

**MÍRIAN QUINTÃO ASSIS**

**HIPERTENSÃO ARTERIAL E TREINAMENTO FÍSICO COMBINADO: EFEITOS  
SOBRE PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE RATOS WISTAR**

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

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2023**

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

T

A848h  
2023  
Assis, Mírian Quintão, 1995-  
Hipertensão arterial e treinamento físico combinado: efeitos  
sobre parâmetros reprodutivos de ratos Wistar / Mírian Quintão  
Assis. – Viçosa, MG, 2023.  
1 dissertação eletrônica (141 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Orientador: Mariana Machado Neves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Geral, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.303>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Ratos - Reprodução. 2. Hipertensão. 3. Exercícios físicos.  
4. Testículos. 5. Espermatozoides. 6. Ratos como animais de  
laboratório. I. Neves, Mariana Machado, 1977-. II. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa  
de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 599.352

MÍRIAN QUINTÃO ASSIS

**HIPERTENSÃO ARTERIAL E TREINAMENTO FÍSICO COMBINADO: EFEITOS  
SOBRE PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE RATOS WISTAR**

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: 28 de fevereiro de 2023.

Assentimento:



Documento assinado digitalmente

MIRIAN QUINTAO ASSIS

Data: 23/05/2023 10:58:00-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Mírian Quintão Assis

Autora



Documento assinado digitalmente

MARIANA MACHADO NEVES

Data: 23/05/2023 20:11:29-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Mariana Machado Neves

Orientadora

## AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus por ter abençoado os percursos desta caminhada e por ter me dado forças para superar as dificuldades.

Agradeço à toda a minha família, tias(os), primas(os) e, em especial, aos meus pais, Sebastião e Maria Aparecida, e meus irmãos, Cristian e Vivian. Amo vocês e obrigada por serem exemplos, por não medirem esforços para eu ter chegado até aqui e terem me dado todo o suporte necessário durante todos esses anos.

Agradeço ao Pedro, meu companheiro de todas as horas, que percorreu junto comigo a graduação e agora a pós-graduação. Te amo e muito obrigada por ser e estar presente e me ajudar nas mais diversas situações.

Agradeço à BIO UFV, por todas as aprendizagens e, especialmente, por ter me proporcionado amizades que levarei para a vida.

Agradeço aos meus amigos que mesmo de longe, também se fizeram presentes e estiveram sempre comigo tornando as dificuldades mais suportáveis, compartilhando conhecimentos e alegrias. Em especial Andreia, Abdy, Rafael, Rosa, Pilar e Thays.

Agradeço às minhas amigas de república, Ana, Katherine e Letícia. Obrigada por me fazerem sentir em casa e por sempre estarem do meu lado. Pelas conversas, risadas, desabafos, carinho e apoio. Obrigada por serem pacientes e compreensíveis com a minha ausência, principalmente nesta etapa final do mestrado.

Aos amigos do LARAT. Em especial Daniel, Felipe, Isabela, Izabela, Luiz Otávio, Mari, Renner e Thainá. Obrigada pelos horários de lanches, almoço e por todas as risadas e conversas. Muito obrigada por todo companheirismo, por toda ajuda e pelos ensinamentos ao longo deste período do mestrado. Eu só cheguei até aqui porque tive ao meu lado pessoas tão sensacionais como vocês. Este trabalho é nosso!

Agradeço também à Camila e Beth por terem feito parte desta jornada, por todas as conversas e por todo apoio.

Não poderia deixar de agradecer mais uma vez ao Luiz, pela amizade desde 2015. Obrigada por ter segurado minha mão durante todo esse tempo. Sou extremamente grata pelo

companheirismo e pela valiosa ajuda durante todas as fases do trabalho. Você é o meu presente da BIO e de Viçosa!

Agradeço ao Luciano Leite e demais colaboradores do Departamento de Educação Física, pela parceria e contribuição.

Agradeço aos meus professores, pelos ensinamentos e por serem exemplos de profissionais.

Um agradecimento especial à minha orientadora, Mariana Machado. Obrigada pela paciência, por me auxiliar e conduzir no desenvolvimento desta pesquisa e por me apoiar a tentar o doutorado.

Agradeço às professoras Ana Cláudia e Reggiani por terem gentilmente aceitado o convite para compor a banca e enriquecer o meu trabalho com importantes considerações.

Meu profundo e sincero agradecimento aos animais deste estudo!

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, por cada oportunidade, pelas vivências que me fizeram crescer e por ser a mais bonita das federais!

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que me proporcionou várias oportunidades durante a minha trajetória acadêmica e ainda pela concessão da bolsa de estudos na pós-graduação.

Eu não cheguei até aqui sozinha. Então agradeço a todas as pessoas, que de uma forma ou de outra, me auxiliaram e apoiaram durante todo esse processo. Tenho muito orgulho de dizer que essa conquista é nossa!

## RESUMO

ASSIS, Mírian Quintão, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Hipertensão arterial e treinamento físico combinado: efeitos sobre parâmetros reprodutivos de ratos Wistar.** Orientadora: Mariana Machado Neves.

