diferença significativa ($p < 0,05$) entre animais com HAP sedentários e animais com HAP submetidos ao TFR (HAP + TFR) pelo teste t de *Student*. SOD = superóxido dismutase; CAT = catalase; GST = glutathiona S-transferase; ON = óxido nítrico; MDA = malondialdeído; PC = proteína carbonilada; FRAP = capacidade antioxidante total. Valores expressos como média \pm D.P.M. (n = 5 animais/grupo)

3.10 Viabilidade celular e atividade de autofagia

A análise de viabilidade celular revelou um aumento na porcentagem de células germinativas e células intertubulares inviáveis, ou em processo, em animais sedentários com HAP comparados aos animais do grupo controle sedentário ($p < 0,05$; Fig. 6B, C, F e G). Conseqüentemente, estes mesmos animais apresentaram menor quantidade de células viáveis nos dois compartimentos ($p < 0,05$; Fig. 6A e E). Os animais doentes que praticaram o TFR não apresentaram aumento significativo no número de células viáveis nos dois compartimentos quando comparados aos animais sedentários com HAP ($p < 0,05$ Fig. 6A e E). Todavia o exercício físico foi capaz de diminuir o número de células do epitélio seminífero e intertubulares inviáveis quando comparado aos animais doentes que não praticaram ($p < 0,05$; Fig. 6C e G). A porcentagem de vesículas ácidas no citoplasma das células do epitélio seminífero foi drasticamente aumentada em animais com HAP quando comparados aos animais controles sedentários ($p < 0,05$; Fig. 6D). Grande parte das células germinativas apresentavam citoplasma vermelho/alaranjado, indicando grande quantidade de compartimentos ácidos. No compartimento intertubular, a porcentagem de células com citoplasma marcado foi maior nos animais sedentários doentes, principalmente o citoplasma de células de Leydig, comparado a porcentagem dos animais do grupo controle sedentário ($p < 0,05$; Fig. 6D e H). Novamente, animais do grupo HAP + TFR apresentaram uma diminuição dessa porcentagem quando comparado aos animais do grupo HAP sedentário ($p < 0,05$; Fig. 6D e H). Imagens do parênquima testicular corado com laranja de acridina/iodeto de propídio podem ser visualizadas na Figura 7.

Compartimento Tubular



Compartimento Intertubular

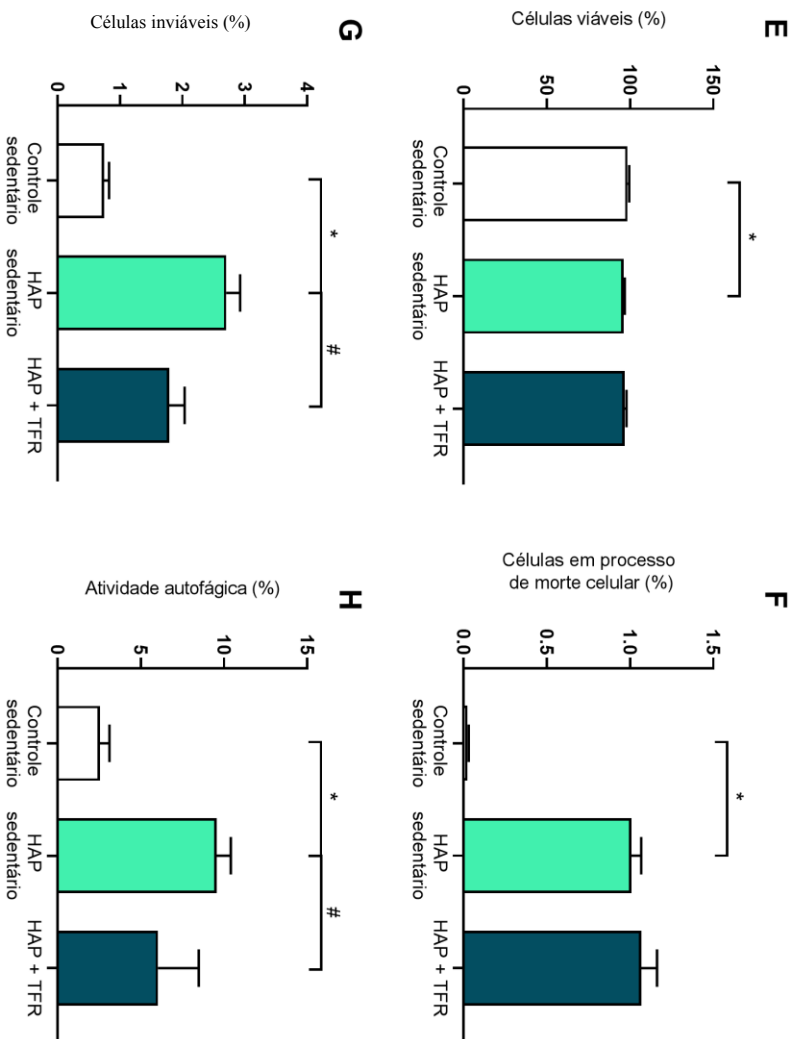


Figura 6: Efeitos da hipertensão arterial pulmonar (HAP) e do treinamento físico resistido (TFR) sobre viabilidade celular e atividade autofágica de células do parênquima testicular de ratos Wistar. *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre animais saudáveis (controle sedentário) e animais com HAP e sedentários pelo Teste *t* de *Student*. #Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos HAP sedentário e HAP+ TFR pelo teste *t* de *Student*. Valores expressos como média \pm D.P.M. (n = 5 animais/grupo)