A hipertensão arterial sistêmica é fator de risco para outras doenças cardiovasculares, sendo caracterizada pela persistência de pressão arterial elevada nas artérias sistêmicas. Outros tipos importantes de hipertensão também existem, incluindo hipertensão do sistema porta hepático, renovascular e pulmonar. A hipertensão arterial pulmonar (HAP), por exemplo, afeta principalmente a vasculatura do pulmão e promove vasoconstrição e remodelamento tecidual, impactando negativamente a função cardíaca devido a hipertrofia do ventrículo direito. Além dos danos conhecidos ao coração e pulmões decorrentes dos vários tipos de hipertensão, sabe-se que disfunções e danos teciduais em órgãos reprodutivos com comprometimento da atividade de enzimas antioxidantes e qualidade seminal são descritos em pacientes hipertensos. Neste contexto, o presente estudo objetivou aprofundar o conhecimento sobre distúrbios causados pela hipertensão arterial sistêmica e HAP nas funções dos órgãos reprodutivos, testículos e epidídimos. Para isso, primeiro realizou-se uma revisão sistemática que reuniu evidências experimentais da relação entre hipertensão arterial sistêmica e aparelho reprodutor masculino. O objetivo foi mostrar efeitos dessa doença sobre testículos, com foco nas alterações histológicas, hormonais e na atividade de enzimas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo em modelos murinos. De fato, hipertensão arterial compromete funções testiculares, tanto por distúrbios na produção hormonal quanto na produção de espermatozoides. O estresse oxidativo tem papel relevante na fisiologia testicular e espermática e parece ser um potente causador destes distúrbios. Posteriormente, conduziu-se um estudo experimental avaliando efeitos da HAP induzida com monocrotalina ( $60 \text{ mg kg}^{-1}$ ) sobre parâmetros testiculares e epididimários em ratos. Adicionalmente, verificou-se efeitos do treinamento físico combinado (TFC) sobre alterações causadas pela HAP nestes órgãos, uma vez que o TFC é indicado como uma possível estratégia terapêutica para HAP. Ratos Wistar machos adultos foram divididos em três grupos experimentais, a saber: controle sedentário; hipertenso sedentário e hipertenso exercício ( $n= 8/\text{grupo}$ ; CEUA nº 02/2021). Testículos e epidídimos foram dissecados e analisados quanto a características histológicas, histomorfométricas, atividade de enzimas antioxidantes e metabólitos oriundos do estresse oxidativo e avaliações espermáticas. Os dados foram submetidos ao teste t de *Student* e diferenças consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

Os resultados mostraram que animais sedentários com HAP tiveram redução do peso corporal e epididimário, da concentração sérica de testosterona e da contagem de túbulos seminíferos normais e alterações morfométricas testiculares. Além disso, observou-se desorganização na arquitetura dos túbulos seminíferos, comprometendo a produção espermática diária. Quando comparado com os efeitos da HAP, o TFC foi capaz de aumentar o percentual de túbulos seminíferos normais, alterar parâmetros morfométricos testiculares e aumentar a produção diária espermática. Pode-se concluir que a HAP causa efeitos negativos na organização e função testicular e compromete a produção de espermatozoides. O TFC foi uma estratégia eficaz para alguns parâmetros testiculares afetados pela HAP. Os resultados destes estudos auxiliam a entender potenciais efeitos da hipertensão em órgãos do sistema reprodutor masculino, de forma a identificar suas implicações para saúde humana e suas consequências sobre a reprodução masculina.

Palavras-chave: Pressão alta. Exercício físico. Testículos. Epidídimos. Espermatozoides.

## ABSTRACT

ASSIS, Mirian Quintão, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2023. **Arterial hypertension and combined physical training: effects on reproductive parameters of Wistar rats.** Adviser: Mariana Machado Neves.

Systemic arterial hypertension is a risk factor for other cardiovascular diseases, characterized by persistent high blood pressure in the systemic arteries. Other important types of hypertension also exist, including hepatic portal system, renovascular, and pulmonary hypertension. Pulmonary arterial hypertension (PAH), for example, mainly affects the vasculature of the lung and promotes vasoconstriction and tissue remodeling, negatively impacting cardiac function due to right ventricular hypertrophy. In addition to the known damage to the heart and lungs resulting from the various types of hypertension, it is known that dysfunctions and tissue damage in reproductive organs with impairment of antioxidant enzyme activity and seminal quality are described in hypertensive patients. In this context, the present study aimed to deepen the knowledge about disturbances caused by systemic arterial hypertension and PAH in the functions of the reproductive organs, testes and epididymis. For this, a systematic review was first carried out, gathering experimental evidence of the relationship between systemic arterial hypertension and the male reproductive system. The objective was to show the effects of this disease on testes, focusing on histological and hormonal changes and on the activity of antioxidant enzymes and markers of oxidative stress in murine models. In fact, arterial hypertension compromises testicular functions, both due to disturbances in hormone production and sperm production. Oxidative stress plays a relevant role in testicular and sperm physiology and seems to be a potent cause of these disorders. Subsequently, an experimental study was carried out evaluating the effects of PAH induced with monocrotaline ( $60 \text{ mg kg}^{-1}$ ) on testicular and epididymal parameters in rats. Additionally, effects of combined physical training (CPT) on changes caused by PAH in these organs were verified, since CPT is indicated as a possible therapeutic strategy for PAH. Adult male Wistar rats were divided into three experimental groups, namely: sedentary control; sedentary hypertensive and exercising hypertensive ( $n=8/\text{group}$ ; CEUA nº 02/2021). Testes and epididymis were dissected and analyzed for histological and histomorphometric characteristics, activity of antioxidant enzymes and metabolites from oxidative stress and sperm evaluations. Data were submitted to Student's t test and differences considered significant when  $p < 0.05$ . The results showed that sedentary animals with PAH had a reduction in body and epididymal weight, in serum testosterone concentration

and in normal seminiferous tubule counts and testicular morphometric changes. In addition, disorganization was observed in the architecture of the seminiferous tubules, compromising daily sperm production. When compared with the effects of PAH, CPT was able to increase the percentage of normal seminiferous tubules, alter testicular morphometric parameters and increase daily sperm production. It can be concluded that PAH causes negative effects on testicular organization and function and compromises sperm production. CPT was an effective strategy for some testicular parameters affected by PAH. The results of these studies help to understand the potential effects of hypertension on organs of the male reproductive system, in order to identify its implications for human health and its consequences on male reproduction.

Keywords: High pressure. Physical exercise. Testicles. Epididymis. Sperm.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	10
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
2.1. Hipertensão arterial sistêmica .....	12
2.2. Hipertensão arterial pulmonar .....	13
2.2.1 Estratégias terapêuticas e o treinamento físico combinado .....	16
2.3 Eventos fisiológicos envolvidos na hipertensão .....	18
2.4. Testículos, epidídimos e espermatozoides .....	22
2.5. Referências Bibliográficas .....	24
<b>3. CAPÍTULO 1: A hipertensão arterial sistêmica pode comprometer parâmetros testiculares de modelos murinos? Uma revisão sistemática</b> .....	38
<b>3.1 Resumo</b> .....	38
<b>3.2 Introdução</b> .....	39
<b>3.3 Materiais e métodos</b> .....	41
<b>3.4 Resultados</b> .....	44
<b>3.5 Discussão</b> .....	60
<b>3.6 Conclusões e perspectivas</b> .....	68
<b>3.7 Referências Bibliográficas</b> .....	69
<b>3.8 Anexos</b> .....	85
<b>4. CAPÍTULO 2: Efeitos do treinamento físico combinado sobre morfologia e funcionalidade testicular e epididimária em animais com hipertensão arterial pulmonar</b> .....	91
<b>4.2 Introdução</b> .....	92
<b>4.3 Materiais e métodos</b> .....	94
<b>4.4. Resultados</b> .....	109
<b>4.5 Discussão</b> .....	122
<b>4.6. Conclusão</b> .....	128
<b>4.7. Referências bibliográficas</b> .....	128
<b>5. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	141

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A hipertensão arterial sistêmica é fator de risco para outras doenças cardiovasculares, sendo caracterizada pela persistência de pressão arterial elevada nas artérias sistêmicas (Oparil et al., 2018). Além desta, que é popularmente chamada de pressão alta, também existem outros tipos importantes de hipertensão, como a do sistema porta hepático (Hernández-Gea et al., 2018), a renovascular (Herrmann & Textor, 2019) e a pulmonar (Hoeper et al., 2013; Simonneau et al., 2013). Quando consideramos a hipertensão pulmonar, esta abarca múltiplas condições clínicas que são classificadas em grupos distintos, como o da hipertensão arterial pulmonar (HAP). A HAP afeta principalmente a vasculatura do pulmão promovendo sua vasoconstrição e remodelamento. Conseqüentemente, a HAP causa hipertrofia do ventrículo direito do coração, sendo essa um dos principais fatores de prognóstico desfavorável nesses pacientes (Coons et al., 2019; Thenappan et al., 2018).

A literatura descreve o impacto dos vários tipos de hipertensão em órgãos-alvo, como coração e pulmões, sendo que hipertensão arterial merece atenção quanto às alterações diretas que causa no organismo, mas também devido suas conseqüências para a funcionalidade de outros sistemas orgânicos (Colli et al., 2019; Oparil et al., 2018). A função sexual masculina normal depende da integridade funcional de processos neurais, vasculares e hormonais (Bansal, 1988). Sabe-se que pacientes hipertensos apresentam comprometimento de outras funções, entre elas podemos destacar disfunções eréteis e reprodutivas masculinas (Aranda et al., 2004; Barroso et al., 2021), comprometimento da atividade de enzimas antioxidantes (Adedara et al., 2018; Guimarães-Ervilha, 2021), desorganização da histologia testicular (Guimarães-Ervilha, 2021) e redução da qualidade seminal (Guo et al., 2017).

Diante deste contexto, o presente estudo objetivou aprofundar o conhecimento sobre problemas causados pela hipertensão arterial sistêmica e pulmonar nas funções dos órgãos reprodutivos testículos e epidídimos. No capítulo 1, o artigo intitulado “A hipertensão arterial

sistêmica pode comprometer parâmetros testiculares de modelos murinos? Uma revisão sistemática”, sistematiza evidências experimentais que relacionam a hipertensão arterial sistêmica e o aparelho reprodutor masculino. Portanto, o foco foi mostrar os efeitos dessa doença sobre testículos de modelos murinos, especialmente histologia, hormônios e atividade de enzimas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo. No capítulo 2, foi desenvolvido um estudo experimental intitulado “Efeitos do treinamento físico combinado sobre a morfologia e funcionalidade testicular e epididimária em animais com hipertensão arterial pulmonar”. Neste artigo, foram avaliados os efeitos da HAP sobre parâmetros testiculares e epididimários e os efeitos da prática do treinamento físico combinado sobre estes parâmetros reprodutivos de animais com HAP. Portanto, os resultados destes estudos visam ajudar a entender os potenciais efeitos da hipertensão em órgãos do sistema reprodutor masculino, de forma a identificar suas implicações para a saúde humana e entender suas consequências sobre a reprodução masculina.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Hipertensão arterial sistêmica

Em 2001, 7,6 milhões de mortes prematuras em todo o mundo foram atribuídas à pressão arterial elevada (Lawes et al., 2008). Esse número aumentou para 8,5 milhões em 2015, sendo a hipertensão arterial sistêmica (HAS) a principal causa dessa mortalidade, principalmente em países de baixa e média renda (Zhou et al., 2021). A HAS, também conhecida como hipertensão ou pressão alta, é uma condição de risco para desenvolvimento de outras doenças, incluindo derrames, isquemia cardíaca, doença renal crônica e até comprometimento cognitivo. É caracterizada pela persistência de pressão arterial elevada nas artérias sistêmicas, com pressão arterial sistólica média  $\geq 140$  mmHg e/ou pressão arterial diastólica média  $\geq 90$  mmHg (Barroso et al., 2021; Unger et al., 2020; Williams et al., 2018). O aumento da pressão arterial é decorrente da elevação do débito cardíaco e/ou da resistência vascular periférica, que ocorrem por causa de desequilíbrios na manutenção de mecanismos envolvidos no controle da pressão, podendo ser genéticos, hemodinâmicos, neurais, imunológicos e renais (Dikalov & Ungvari, 2013; Jordan et al., 2018; Oparil et al., 2018). Associado a isso, alta ingestão de sódio, baixa ingestão de potássio, obesidade, consumo de álcool, sedentarismo e dieta pouco saudável contribuem para o desenvolvimento da hipertensão (Mills et al., 2020; Oparil et al., 2018). Por fim, a sua ocorrência aumenta progressivamente com o avançar da idade, apresentando uma prevalência  $> 60\%$  em pessoas com idade  $> 60$  anos (Chow et al., 2013).