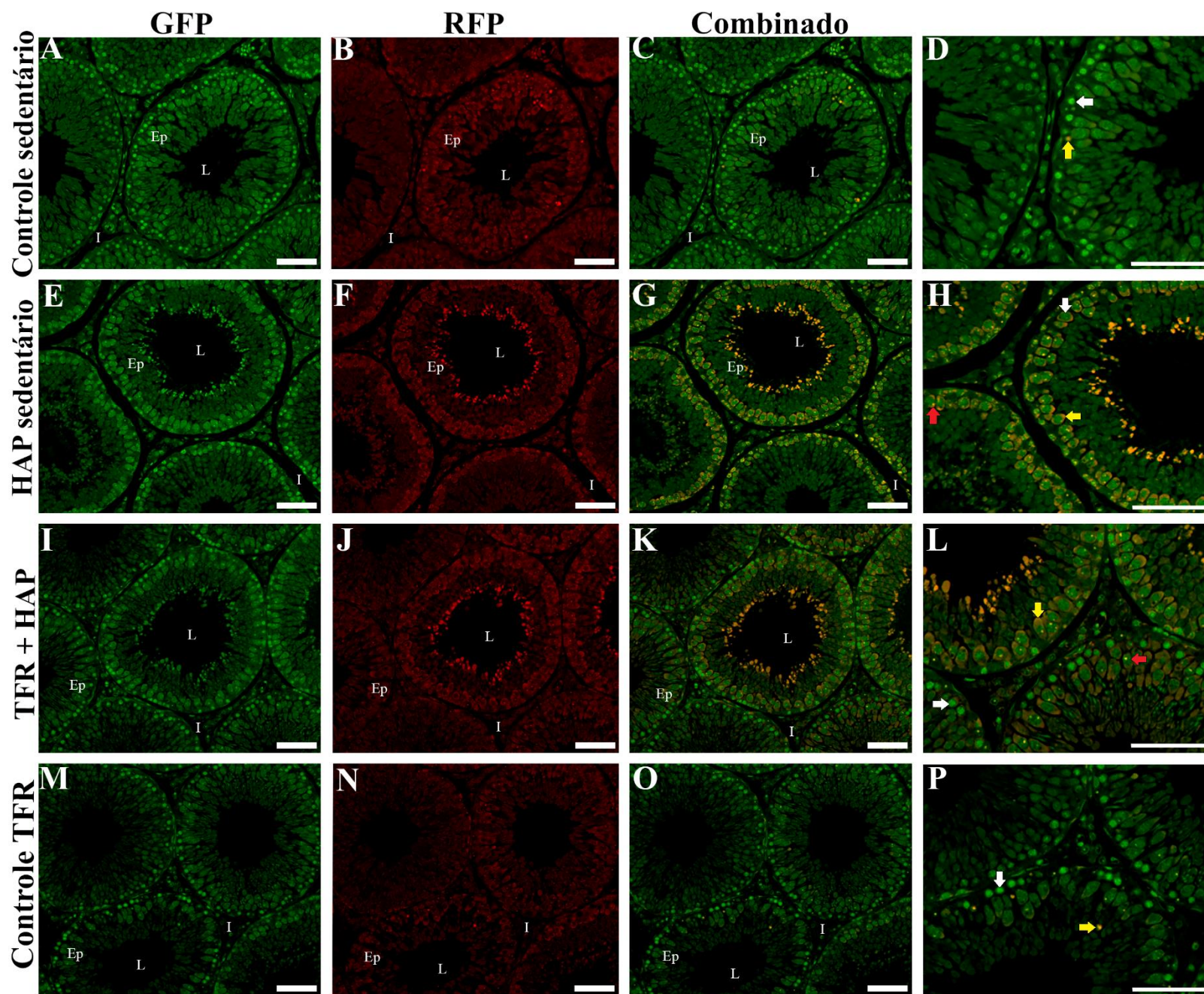


Figura 7: Fotomicrografias representativas com dupla coloração (laranja de acridina + iodeto de propídio) do parênquima testicular de ratos Wistar. Controle sedentário = animais saudáveis sedentários; HAP sedentário = animais sedentários induzidos experimentalmente à hipertensão arterial pulmonar (HAP). HAP + TFR = animais induzidos à HAP submetidos ao treinamento físico resistido (TFR); Controle TFR = animais saudáveis submetidos ao TFR. GFP = filtro de 50nm; RFP = filtro de 580 nm; Combinado = sobreposição de imagens. L = lúmen do túbulo seminífero; Ep = epitélio seminífero; I = compartimento intertubular. Seta branca = células viáveis; Seta amarela = núcleo positivo ao iodeto de propídio, célula em processo de inviabilidade; Seta vermelha = vesículas ácidas. Barra = 50µm

4. Discussão

Neste estudo investigou-se pela primeira vez os danos causados pela HAP em parâmetros testiculares, bem como o possível impacto positivo da prática de exercício físico, especificamente o TFR, sobre parâmetros afetados pela doença. A gravidade da HAP é associada a uma baixa expectativa de vida. A maioria dos estudos experimentais vêm mostrando os danos causados por esta doença em pulmões e coração, devido o direto comprometimento de suas funções. Isto resulta em uma busca por terapias medicamentosas e/ou não-farmacológicas que ajudem a aumentar a sobrevida de pacientes com hipertensão pulmonar. Este é o caso da prática de exercícios físicos, que vem sendo implementada como fator chave na melhora da qualidade de vida do enfermo.

O protocolo de indução a HAP utilizando monocrotalina foi capaz de induzir danos à funcionalidade do coração, correspondendo ao que se espera encontrar em pacientes com HAP. As alterações decorrentes da indução foram verificadas por ecocardiograma, que tem sido amplamente utilizado em trabalhos experimentais com o intuito de verificar o estado hipertenso (Thenappan et al., 2018). Animais com HAP submetidos ao TFR apresentaram melhoras no quadro de HAP. Este resultado mostra que o TFR foi capaz de proteger o órgão contra a desregulação da função contrátil. Outros trabalhos já associaram a prática de exercícios físicos à uma melhora de parâmetros cardíacos de animais com HAP (Soares et al., 2019; Vecchia e Bussotti, 2018).

Nosso estudo mostrou que os testículos de ratos Wistar foram afetados pela HAP. Os pesos absoluto e relativo dos órgãos reprodutores masculinos são considerados bons indicadores da saúde reprodutiva (Agarwal et al., 2003). Na presença do estado hipertensivo, redução do peso testicular pode ser um indicativo da diminuição, ou parada, da função normal do testículo e degeneração do tecido testicular (Adedara et al., 2016). No caso dos testículos, a drástica redução do peso absoluto do órgão é o primeiro sinal que pode indicar uma falha na

produção de espermatozoides. A gônada masculina é altamente andrógeno-dependente (Makela et al., 2018). Assim, a redução dos níveis de testosterona sérica, encontrados neste trabalho, pode explicar a diminuição do peso do órgão. Além disso, é provável, que os baixos níveis de testosterona sérica sejam resultado de problemas na maquinaria da produção do hormônio na própria gônada, uma vez que os hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, que sinalizam para a produção do andrógeno, como o hormônio luteinizante, não parecem ser alterados em pacientes com HAP (Wu et al., 2018). O TFR foi capaz de diminuir a perda de peso do testículo provocada pela HAP, resultando em valores intermediários entre os de animais saudáveis e os de animais doentes, sendo o primeiro sinal de efeitos benéficos do exercício nos testículos de animais com HAP. Provavelmente esta melhora no peso do órgão ocorreu em decorrência da restauração dos níveis de testosterona sérica causados pelo exercício físico. Experimentos envolvendo praticantes do TFR mostraram um aumento nos níveis de testosterona basal desses indivíduos em poucas semanas (Vingren et al., 2010; Hooper et al., 2017).