Uma das formas mais usadas para diagnosticar a hipertensão é a medição da pressão arterial em vários momentos para, ao final, se confirmar a elevação persistente da pressão, bem como a classificação do estado de hipertensão na prática clínica (Williams et al., 2018). O histórico familiar do paciente, a identificação de causas secundárias e a avaliação do risco cardiovascular e de lesão em órgãos-alvo também são considerados no diagnóstico, utilizando exame físico e investigação clínica e laboratorial (Barroso et al., 2021; Jordan et al., 2018;

Oparil et al., 2018). O correto diagnóstico é imprescindível para o controle da hipertensão, de forma a evitar complicações importantes, como o desenvolvimento de doenças cardiovasculares associadas.

Várias intervenções podem ser feitas para prevenir, controlar ou reduzir a pressão arterial, como mudanças no estilo de vida, com prática de exercício físico e controle da alimentação, e intervenções farmacológicas. Drogas que têm como alvo inibidores da enzima conversora da angiotensina, betabloqueadores, bloqueadores de canais de cálcio e diuréticos (tiazidas e diuréticos semelhantes a tiazidas) são recomendadas a pacientes hipertensos (Oparil et al., 2018; Unger et al., 2020; Whelton et al., 2018; Williams et al., 2018).

Entre os modelos animais usados para o estudo da HAS estão ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e SHR propensos a acidente vascular cerebral (SHRSP) e aqueles em que é feita a indução por substâncias como mineralocorticoides (acetato de desoxicorticosterona + sal) e inibidores de enzimas, como o N(G)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), que inibe a NO sintase (Doggrell & Brown, 1998). Mesmo assim, é muito difícil que modelos animais mimetizem toda a complexidade da patogenia da hipertensão (Gomez-Arroyo et al., 2012). Porém, é possível evidenciar aspectos relevantes como alguns dos sintomas e consequências desta condição, para que diversos estudos sejam realizados.

## 2.2. Hipertensão arterial pulmonar

A hipertensão pulmonar (HP) é uma desordem cardiopulmonar (Galie` et al., 2015), cuja prevalência é de cerca de 1% na população mundial e de até 10% na população maior de 65 anos (Hoepfer et al., 2016). A definição de HP foi atualizada no 6º Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar em Nice, na França, em 2018, sendo necessário uma pressão média da artéria pulmonar > 20mmHg medida em repouso por cateterismo cardíaco direito. Por abranger diferentes quadros clínicos, a HP é classificada em cinco grupos de acordo com a apresentação

clínica semelhante, achados patológicos, características hemodinâmicas e estratégias de tratamento (Simonneau et al., 2013, 2019). Neste trabalho será abordado o grupo 1, caracterizado pela Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP), que tem incidência de 15-50 pessoas por milhão (Chester et al., 2017). Cerca de metade dos pacientes apresentam as formas idiopática, hereditária ou induzida por drogas. Esta patologia inclui condições clínicas associadas a elevação anormal da pressão circulatória pulmonar (Simonneau et al., 2013, 2019) acima de 20 mmHg, adicionado a uma pressão de oclusão da artéria pulmonar  $\leq 15$  mmHg e uma resistência vascular pulmonar  $\geq 3$  unidades Wood (WU), em repouso (Simonneau et al., 2019; Hassoun, 2021).

A HAP é uma condição rara, debilitante e de mau prognóstico. Conforme a etiologia, pode ser dividida nos subtipos idiopático, hereditário, induzida por intervenções farmacológicas, induzida por exposição a toxinas, HAP associada ao vírus da imunodeficiência humana, HAP por respondedores de longo prazo aos bloqueadores dos canais de cálcio, HAP com características evidentes de envolvimento venoso ou capilar e HAP persistente do recém-nascido (Coons et al., 2019; Galie` et al., 2015; Ozemek et al., 2019). Os sintomas comuns desta doença incluem falta de ar, fadiga, tontura e dor torácica, que impactam negativamente a capacidade de realizar atividades do cotidiano e a qualidade de vida dos pacientes. Adicionado a isso, vasoconstrição da artéria pulmonar, remodelação e aumento progressivo da carga vascular pulmonar levam à hipertrofia e remodelação do ventrículo direito (VD) (Chester et al., 2017; Malenfant et al., 2021; Nickel et al., 2020; Nogueira-Ferreira et al., 2018) sendo a insuficiência cardíaca a principal causa de morte destes pacientes (Hassoun, 2021).

O diagnóstico da HAP requer análise dos sintomas, exame físico e outras investigações, como radiografia de tórax, tomografia e ecocardiografia, para identificar etiologia, critérios hemodinâmicos e gravidade da condição (Galie` et al., 2015). A ecocardiografia é uma ferramenta não invasiva que combina precisão, menor custo (Bossone et al., 2013) e pode ajudar

na avaliação do VD e na avaliação de risco da doença (Coons et al., 2019). Porém, a ecocardiografia por si só não é suficiente para o diagnóstico (Dodson et al., 2018), mas pode ser combinada, por exemplo, com a avaliação hemodinâmica por cateterismo cardíaco direito (Bossone et al., 2013). O diagnóstico por meio dessas técnicas é importante para definir, por exemplo, a(s) causa(s) da doença, o prognóstico e o(s) tratamento(s) mais adequados (Thenappan et al., 2018).

Embora os mecanismos que medeiam o início e a progressão da doença não sejam completamente conhecidos, acredita-se que sua origem é multifatorial, sendo associada a respostas endoteliais anormais, estresse oxidativo, desregulação metabólica, inflamação e fatores genéticos (Chester et al., 2017; Nickel et al., 2020). As células endoteliais possuem um papel imprescindível na regulação do tônus dos vasos sanguíneos, na inflamação mediada por moléculas vasoativas e no processo de remodelação vascular (Chester et al., 2017). De fato, evidências apontam que distúrbios nas células endoteliais são estímulos que ativam vias de sinalização para proliferação descontrolada destas células, bem como de fibras musculares lisas subjacentes e fibroblastos. Possivelmente, tais fatores levam à remodelação e à oclusão de vasos sanguíneos pulmonares (Kurakula et al., 2021), caracterizando a HAP como uma doença vasoproliferativa induzida por estímulos mitogênicos (Chin & Rubin, 2008).