O ON tem um papel ainda controverso na fisiopatologia da HAP. A maior parte dos trabalhos realizados constataram que pacientes com HAP tem menor quantidade de ON endotelial no tecido pulmonar, o que resulta em problemas na remodelação vascular (Giaid et al., 1995; Chester et al., 2017). Baixos níveis de testosterona também estão associados à diminuição do ON. Aparentemente, um déficit de testosterona sérica implica em uma diminuição no número de receptores 1 da esfingosina-1-fosfato (S1P1) das células endoteliais, que resultam em menor produção de ON (Hotta et al., 2019). Aqui, provavelmente houve um sinergismo entre os baixos níveis de testosterona provocados pela doença e o próprio estado de hipertensão na redução da produção de ON. A prática de TFR está associada a um aumento na produção de óxido nítrico endógeno (Güzel et al., 2007; Otsuki et al., 2019), o que também encontramos no testículo. Durante o exercício físico o débito cardíaco aumenta o fluxo

sanguíneo que provoca um aumento na tensão de cisalhamento/*shear stress*, resultando na produção de óxido nítrico endógeno (Van Citters e Franklin, 1969; Güzel et al., 2007).

O processo desregulado de autofagia é associado a uma variedade de patologias, incluindo a HAP (Lee et al., 2011; Ornatowski et al., 2020). Em níveis basais, o processo autofágico é benéfico à célula e recicla componentes celulares. Em decorrência de uma série de estímulos, como o estresse oxidativo e a hipóxia, diversos constituintes celulares são sequestrados a vesículas denominadas autofagossomos que vão se fundir a lisossomos para serem digeridas (Gao et al., 2018; Feng et al., 2019). Como mostramos, o índice de células com vesículas ácidas foi maior tanto no compartimento tubular quanto em células do intertúbulo de animais com HAP. O ON tem uma variedade de efeitos sob o processo autofágico, que vão depender do tipo celular em questão (Lee et al., 2012). De modo geral, em níveis elevados, o ON inibe a síntese do autofagossomos através das vias JNK1-Bcl-2-Bec1 e IKK-AMPK-TSC2-mTOR (Sarkar et al., 2011). Sendo assim, os baixos níveis de ON encontrados neste trabalho podem ter contribuído para exacerbação do processo autofágico nas células germinativas e intersticiais. O processo de autofagia descontrolado é prejudicial à célula e pode ser o ponto central dos danos teciduais encontrados. Outro ponto importante é que a autofagia contribui para a síntese de testosterona na célula de Leydig, onde o acúmulo de LC3 é associado ao acúmulo de gotículas lipídicas que fornecem colesterol para o processo de esteroidogênese (Gao et al., 2018). Portanto, era de se esperar que os níveis altos de autofagia aqui encontrados resultassem em um aumento na produção de testosterona, o que não encontramos. Isso pode ser justificado pela maior concentração de colesterol testicular encontrado nos animais com HAP, indicando que apesar de intensa atividade autofágica, a célula não está conseguindo transformar o colesterol em testosterona. Por fim, espera-se que o processo desequilibrado de autofagia resulte em danos significativos à célula, até mesmo à apoptose, o que vai te encontro com o aumento de células marcadas pelo iodeto de propídio. O TFR, por estimular a produção de ON,

pode ter atenuado a autofagia desenfreada das células germinativas e minimizado o processo autofágico nas células de Leydig, indicado pelo aumento nos níveis de testosterona sérica e diminuição do colesterol testicular.

Em decorrência do baixo peso testicular, níveis reduzidos de testosterona sérica e autofagia em excesso, já era esperado que a histoarquitetura testicular fosse comprometida. Por exemplo, o epitélio seminífero é mantido por concentrações adequadas de testosterona que suprem a célula de Sertoli, que, por sua vez, mantém o epitélio íntegro e funcional (Smith e Walker, 2015). Alterações na concentração do hormônio podem ter prejudicado a célula e, conseqüentemente, dois processos específicos na produção do espermatozoide. O primeiro envolve a adesão da célula de Sertoli com a espermátide arredondada, que acabam sendo destacadas prematuramente para o lúmen tubular, não formando os espermatozoides (O'Donnell et al., 1996; Holdcraft e Braun, 2003; Smith e Walker, 2015). O segundo ponto envolve o ciclo celular, pois na ausência de sinalização pela testosterona, as células germinativas têm dificuldade em completar a meiose, não evoluindo a células haploides (Yeh et al., 2002). Esses dois pontos podem explicar o aumento de túbulos seminíferos com alterações morfológicas, tanto de grau leve como moderado. Problemas na adesão celular podem ter resultado no aumento de vacúolos, de descamação do epitélio e de células germinativas no lúmen do túbulo seminífero. O número de espermátides arredondadas no estágio I foi o único tipo de célula germinativa que sofreu uma diminuição pela doença, o que corrobora com nossa hipótese. Assim, a HAP parece afetar a célula de Sertoli prejudicando a transição da meiose. Outro exemplo é a influência do processo de autofagia que, em níveis normais, parece contribuir com a progressão meiótica (Wang et al., 2018). Provavelmente, como a porcentagem de vesículas ácidas se encontram muito elevadas, não parece aqui haver um efeito benéfico ao processo de meiose. Vale ressaltar que o processo de controle do ciclo celular e o processo de apoptose inclui várias vias e componentes, sendo necessário trabalhos

específicos para entendermos quais mecanismos moleculares podem estar sendo afetados pela HAP e confirmar nossa hipótese. Como mostrado, o aumento nos níveis de testosterona sérica de pacientes que praticaram TFR e a diminuição de índices autofágicos em animais treinados podem ser a explicação para a manutenção do número de espermátides arredondadas nos animais com HAP treinados, bem como uma diminuição em túbulos patológicos.

Como consequência de problemas no processo de meiose e na manutenção do epitélio seminífero, a produção espermática diária diminuiu em animais com HAP. Isso indica, que a doença acaba prejudicando a produção de gametas masculinos, podendo resultar na formação de espermatozoides problemáticos. Infelizmente, apesar de melhorar os níveis séricos de testosterona, o TFR não foi capaz de reverter a diminuição na produção do espermatozoide.