A inflamação na HAP ocorre pelo desbalanço na liberação e atuação de moléculas vasoativas que interagem com os elementos sanguíneos e musculares, sendo os principais mediadores óxido nítrico (NO), prostaciclina (vasodilatadores) e endotelina-1 (ET-1) (vasoconstritor). Estes mediadores são produzidos pelo endotélio e tem ação direta na parede dos vasos sanguíneos. A prostaciclina é um membro da família dos prostanoides e o NO é produzido via L-arginina e pela atividade da enzima NO sintase, presente no endotélio, sendo que tanto a prostaciclina quanto o NO também tem ação antiproliferativa. Já a ET-1 é um peptídeo mitogênico que age nas vasculaturas sistêmica e pulmonar e funciona como

antagonista dos efeitos vasodilatadores do NO (Chester et al., 2017; Chin & Rubin, 2008; Coons et al., 2019; Humbert et al., 2004a, b). Portanto, o uso de medicamentos para regular e equilibrar ação de vasodilatadores e vasoconstritores dentro do endotélio vascular e do músculo liso é um dos alvos terapêuticos para a HAP (Humbert et al., 2004b).

### 2.2.1 Estratégias terapêuticas e o treinamento físico combinado

A HAP ainda não tem cura e possui alta taxa de mortalidade, o que demanda estratégias terapêuticas eficazes e cuidado multidisciplinar (Coons et al., 2019; Nogueira-Ferreira et al., 2018). As terapias atuais disponíveis incluem terapia de suporte, utilizando anticoagulantes, diuréticos e oxigênio suplementar, e terapias direcionadas à HAP, com vasodilatadores e agentes antiproliferativos (Nogueira-Ferreira et al., 2018; Thenappan et al., 2018). Os agentes farmacológicos usados no tratamento da doença incluem bloqueadores dos canais de cálcio, antagonistas da endotelina e análogos de prostaciclina (Chin & Rubin, 2008; Coons et al., 2019). Em alguns casos, a terapia combinada pode ser uma maneira de maximizar o benefício clínico proporcionado por esses medicamentos (Humbert et al., 2004b).

Associado às opções farmacoterapêuticas, o treinamento físico é uma intervenção promissora para o tratamento da HAP. Apesar disso, historicamente, o treinamento físico não era considerado uma alternativa terapêutica viável na HAP, pois acreditava-se que poderia agravar seu desenvolvimento e aumentar o risco de morte súbita cardíaca. Entretanto, estudos recentes sustentam que, quando feito de maneira estruturada e supervisionada, o treinamento físico é seguro e benéfico (Buys et al., 2015; Nogueira-Ferreira et al., 2018), especialmente por possuir efeitos cardioprotetores (Moreira-Gonçalves et al., 2015; Natali et al., 2015; Soares et al., 2019), melhorar significativamente a capacidade e função físicas, a aptidão cardiorrespiratória e reduzir demais sintomas da HAP (Dalla Vecchia & Bussotti, 2018; Ozemek et al., 2019). De fato, o treinamento físico parece modular mecanismos moleculares

críticos da HAP como os de proliferação celular, apoptose, estresse oxidativo, inflamação e vasodilatação, principalmente nos órgãos-alvo da doença (Nogueira-Ferreira et al., 2018).

Existem diferentes modalidades de treinamento, a depender do método, duração, frequência e intensidade, e de programas de exercícios. Cada tipo pode proporcionar melhorias específicas. Porém, ainda não há um que seja mais vantajoso, o que evidencia a necessidade de mais investigações para avaliar os efeitos de cada um (Galie` et al., 2015; Benjamin et al., 2018). Adicionado a isso, é necessário fazer avaliações dos diferentes programas de treinamento de acordo com os perfis clínicos de cada paciente, visando um tratamento mais personalizado (Schermuly et al., 2011) e que possibilite a inserção de outros alvos terapêuticos que potencializem o efeito do treinamento físico (Nogueira-Ferreira et al., 2018).

Acredita-se que o exercício aeróbico deve ser uma parte significativa do treinamento físico e crescem evidências que a incorporação do treinamento físico resistido tem sido associada a melhorias significativas nos sintomas da HAP, na aptidão cardiorrespiratória e no perfil muscular esquelético (Ozemek et al., 2019). Por certo, pesquisas recentes têm mostrado que o treinamento físico combinado, constituído por sessões de treinamento físico aeróbico e resistido de baixa e moderada intensidade, tem sido recomendado no controle de fatores de risco para doenças cardiovasculares (Babu et al., 2016; Sanches et al., 2015). Com relação ao treinamento físico resistido sabe-se que, principalmente quando for realizado previamente, pode ter efeitos cardiopulmonares protetores no quadro de HAP severa, sendo fundamental a sua continuidade para a manutenção de tais efeitos (Portes, 2020). Além disso, o exercício aeróbio na HAP experimental também proporciona mais benefícios cardioprotetores quando iniciado em estágio inicial da doença (Moreira-Gonçalves et al., 2015). Portanto, a prática de exercício físico estruturado e o controle dos fatores de risco do sistema cardiovascular são medidas essenciais no tratamento da HAP (Nickel et al., 2020) e tem se mostrado promissora especialmente em pacientes estáveis (Arena et al., 2015).

Infelizmente ainda não há um modelo pré-clínico ideal para a HAP humana. Porém, no contexto geral, os modelos animais fornecerem informações importantes sobre suas vias de desenvolvimento e manutenção. Dentre os modelos animais mais comumente usados no estudo da HAP estão o modelo de hipóxia crônica e o de indução por monocrotalina. A monocrotalina é um alcaloide pirrolizidínico tóxico do vegetal *Crotalaria spectabilis* (Stenmark et al., 2009) e, quando usada para induzir a HAP em ratos, desencadeia danos no fígado, rins e coração, além do comprometimento da vasculatura pulmonar destes animais (Schermuly et al., 2011).

### 2.3 Eventos fisiológicos envolvidos na hipertensão

Normalmente espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) são produzidas como parte do metabolismo celular, participando de vias importantes para a célula (Dan Dunn et al., 2015). Estas espécies reativas estão relacionadas a processos de ativação de células imunes, inflamação, autofagia, exercício excessivo e envelhecimento, por exemplo, que contam com sistemas pró-oxidantes, como células fagocitárias, mitocôndrias, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidases (NOXs) e retículo endoplasmático (Krzemińska et al., 2022; Pizzino et al., 2017). As EROs são derivadas do oxigênio molecular e algumas são também chamadas de radicais livres, por possuírem elétron desemparelhado e serem altamente reativas (Krzemińska et al., 2022), como superóxido ( $O_2^-$ ) e hidroxila. Além de EROs, ERNs como NO e peroxinitrito também são importantes fatores que promovem modificações e danos oxidativos em biomoléculas como o DNA, lipídeos e proteínas (Sies et al., 2017). A proteção contra danos celulares causados pelas espécies reativas é fornecida por antioxidantes intracelulares enzimáticos e não enzimáticos (Ko et al., 2014), sendo as enzimas antioxidantes consideradas a primeira linha de defesa celular (Vernet et al., 2004). A defesa intracelular é realizada por enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) e antioxidantes não enzimáticos, como glutatona reduzida,

vitamina C e E. Por exemplo, a SOD elimina o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) para formar peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e, portanto, diminui os efeitos tóxicos causados por esse radical. A catalase remove o  $H_2O_2$  decompondo-o diretamente em  $O_2$ . A GPx está envolvida na redução dos peróxidos que podem danificar os ácidos graxos, prevenindo a peroxidação lipídica (Deaton & Marlin, 2003; Sies et al., 2012) e a subsequente formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, como o malondialdeído (Briones & Touyz, 2010).

Em condições patológicas, o prejuízo causado pelo estresse oxidativo, desequilíbrio entre a produção de EROs e ERNs e a atividade do sistema antioxidante (Dikalov & Ungvari, 2013; Sies et al., 2017; Touyz et al., 2020), pode promover disfunções que levam ao desenvolvimento de diversas doenças, como desordens neurológicas, respiratórias e cardiovasculares (Pizzino et al., 2017; Sies et al., 2017). Na hipertensão, o estresse oxidativo e a inflamação parecem ser mecanismos-chave desencadeadores deste quadro clínico (Guzik & Touyz, 2017; Harrison, 2013). De fato, o estresse oxidativo é um link importante entre diversos sistemas e fatores que também coordenam a etiologia da hipertensão, como sistema imunológico, hormônios sexuais, microRNAs e estressores ambientais (Touyz et al., 2020), já que várias vias são sensíveis ao status redox (Griendling et al., 2021). Com isso, há desenvolvimento da hipertensão e promoção de danos aos órgãos-alvo, como rins, coração, sistema nervoso central e vasculatura (Griendling et al., 2021; Harrison et al., 2021; Touyz et al., 2020).

Geralmente os vasos sanguíneos são formados por camadas, sendo do lúmen para fora, chamadas de túnica íntima, média e adventícia. Todos os tipos de células vasculares, como as endoteliais, musculares lisas e adventícias podem participar da produção de EROs (Paravicini & Touyz, 2006). Como fontes enzimáticas, as NOXs vasculares ocupam um papel muito importante no processo de produção de EROs, juntamente com outras enzimas como xantina oxidase, enzimas mitocondriais e NO sintase endotelial (eNOS) (Rodrigo et al., 2011). Em meio

oxidado, a eNOS, enzima que produz o NO, torna-se desacoplada e gera o radical  $O_2^-$ , que promove injúrias aos vasos (Griendling et al., 2021). Superóxido pode ser convertido em  $H_2O_2$  ou reage rapidamente com NO para formar peroxinitrito. Peroxinitrito contribui para dano tecidual e induz danos ao DNA e  $H_2O_2$  reage e modifica várias proteínas celulares, incluindo fatores de transcrição, proteínas fosfatases e quinases (Griendling et al., 2021). Com isso, alterações na produção e/ou biodisponibilidade de NO causam uma série de estados fisiopatológicos alterados, tanto em modelos animais experimentais quanto em seres humanos, com importante contribuição na hipertensão (Harrison, 1997). A ativação de NOXs é regulada por substâncias vasoativas, fatores de crescimento e estímulos mecânicos, como a tensão de cisalhamento e estiramento. Porém, a via mais bem elucidada é a do hormônio angiotensina II (Ang II) (Paravicini & Touyz, 2006). Ang II pode atuar nas células endoteliais promovendo aumento de EROs, por produção mitocondrial de maneira NOX dependente (Griendling et al., 2021; Lassègue et al., 2012). Assim, além de atuarem como iniciadoras e integradoras da sinalização redox, a superativação de NOXs amplifica a resposta e aumenta o estresse oxidativo, via *cross-talk* com outros sistemas produtores de EROs (Lassègue et al., 2012).

A produção de EROs também pode ser estimulada por citocinas inflamatórias (Griendling et al., 2021; Harrison et al., 2021). As células endoteliais, presentes na túnica íntima, são responsáveis pela produção de quimiocinas, interleucinas (IL), fatores de crescimento, e pelo controle do tráfego entre sangue e tecidos adjacentes (Gallo et al., 2022; Konukoglu & Uzun, 2017). Na adventícia, IL-1 $\beta$  e IL-6 podem ativar fibroblastos e recrutar células inflamatórias, prejudicando a função vascular (Meijles & Pagano, 2016). Fatores como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) podem estimular a expressão de genes pró-inflamatórios em várias células. A liberação de citocinas ativa NOXs, que são fontes importantes de espécies reativas (Gallo et al., 2022; Konukoglu & Uzun, 2017). Através de EROs, fatores pró-hipertensivos também induzem a ativação de inflamassomas, que iniciam e/ou aumentam

secreção de citocinas pró-inflamatórias (Dan Dunn et al., 2015), ampliando resposta inflamatória, fibrose e remodelamento vascular (Griendling et al., 2021). Desta forma, estresse oxidativo e inflamação têm papel essencial no começo e progressão do remodelamento vascular e da hipertensão.