Todas estas alterações patológicas e na funcionalidade do órgão culminaram em alterações dos componentes do parênquima testicular. A redução do número de células germinativas pela HAP resultou em diminuição do diâmetro do túbulo e da altura do epitélio seminífero. No entanto, apesar do prejuízo na produção do espermatozoide, o diâmetro do lúmen não foi alterado. No compartimento intertubular, a HAP provocou um aumento no número de macrófagos, de vasos sanguíneos e tecido conjuntivo. Os macrófagos induzem os fibroblastos à síntese de colágeno através de mediadores profibróticos, como o fator de crescimento transformador (TGF)- β 1 e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (Wynn e Barron, 2010). O aumento desta célula fagocitária pode estar associado ao aumento de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos no órgão, por haver uma interação recíproca entre os componentes mencionados (Wynn e Barron, 2010). O aumento de fibras de colágeno é um dos pontos centrais da HAP, uma vez que o depósito das fibras dificulta a remodelação vascular (Tabima e Chesler, 2010; Schermuly et al., 2011). No parênquima testicular, o aumento de componentes fibróticos pode resultar em problemas na comunicação entre compartimentos e prejuízos a espermatogênese (Mouro et al., 2019). O exercício físico tem gerado dados

satisfatórios no combate a marcadores inflamatórios, principalmente em relação à ação do endotélio no processo inflamatório. O treinamento físico melhora a capacidade de regeneração endotelial, aumentando o número de células endoteliais progenitoras, e diminuindo a expressão e liberação de moléculas de adesão, através do aumento da pressão de cisalhamento, que dificulta a migração de macrófagos pelo endotélio (You et al., 2013). Esse papel do exercício na resposta inflamatória pode nos guiar a entender como o TFR melhorou os parâmetros dos componentes do intertúbulo modificados pela HAP.

As células de Leydig são as células responsáveis pela esteroidogênese. A célula utiliza do colesterol para produzir testosterona. Os baixos níveis de testosterona sérica nos indicam alterações em parâmetros da célula de Leydig, onde descobrimos que quase todas as variáveis envolvendo a célula foram diminuídas pela HAP. Como os níveis de colesterol estavam elevados no testículo de animais doentes e a testosterona sérica estava reduzida, acreditamos haver algum problema no processo de produção do andrógeno dentro da célula de Leydig. Essa disfunção pode ser em decorrência de vários fatores já mencionados, como a autofagia (Zhao et al., 2018). Além disso, o aumento no número de macrófagos pode influenciar a produção da testosterona através da produção de citocinas e de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estes fatores podem afetar desde a conversão de colesterol à P450_{scc} até na atividade da 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase (17 β -HSD) durante a conversão de androstenediona à testosterona (Hales et al., 1999; Hales 2002). A diminuição de macrófagos em decorrência do TFR pode ser um dos fatores que permitiram a elevação dos níveis de testosterona sérica.

Por fim, a doença não provocou um aumento nos marcadores de estresse oxidativo, como o MDA e a PC. Entretanto, a atividade das enzimas CAT e GST foram reduzidas pela HAP. As duas enzimas fazem parte da segunda linha de defesa antioxidante endógena, convertendo o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), formado pela SOD na conversão do íon superóxido, em água (Bish et al., 2017). Assim, podemos assumir que há um acúmulo de H₂O₂

no tecido gerando EROs que podem resultar em problemas na esteroidogênese (Wang et al., 2015), na via autofágica (Filomeni et al., 2014) e, como consequência, na arquitetura testicular, comprometendo a fertilidade masculina (Bish et al., 2017). O H_2O_2 pode regular positivamente a autofagia por várias vias (Filomeni et al., 2014; Ornatowski et al., 2020), o que vai de encontro com nossos resultados com o laranja de acridina. A prática de exercício físico pode melhorar parâmetros relacionados à produção de EROs (Liguori et al., 2018). Aqui, melhoras na atividade da catalase nos animais com HAP que praticaram o TFR pode ter diminuído os níveis de H_2O_2 no tecido e contribuído para nossos resultados.

5. Conclusão

Coletivamente, nossos resultados indicam que a HAP tem grande influência sobre os testículos. A doença reduz a produção de testosterona, a atividade de enzimas antioxidantes e a concentração de ON. Conseqüentemente, a HAP aumenta os níveis de autofagia e causa desorganização da histoarquitetura testicular, culminando em diminuição na produção de espermatozoides. Além disso, mostramos que o TFR é capaz de melhorar a maioria destes parâmetros alterados, induzindo a produção de ON e do andrógeno. Ainda assim, infelizmente, o TFR não foi capaz de proteger o epitélio seminífero dos danos causados pela HAP à ponto de recuperar a produção espermática diária. Portanto, novos estudos são necessários para melhor entendermos como a HAP altera a histofisiologia testicular, bem como estudos que busquem novos tratamentos e associem diferentes terapias neste processo.

6. Referências bibliográficas

- Adedara, I. A., Abolaji, A. O., Awogbindin, I. O., Farombi, E. O., 2016. Suppression of the brain-pituitary-testicular axis function following acute arsenic and manganese co-exposure and withdrawal in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 39, 21–29. Doi:10.1016/j.jtemb.2016.07.001
- Aebi, H., 1984. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 105(C), 121–126. Doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- Agarwal, A., Saleh, R. A., Bedaiwy, M. A., 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*, 79(4), 829–843. Doi:10.1016/S0015-0282(02)04948-8
- Amann, R.P., 1961. Reproductive Capacity of Dairy Bulls IV. Spermatogenesis and testicular germ cell degeneration. *Am J Anat.* 110, 49–67.
- Amann, R. P., Almquist, J. O., 1962. Reproductive Capacity of Dairy Bulls. VIII. Direct and Indirect Measurement of Testicular Sperm Production. *Journal of Dairy Science*, 45(6), 774–781. Doi:10.3168/jds.S0022-0302(62)89487-9
- Amann, R.P., Schanbacher, B.D., 1983. Physiology of male reproduction. *J. Anim. Sci.* 380–403.
- Aswathanarayan, J., Rai Vittal, R., Muddegowda, U., 2017. Anticancer activity of metal nanoparticles and their peptide conjugates against human colon adenorectal carcinoma cells. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(7), 1444–1451. Doi:10.1080/21691401.2017.1373655
- Benoist, D., Stones, R., Benson, A. P., Fowler, E. D., Drinkhill, M. J., Hardy, M. E. L., Saint, D. A., Cazorla, O., Bernus, O., White, E., 2014. Systems approach to the study of stretch and arrhythmias in right ventricular failure induced in rats by monocrotaline. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 115(2–3), 162–172.