A prevalência global da hipertensão, padronizada por idade, é de cerca de 34% e 32% em homens e mulheres, respectivamente (Zhou et al., 2021). Diferenças sexuais acarretam diferenças em mecanismos fisiopatológicos, fatores de risco e nos danos a órgãos mediados pela elevação da pressão e, conseqüentemente, na maneira de escolher os tratamentos anti-hipertensivos (EUGenMED et al., 2016; Gerdtts et al., 2022). Apesar de diferenças sexuais na fisiopatologia da hipertensão arterial ainda não serem totalmente compreendidas, evidências apontam que cromossomos sexuais e hormônios sexuais tem influência importante neste processo (Cadeddu et al., 2016; Gerdtts et al., 2022). Os hormônios sexuais, como andrógenos e estrogênios, atuam na função cardiovascular, remodelação do coração e na regulação da pressão arterial. Cada um possui efeitos distintos na ativação dos sistemas nervoso simpático, renina-angiotensina-aldosterona, bradicinina, no NO e na rigidez arterial (Cadeddu et al., 2016; EUGenMED et al., 2016; Gerdtts et al., 2022). Sabe-se que andrógenos podem aumentar a produção de angiotensinogênio, que culmina com elevação de Ang II, aumentando a reabsorção de sódio nos rins e impactando a pressão sanguínea (Gerdtts et al., 2022; Tadic et al., 2019). Porém, os efeitos fisiológicos, principalmente dos andrógenos, parecem mais complexos e são menos elucidados. Portanto, faz-se necessário compreender como diferenças sexuais orientam a patogênese e conseqüências da hipertensão em vários órgãos do corpo e, com isso, possibilitar o direcionamento de pesquisas e terapias-alvo futuras (Boese et al., 2017).

#### 2.4. Testículos, epidídimos e espermatozoides

O sistema reprodutor masculino é composto por testículos, epidídimo, canais eferentes e ducto deferente, glândulas sexuais acessórias, como próstata, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais, e pênis (Setchell & Breed, 2006). Os testículos são órgãos com formato elipsoide, que ficam alojados dentro do escroto e são envolvidos por tecido conjuntivo denso chamado de albugínea (Jurkiewicz et al., 2020; Setchell & Breed, 2006; Sharma & Agarwal, 2011). Anatomicamente, o testículo apresenta a região do mediastino e o parênquima, que contempla a parte funcional do órgão. O parênquima testicular é dividido em dois compartimentos: o tubular, contendo os túbulos seminíferos, e o intertubular, onde são encontrados vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células intersticiais ou de Leydig e tecido conjuntivo, com fibroblastos, mastócitos e macrófagos (Davis et al., 1970). Os túbulos seminíferos, por sua vez, são formados por um epitélio de células germinativas e as células de Sertoli, e envolvidos por uma lâmina basal e uma bainha de tecido conjuntivo com células mioides, células de natureza contrátil. As células de Sertoli se estendem desde a superfície basal do túbulo seminífero até a sua extremidade apical, alcançando o lúmen do túbulo. Elas estão intimamente associadas ao epitélio seminífero e são responsáveis por diversas funções, dentre elas o suporte físico e nutricional da linhagem germinativa, garantindo um ambiente adequado para a espermatogênese (Zhao et al., 2014). As junções de oclusão entre as células de Sertoli formam a barreira hematotesticular que separa o epitélio seminífero em duas regiões: a basal, onde se encontram as espermatogônias e os espermátocitos primários e a adluminal, onde se observam os espermátocitos primários, secundários e espermátides em diferentes fases de diferenciação (Fijak & Meinhardt, 2006; Sharma, 2007; Silverthorn, 2010). Além disso, a barreira hematotesticular cria um microambiente único para o desenvolvimento das células germinativas em estágios mais avançados, uma vez que restringe a sua exposição a agentes potencialmente tóxicos provenientes da corrente sanguínea que chega à porção intertubular

(França et al., 2016). Na região intertubular, as células de Leydig, que possuem seu citoplasma repleto de gotículas lipídicas, sintetizam esteroides masculinos como a testosterona (Shalet, 2009).

Com a puberdade, as células do epitélio seminífero passam pela espermatogênese, processo que produzirá os espermatozoides. A espermatogênese inicia com a proliferação das espermatogônias, células diploides ( $2n$ ) situadas na base do túbulo seminífero que, por meio de divisões mitóticas, formam os espermatócitos primários. Os espermatócitos primários passam pela primeira divisão meiótica para formar os espermatócitos secundários que são haploides ( $n$ ). Logo depois sofrem a segunda divisão meiótica para formar espermátides, também haploides, que passam pela espermiogênese e vão se diferenciar em espermatozoides (Hess & França, 2006). Neste processo, as espermátides perdem boa parte do citoplasma e desenvolvem um flagelo. Além disso, ocorre a formação de uma vesícula semelhante ao lisossomo, que é chamada de acrossoma, e a condensação e alongamento do núcleo (Silverthorn, 2010; Sharma & Agarwal, 2011). Nos homens, a espermiogênese possui oito passos e dura cerca de 21,6 dias e nos ratos envolve 19 passos e se estende por 22,7 dias (Hermo et al., 2010) Para que se complete um ciclo do epitélio seminífero, ou seja, desde a divisão da espermatogônia até a formação do espermatozoide, é gasto um período de 74 dias em humanos (Sharma, 2007) e de 56 dias em ratos.

A última etapa da espermatogênese é a espermiação, processo pelo qual uma espermátide madura se liberta da célula de Sertoli e entra no lúmen do túbulo como um espermatozoide (Sharma & Agarwal, 2011). Posteriormente, conforme os espermatozoides são produzidos e liberados no lúmen dos túbulos seminíferos eles seguirão, ainda imaturos, para os epidídimos, onde ocorrerá seu transporte, maturação, aquisição de motilidade e armazenamento. Os epidídimos consistem em um único ducto altamente contorcido que pode ser dividido em quatro regiões distintas com base na estrutura de seu epitélio, bem como na

morfologia macroscópica, em segmento inicial, cabeça, corpo e cauda (Robaire et al, 2006; Setchell & Breed, 2006). Nestas regiões, são expressos genes distintos que desempenham diferentes funções no processo de maturação dos espermatozoides (Domeniconi et al., 2016). Na cauda dos epidídimos, os espermatozoides maduros ficam armazenados até o momento da ejaculação.