Doi:10.1016/j.pbiomolbio.2014.06.008

- Benzie, I. F. F., Strain, J. J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76
- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., Dada, R., 2017. Oxidative stress and male infertility. *Nature Reviews Urology*, 14(8), 470–485. Doi:10.1038/nrurol.2017.69
- Buege, J. A., Aust, S. D., 1978. Biomembranes - Part C: Biological Oxidations. *Methods in Enzymology*, 52, 302–310.
- Chester, A. H., Yacoub, M. H., Moncada, S., 2017. Nitric oxide and pulmonary arterial hypertension. *Global Cardiology Science and Practice*, 2017(2). Doi:10.21542/gcsp.2017.14
- Colli, L. G., Belardin, L. B., Echem, C., Akamine, E. H., Antoniassi, M. P., Andretta, R. R., Mathias, L. S., Rodrigues, S. F. P., Bertolla, R. P., Carvalho, M. H. C., 2019. Systemic arterial hypertension leads to decreased semen quality and alterations in the testicular microcirculation in rats. *Scientific Reports*, 9:11047.
- Coons, J. C., Pogue, K., Kolodziej, A. R., Hirsch, G. A., George, M. P., 2019. Pulmonary Arterial Hypertension: a Pharmacotherapeutic Update. *Current Cardiology Reports*, 21(11). Doi:10.1007/s11886-019-1235-4
- Craig, J. R., Jenkins, T. G., Carrell, D. T., Hotaling, J. M., 2017. Obesity, male infertility, and the sperm epigenome. *Fertility and Sterility*, 107(4), 848–859. Doi:10.1016/j.fertnstert.2017.02.115
- De Sousa, E. C., Abrahin, O., Ferreira, A. L. L., Rodrigues, R. P., Alves, E. A. C., Vieira, R. P. 2017. Resistance training alone reduces systolic and diastolic blood pressure in prehypertensive and hypertensive individuals: meta-analysis. *Hypertension Research*, 40(11), 927–931. Doi:10.1038/hr.2017.69
- Deng, N., Kohn, T. P., Lipshultz, L. I., Pastuszak, A. W., 2018. The Relationship Between Shift

- Work and Men's Health. *Sexual Medicine Reviews*, 6(3), 446–456. Doi:10.1016/j.sxmr.2017.11.009
- Dias, F. C. R., Gomes, M. de L. M., Melo, F. C. S. A. de, Menezes, T. P., Martins, A. L., Cupertino, M. do C., Otoni, W. C., Matta, S. L. P., 2020. Pfaffia glomerata hydroalcoholic extract stimulates penile tissue in adult Swiss mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 261(April). Doi:10.1016/j.jep.2020.113182
- Dias, F. C. R., Martins, A. L. P., de Melo, F. C. S. A., Cupertino, M. do C., Gomes, M. de L. M., de Oliveira, J. M., Damasceno, E. M., Silva, J., Otoni, W. C., da Matta, S. L. P., 2019. Hydroalcoholic extract of Pfaffia glomerata alters the organization of the seminiferous tubules by modulating the oxidative state and the microstructural reorganization of the mice testes. *Journal of Ethnopharmacology*, 233, 179–189. Doi:10.1016/j.jep.2018.12.047
- Dieterich, S., Bieligg, U., Beulich, K., Hasenfuss, G., Prestle, J., 2000. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart : Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. *Circulation*, 101(1), 33–39. doi:10.1161/01.cir.101.1.33
- Feng, W., Wang, J., Yan, X., Zhai, C., Shi, W., Wang, Q., Zhang, Q., Li, M., 2019. Paclitaxel alleviates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension via inhibition of FoxO1-mediated autophagy. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 392(5), 605–613. Doi:10.1007/s00210-019-01615-4
- Filomeni, G., De Zio, D., Cecconi, F., 2014. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death & Differentiation*, 22(3), 377–388. Doi:10.1038/cdd.2014.150
- Gao, F., Li, G., Liu, C., Gao, H., Wang, H., Liu, W., Chen, M., Shang, Y., Wang, L., Shi, J., Xia, W., Jiao, J., Gao, F., Li, J., Chen, L., Li, W., 2018. Autophagy regulates testosterone synthesis by facilitating cholesterol uptake in Leydig cells. *Journal of Cell Biology*,

- 217(6), 2103–2119. Doi:10.1083/jcb.201710078
- Giaid, a D. E. L. G., Aleh, D. I. N. a S. (1995). Reduced Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Lungs of Patients With Pulmonary Hypertension. *The New England Journal of Medicine*. 214–221.
- Guazzi, M., Naeji, R., 2017. Pulmonary Hypertension in Heart Failure: Pathophysiology, Pathobiology, and Emerging Clinical Perspectives. *Journal of the American College of Cardiology*. 69(13), 1718-1734. Doi:10.1016/j.jacc.2017.01.051
- Güzel, N. A., Hazar, S., Erbas, D., 2007. Effects of different resistance exercise protocols on nitric oxide, lipid peroxidation and creatine kinase activity in sedentary males. *Journal of Sports Science and Medicine*, 6(4), 417–422.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B., 1974. Glutathione S-Transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7140.
- Hales, D. B., 2002. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *Journal of Reproductive Immunology*, 57(1–2), 3–18. Doi:10.1016/S0165-0378(02)00020-7
- Hales, D. B., Diemer, T., Held Hales, K., 1999. Role of cytokines in testicular function. *Endocrine*, 10(3), 201–217. Doi:10.1007/bf02738619
- Holdcraft, R. W., Braun, R. E., 2003. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development*, 131(2), 459–467. Doi:10.1242/dev.00957
- Hooper, D. R., Kraemer, W. J., Focht, B. C., Volek, J. S., DuPont, W. H., Caldwell, L. K., Maresh, C. M., 2017. Endocrinological Roles for Testosterone in Resistance Exercise Responses and Adaptations. *Sports Medicine*, 47(9), 1709–1720. Doi:10.1007/s40279-017-0698-y
- Hornberger, T. A., Farrar, R. P., 2004. *Physiological Hypertrophy of the FHL Muscle Following 8 Weeks of Progressive Resistance Exercise in the Rat*. 16–31.

- Hotta, Y., Kataoka, T., Kimura, K., 2019. Testosterone Deficiency and Endothelial Dysfunction: Nitric Oxide, Asymmetric Dimethylarginine, and Endothelial Progenitor Cells. *Sexual Medicine Reviews*, 7(4), 661–668. Doi:10.1016/j.sxmr.2019.02.005
- Johnsen, S.G., 1970. Testicular biopsy score count - a method for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and Results in 335 Hypogonadal males. *Hormones*. 2–25.
- Johnson, L., Neaves, W. B., 1981. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *Biology of Reproduction*, 24(3), 703–712. Doi:10.1095/biolreprod24.3.703
- Karnovsky, M. J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 15, 127–137
- Lauersen, J. B., Andersen, T. E., Andersen, L. B. 2018. Strength training as superior, dose-dependent and safe prevention of acute and overuse sports injuries: a systematic review, qualitative analysis and meta-analysis. *British Journal Of Sports Medicine*, 52(24), 1557-1563. doi: 10.1136/bjsports-2018-099078.
- Lee, J., Giordano, S., Zhang, J., 2012. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: Cross-talk and redox signalling. *Biochemical Journal*, 441(2), 523–540. Doi:10.1042/BJ20111451
- Lee, S. J., Smith, A., Guo, L., Alastalo, T. P., Li, M., Sawada, H., Liu, X., Chen, Z. H., Ifedigbo, E., Jin, Y., Feghali-Bostwick, C., Ryter, S. W., Kim, H. P., Rabinovitch, M., Choi, A. M. K., 2011. Autophagic protein LC3B confers resistance against hypoxia-induced pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183(5), 649–658. Doi:10.1164/rccm.201005-0746OC
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P., & Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233(C), 346–

357. Doi:10.1016/S0076-6879(94)33040-9
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., Abete, P., 2018. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757–772. Doi:10.2147/CIA.S158513
- Lima, G. D. de A., Sertorio, M. N., Souza, A. C. F., Menezes, T. P., Mouro, V. G. S., Gonçalves, N. M., Oliveira, J. M. de, Henry, M., Machado-Neves, M., 2018. Fertility in male rats: Disentangling adverse effects of arsenic compounds. *Reproductive Toxicology*, 78, 130–140. Doi: 10.1016/j.reprotox.2018.04.015
- Mäkelä, J. A., Koskenniemi, J. J., Virtanen, H. E., Toppari, J., 2018. Testis Development. *Endocrine Reviews*, 40(4), 857–905. Doi:10.1210/er.2018-00140
- Maleki, B. H., Tartibian, B., Chehrazi, M. 2017. Effects of aerobic, resistance, and combined exercise on markers of male reproduction in healthy human subjects: a randomized controlled trial. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 33(4), 1130-1145. doi: 10.1519/jsc.0000000000002389.
- Martin, Y. N., Pabelick, C. M., 2019. Sex differences in the pulmonary circulation: Implications for pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 306(9). Doi:10.1152/ajpheart.00857.2013
- Montani, D., Günther, S., Dorfmueller, P., Perros, F., Girerd, B., Garcia, G., Sitbon, O., 2013. Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8(1), 97. Doi:10.1186/1750-1172-8-97
- Moudgil, R., Michelakis, E. D., Archer, S. L., 2006. The Role of K⁺Channels in Determining Pulmonary Vascular Tone, Oxygen Sensing, Cell Proliferation, and Apoptosis: Implications in Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction and Pulmonary Arterial Hypertension. *Microcirculation*, 13(8), 615–632. Doi:10.1080/10739680600930222
- Mouro, V. G. S., Martins, A. L. P., Silva, J., Menezes, T. P., Gomes, M. L. M., Oliveira, J. A.,

- Melo, F. C. S. A., Matta, S. L. P., 2019. Subacute testicular toxicity to cadmium exposure intraperitoneally and orally. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. Doi:10.1155/2019/3429635
- O'Donnell, L., McLachlan, R. I., Wreford, N. G., De Kretser, D. M., Robertson, D. M., 1996. Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. *Biology of Reproduction*, 55(4), 895–901. Doi:10.1095/biolreprod55.4.895
- Ornatowski, W., Lu, Q., Yegambaram, M., Garcia, A. E., Zemskov, E. A., Maltepe, E., Fineman, J. R., Wang, T., Black, S. M., 2020. Complex interplay between autophagy and oxidative stress in the development of pulmonary disease. *Redox Biology*, 36(June), 101679. Doi:10.1016/j.redox.2020.101679
- Otsuki, T., Nakamura, F., Zempo-Miyaki, A., 2019. Nitric Oxide and Decreases in Resistance Exercise Blood Pressure With Aerobic Exercise Training in Older Individuals. *Frontiers in Physiology*, 10(September), 1–9. Doi:10.3389/fphys.2019.01204
- Pollock, M. L., Franklin, B. A., Balady, G. J., Chaitman, B. L., Fleg, J. L., Fletcher, B., ... Bazzarre, T., 2000. Resistance Exercise in Individuals With and Without Cardiovascular Disease : Benefits, Rationale, Safety, and PrescriptionAn Advisory From the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, American Heart Association. *Circulation*, 101(7), 828–833. Doi:10.1161/01.cir.101.7.828
- Russell, L. D., Ettlin, R. A., Hikim, A. P. S., Clegg, E. D., 1990. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. *International Journal of Andrology*, 16(1), 83–83. Doi:10.1111/j.1365-2605.1993.tb01156.x
- Sarkar, S., Korolchuk, V. I., Renna, M., Imarisio, S., Fleming, A., Williams, A., Garcia-Arencibia, M., Rose, C., Luo, S., Underwood, B. R., Kroemer, G., O'Kane, C. J., Rubinsztein, D. C., 2011. Complex Inhibitory Effects of Nitric Oxide on Autophagy.

- Molecular Cell*, 43(1), 19–32. Doi:10.1016/j.molcel.2011.04.029
- Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Wilkins, M. R., Grimminger, F., 2011. Mechanisms of disease: Pulmonary arterial hypertension. *Nature Reviews Cardiology*, 8(8), 443–455. Doi:10.1038/nrcardio.2011.87
- Sharpe, R. M., Franks, S., 2002. Environment, lifestyle and infertility--an inter-generational issue. *Nat Cell Biol*. Doi: 10.1038/ncb-nm-fertilityS33
- Shin, S. W., Kim, S. Y., Park, J. W., 2012. Autophagy inhibition enhances ursolic acid-induced apoptosis in PC3 cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823(2), 451–457. Doi:10.1016/j.bbamcr.2011.10.014
- Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D. S., Denton, C. P., Gatzoulis, M. A., Krowka, M., Souza, R., 2018. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*, 1801913. Doi:10.1183/13993003.01913-2018
- Smith, L. B., Walker, W. H., 2015. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 30, 2–13. Doi:10.1016/j.semcdb.2014.02.012
- Soares, L. L., Drummond, F. R., Rezende, L. M. T., Lopes Dantas Costa, A. J., Leal, T. F., Fidelis, M. R., Neves, M. M., Prímola-Gomes, T. N., Carneiro-Junior, M. A., Carlo Reis, E. C., Natali, A. J., 2018. Voluntary running counteracts right ventricular adverse remodeling and myocyte contraction impairment in pulmonary arterial hypertension model. *Life Sciences*, 238(July), 116974. Doi:10.1016/j.lfs.2019.116974
- Souza, A. C. F., Marchesi, S. C., Ferraz, R. P., Lima, G. D. de A., Oliveira, J. A., Machado-Neves, M., 2016. Effects of sodium arsenate and arsenite on male reproductive functions in Wistar rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 79(6), 274–286. Doi:10.1080/15287394.2016.1150926
- Stenmark, K. R., Meyrick, B., Galie, N., Mooi, W. J., McMurtry, I. F., 2009. Animal models