Os espermatozoides maduros são móveis e tem a capacidade de fertilizar o ovócito, sendo morfologicamente divididos em cabeça e cauda. A cabeça contém o núcleo haploide e o acrossoma que fica na sua porção superior e possui enzimas essenciais para a ocorrência do processo de fecundação. As enzimas hidrolíticas do acrossoma são capazes de romper com as estruturas que envolvem o ovócito, a zona pelúcida e as células da corona radiata, permitindo a entrada do espermatozoide (Silverthorn, 2010; Sharma & Agarwal, 2011). No caso do espermatozoide humano, a cabeça possui forma oval (Sharma & Agarwal, 2011) e no rato a cabeça é alongada em formato de gancho (Robaire et al, 2006). A cauda ou flagelo é formada por centríolos e dividida em três porções: a peça intermediária, peça principal e peça terminal. Da peça intermediária os microtúbulos se estendem para compor o restante do flagelo e as mitocôndrias, que estão presentes em grande quantidade nesta porção, produzem energia em forma de ATP, que é necessária para a motilidade espermática (Silverthorn, 2010; Sharma & Agarwal, 2011). As glândulas acessórias liberam secreções essenciais para a proteção, nutrição e motilidade espermática, sendo que os espermatozoides juntamente com as substâncias secretadas compõem o sêmen (Silverthorn, 2010).

## 2.5. Referências Bibliográficas

Adedara, I. A., Alake, S. E., Adeyemo, M. O., Olajide, L. O., Ajibade, T. O., & Farombi, E. O. (2018). Taurine enhances spermatogenic function and antioxidant defense mechanisms in

- testes and epididymis of L-NAME-induced hypertensive rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *97*, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.095>
- Aranda, P., Ruilope, L. M., Calvo, C., Luque, M., Coca, A., & de Miguel, Á. G. (2004). Erectile dysfunction in essential arterial hypertension and effects of sildenafil: Results of a Spanish national study. *American Journal of Hypertension*, *17*(2). <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2003.09.006>
- Arena, R., Cahalin, L. P., Borghi-Silva, A., & Myers, J. (2015). The effect of exercise training on the pulmonary arterial system in patients with pulmonary hypertension. *Progress in Cardiovascular Diseases*, *57*(5). <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2014.03.008>
- Babu, A. S., Padmakumar, R., Maiya, A. G., Mohapatra, A. K., & Kamath, R. L. (2016). Effects of exercise training on exercise capacity in pulmonary arterial hypertension: a systematic review of clinical trials. *Heart, Lung and Circulation*, *25*(4), 333-341. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2015.10.015>
- Bansal, S. (1988). Sexual dysfunction in hypertensive men. A critical review of the literature. In *Hypertension* (Vol. 12, Issue 1). <https://doi.org/10.1161/01.HYP.12.1.1>
- Barroso, W. K. S., Rodrigues, C. I. S., Bortolotto, L. A., Mota-Gomes, M. A., Brandão, A. A., de Magalhães Feitosa, A. D., Machado, C. A., Poli-de-Figueiredo, C. E., Amodeo, C., Mion Júnior, D., Barbosa, E. C. D., Nobre, F., Guimarães, I. C. B., Vilela-Martin, J. F., Yugar-Toledo, J. C., Magalhães, M. E. C., Neves, M. F. T., Jardim, P. C. B. V., Miranda, R. D., ... Nadruz, W. (2021). Brazilian guidelines of hypertension - 2020. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, *116*(3). <https://doi.org/10.36660/abc.20201238>
- Benjamin, N., Marra, A. M., Eichstaedt, C., & Grünig, E. (2018). Exercise training and rehabilitation in pulmonary hypertension. *Heart Failure Clinics*, *14*(3), 425-430. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2018.03.008>

- Boese, A. C., Kim, S. C., Yin, K. J., Lee, J. P., & Hamblin, M. H. (2017). Sex differences in vascular physiology and pathophysiology: estrogen and androgen signaling in health and disease. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, *313*(3), H524–H545. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00217.2016>
- Bossone, E., D'Andrea, A., D'Alto, M., Citro, R., Argiento, P., Ferrara, F., ... & Naeije, R. (2013). Echocardiography in pulmonary arterial hypertension: from diagnosis to prognosis. *Journal of the American Society of Echocardiography*, *26*(1), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2012.10.009>
- Buys, R., Avila, A., & Cornelissen, V. A. (2015). Exercise training improves physical fitness in patients with pulmonary arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis of controlled trials. *BMC Pulmonary Medicine*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12890-015-0031-1>
- Cadeddu, C., Franconi, F., Cassisa, L., Campesi, I., Pepe, A., Cugusi, L., Maffei, S., Gallina, S., Sciomer, S., Mercurio, G., & Working Group of Gender Medicine of Italian Society of Cardiology (2016). Arterial hypertension in the female world: pathophysiology and therapy. *Journal of cardiovascular medicine (Hagerstown, Md.)*, *17*(4), 229–236. <https://doi.org/10.2459/JCM.0000000000000315>
- Chester, A. H., Yacoub, M. H., & Moncada, S. (2017). Nitric oxide and pulmonary arterial hypertension. *Global cardiology science & practice*, *2017*(2). <https://doi.org/10.21542/gcsp.2017.14>
- Chin, K. M., & Rubin, L. J. (2008). Pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, *51*(16), 1527-1538. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.01.024>
- Chow, C. K., Teo, K. K., Rangarajan, S., Islam, S., Gupta, R., Avezum, A., Bahonar, A., Chifamba, J., Dagenais, G., Diaz, R., Kazmi, K., Lanas, F., Wei, L., Lopez-Jaramillo, P., Fanghong, L., Ismail, N. H., Puoane, T