- of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 297(6), L1013–L1032. Doi:10.1152/ajplung.00217.2009
- Tabima, D. M., Chesler, N. C., 2010. The effects of vasoactivity and hypoxic pulmonary hypertension on extralobar pulmonary artery biomechanics. *Journal of Biomechanics*, 43(10), 1864–1869. Doi:10.1016/j.jbiomech.2010.03.033
- Tae, H. J., Jang, B. G., Ahn, D. C., Choi, E. Y., Kang, H. S., Kim, N. S., Lee, J. H., Park, S. Y., Yang, H. H., Kim, I. S., 2005. Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus karpowi*) during the breeding and non-breeding seasons. *Veterinary Research Communications*, 29(7), 629–643. Doi:10.1007/s11259-005-3080-8
- Thenappan, T., Ormiston, M. L., Ryan, J. J., Archer, S. L., 2018. Pulmonary arterial hypertension: Pathogenesis and clinical management. *BMJ (Online)*, 360(fig 1). Doi:10.1136/bmj.j5492
- Thomé, M. P., Filippi-Chiela, E. C., Villodre, E. S., Migliavaca, C. B., Onzi, G. R., Felipe, K. B., Lenz, G., 2016. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. *Journal of Cell Science*, 129(24), 4622–4632. Doi:10.1242/jcs.195057
- Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., 1994. Lysosomal Proton Pump Activity: Supravital Cell Staining with Acridine Orange Differentiates Leukocyte Subpopulations. *Methods in Cell Biology*, 41(C), 185–194. Doi:10.1016/S0091-679X(08)61717-3
- Tsikas, D., 2007. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 851(1–2), 51–70. Doi:10.1016/j.jchromb.2006.07.054
- Van Citters, R. L., Franklin, D. L., 1969. Cardiovascular performance of Alaska sled dogs

- during exercise. *Circulation Research*, 24(1), 33–42. Doi:10.1161/01.RES.24.1.33
- Vecchia, L. A. D., Bussotti, M., 2018. Exercise training in pulmonary arterial hypertension. *Journal of Thoracic Disease*, 10(1), 508–521. Doi:10.21037/jtd.2018.01.90
- Vingren, J. L., Kraemer, W. J., Ratamess, N. A., Anderson, J. M., Volek, J. S., Maresh, C. M., 2010. Testosterone Physiology in Resistance Exercise and Training. *Sports Medicine*, 40(12), 1037–1053. Doi:10.2165/11536910-000000000-00000
- Wang, J. Y., Lee, Y. J., Chou, M. C., Chang, R., Chiu, C. H., Liang, Y. J., Wu, L. S., 2015. Astaxanthin protects steroidogenesis from hydrogen peroxide-induced oxidative stress in mouse Leydig cells. *Marine Drugs*, 13(3), 1375–1388. Doi:10.3390/md13031375
- Wang, B. J., Zheng, W. L., Feng, N. N., Wang, T., Zou, H., Gu, J. H., Yuan, Y., Liu, X. Z., Liu, Z. P., Bian, J. C., 2018. The effects of autophagy and PI3K/AKT/m-TOR signaling pathway on the cell-cycle arrest of rats primary sertoli cells induced by zearalenone. *Toxins*, 10(10). Doi:10.3390/toxins10100398
- Wu, W. H., Yuan, P., Zhang, S. J., Jiang, X., Wu, C., Li, Y., Liu, S. F., Liu, Q. Q., Li, J. H., Pudasaini, B., Hu, Q. H., Dupuis, J., Jing, Z. C., 2018. Impact of pituitary-gonadal axis hormones on pulmonary arterial hypertension in men. *Hypertension*, 72(1), 151–158.
- Wynn, T. A., Barron, L., 2010. Macrophages: Master regulators of inflammation and fibrosis. *Seminars in Liver Disease*, 30(3), 245–257. Doi:10.1055/s-0030-1255354
- Yeh, S., Tsai, M.-Y., Xu, Q., Mu, X.-M., Lardy, H., Huang, K.-E., Chang, C., 2002. Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: An in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13498–13503. Doi:10.1073/pnas.212474399
- You, T., Arsenis, N. C., Disanzo, B. L., Lamonte, M. J., 2013. Effects of exercise training on chronic inflammation in obesity: Current evidence and potential mechanisms. *Sports Medicine*, 43(4), 243–256. Doi:10.1007/s40279-013-0023-3

Zhao, X., Xu, W., Wu, J., Zhang, D., Abou-Shakra, A., Di, L., Wang, Z., Wang, L., Yang, F., Qiao, Z., 2018. Nicotine induced autophagy of Leydig cells rather than apoptosis is the major reason of the decrease of serum testosterone. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 100(February), 30–41. Doi:10.1016/j.biocel.2018.05.001

Tabela suplementar 1: Parâmetros testiculares de ratos Wistas saudáveis, submetidos ou não ao treinamento físico de resistência (TFR).

Parâmetros	Controle sedentário	Controle TFR
Peso corporal inicial (g)	204,102 ± 11,792	207,30 ± 7,24
Peso corporal final (g)	296,60 ± 16,61	308,61 ± 16,18
Ganho de peso corporal (g)	92,50 ± 14,56	101,40 ± 20,42
Testículo (g)	1,62 ± 0,07	1,60 ± 0,09
Testículos (g/100g)	0,53 ± 0,04	0,51 ± 0,02
Epidídimo (mg)	50,34 ± 2,76	52,20 ± 1,60
Epidídimo (mg/100g)	16,80 ± 1,20	16,98 ± 1,14
Próstata ventral (mg)	50,67 ± 12,87	63,14 ± 13,58
Próstata ventral (mg/100 g)	16,11 ± 4,05	21,18 ± 4,61
Vesícula Seminal (mg)	103,21 ± 27,28	108,72 ± 22,36
Vesícula Seminal (mg/100 g)	34,90 ± 9,67	35,21 ± 7,09
<i>Morfometria Testicular</i>		
Diâmetro tubular (µm)	289,31 ± 6,14	317,02 ± 13,56*
Diâmetro luminal (µm)	169,52 ± 11,74	186,90 ± 13,76
Altura do epitélio (µm)	59,90 ± 5,60	65,04 ± 4,38
<i>Proporção volumétrica</i>		
Compartimento Tubular (%)	84,96 ± 0,21	85,72 ± 1,14
Epitélio Seminífero (%)	59,17 ± 0,62	59,03 ± 0,73
Túnica própria (%)	5,08 ± 0,14	4,89 ± 0,32
Lúmen (%)	20,71 ± 0,69	21,70 ± 1,47
Compartimento Intertubular (%)	15,04 ± 0,21	14,28 ± 1,14
<i>Proporção volumétrica</i>		
Tecido conjuntivo (%)	2,87 ± 0,60	2,79 ± 0,30
Espaço linfático (%)	0,38 ± 0,24	0,18 ± 0,10

Vaso sanguíneo (%)	1,39 ± 0,54	1,70 ± 0,67
Macrófagos (%)	0,47 ± 0,10	0,35 ± 0,10
Célula de Leydig (%)	9,94 ± 0,84	9,26 ± 0,21
<i>Volume</i>		
Tecido conjuntivo (mL)	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,008
Espaço linfático (mL)	0,01 ± 0,008	0,01 ± 0,003
Vaso Sanguínea (mL)	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,01
Macrófagos (mL)	0,01 ± 0,005	0,01 ± 0,003
Células de Leydig (mL)	0,30 ± 0,07	0,27 ± 0,03
 <i>Morfometria das células de Leydig</i>		
Diâmetro nuclear (µm)	6,80 ± 0,25	7,08 ± 0,26
Porcentagem nuclear (%)	1,78 ± 0,60	1,60 ± 0,20
Porcentagem Citoplasmática (%)	8,16 ± 0,55	7,66 ± 0,80
Volume nuclear (µm ³)	165,48 ± 18,85	187,26 ± 24,38
Volume Citoplasmático (µm ³)	833,19 ± 276,98	921,67 ± 257,34
Volume celular (µm ³)	998,67 ± 258,61	1108,93 ± 280,05
Número de células/testículo (×10 ⁶)	3645,28 ± 31,51	3400,05 ± 15,91
 <i>Morfometria da secção tubular em estágio I</i>		
Espermatogônia do Tipo A	3,37 ± 0,35	3,48 ± 0,40
Espermatócito primário em préleptóteno/leptóteno	33,45 ± 2,48	33,69 ± 0,62
Espermatócito primário em paquíteno	44,67 ± 4,62	44,83 ± 1,21
Espermátide arredondada	103,30 ± 13,78	108,41 ± 7,96
Número de células germinativas	184,82 ± 8,98	190,47 ± 3,86
Célula de Sertoli	7,29 ± 0,81	6,88 ± 0,54
Índice mitótico	10,25 ± 1,31	9,77 ± 1,36
Índice meiótico	2,30 ± 0,17	2,41 ± 0,15
Índice de célula de Sertoli	15,36 ± 2,58	16,25 ± 1,46

Número de células de Sertoli/testículo ($\times 10^6$)	9,07 \pm 1,96	8,17 \pm 1,48
Número de células de Sertoli/g/testículo ($\times 10^6$)	6,94 \pm 1,66	5,72 \pm 1,09
Capacidade de suporte da célula de Sertoli	27,29 \pm 3,77	28,22 \pm 2,31
Rendimento da espermatogênese	31,48 \pm 3,48	31,42 \pm 2,71
Produção espermática diária ($\times 10^6$)	27,11 \pm 3,96	22,63 \pm 3,98
Produção espermática diária /g/testículo ($\times 10^6$)	18,32 \pm 4,29	14,46 \pm 2,01
<i>Bioquímica</i>		
Testosterona sérica (ng/dL)	73,26 \pm 3,16	70,76 \pm 5,01
Colesterol (mg/g de tecido)	1,40 \pm 0,09	1,49 \pm 0,19
Glicose (Ug/g de tecido)	559,91 \pm 99,32	412,47 \pm 51,55*
Triglicerídeos (mg/g de tecido)	14,73 \pm 1,64	11,19 \pm 3,30
<i>Patologias</i>		
Túbulos normais (%)	95,24 \pm 1,22	92,02 \pm 5,81
Túbulos patológicos de grau leve (%)	4,78 \pm 0,46	8,02 \pm 5,04
Túbulos patológicos de grau moderado (%)	0,06 \pm 0,04	0,16 \pm 0,17
<i>Estresse oxidativo</i>		
SOD (U/mg proteína)	37,56 \pm 12,3	35,61 \pm 9,57
CAT (kU/mL)	277,91 \pm 29,25	243,29 \pm 30,54
GST (μ mol/min/g)	23,36 \pm 3,51	19,15 \pm 4,57
ON (μ M)	2,62 \pm 0,17	2,97 \pm 0,12*
MDA (μ M/mg proteína)	25,12 \pm 5,68	19,89 \pm 2,30
PC (nmol/ml)	15,63 \pm 1,58	16,76 \pm 3,54
FRAP (uM/Fe ²⁺)	0,19 \pm 0,02	0,21 \pm 0,03

*Viabilidade celular e atividade autofágica**Compartimento tubular*

Células viáveis (%)	98,84 ± 0,67	97,72 ± 1,06
Células em processo (%)	1,02 ± 0,02	1,02 ± 0,01
Células inviáveis (%)	0,75 ± 0,07	0,97 ± 0,04
Atividade autofágica (%)	10,33 ± 0,80	12,07 ± 1,53

Compartimento intertubular

Células viáveis (%)	98,56 ± 1,02	98,74 ± 0,50
Células em processo (%)	0,02 ± 0,007	0,02 ± 0,006
Células inviáveis (%)	0,74 ± 0,08	0,98 ± 0,02
Atividade autofágica (%)	2,55 ± 0,57	2,21 ± 0,43

Valores expressos em média ± D.P.M. *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre animais saudáveis sedentários (controle sedentário) e animais saudáveis submetido ao treinamento físico resistido (controle TFR) pelo teste *t* de Student.

CONCLUSÕES GERAIS

Colaborando com a compreensão da doença hipertensão arterial pulmonar, concluímos que os danos provocados nos pulmões/coração acarretam em problemas sistêmicos que culminam em problemas testiculares, comprometendo a organização do parênquima e prejudicando a produção espermática. Ao mesmo tempo, mostramos que a prática de treinamento físico resistido atenua os danos provocados pela doença nos testículos, trazendo perspectivas para futuros trabalhos associando a prática de atividade física e medicamentos para combater as injúrias provocadas pela doença.

ANEXO I



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-900- Telefone: (31) 3612 2315

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, CEUA/UFV, certifica que o Processo nº 38/2021, com o Projeto de Pesquisa intitulado, “**A Hipertensão artéria pulmonar pode afetar órgãos não-alvos de ratos Wistar machos?**”, coordenado pela professora Mariana Machado Neves do Departamento de Biologia Geral, está de acordo com a legislação vigente, Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008, com as Resoluções Normativas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal, CONCEA e, apresenta especificidade, caracterizando “*A não utilização de animais vivos*”, portanto sendo aprovado por esta comissão em 29 de junho de 2021.

CERTIFICATE

The Ethics Committee in Use of Animals of the University of Federal de Viçosa, CEUA-UFV, certify that the 38/2021 Process, with the Research Project titled, “**Can Pulmonary Artery Hypertension Affect Non-Target Organs in Male Wistar Rats?**”, coordinated by Mariana Machado Neves teacher of Department of General Biology, is of according to current legislation, Law No. 11,794, of October 08, 2008, with the Normative Resolutions issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation, CONCEA and, presents specificity, characterizing "Non-use of live animals", therefore being approved by this commission in June 29, 2021.

Prof. Mariella Bontempo Duca de Freitas
Coordenadora
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV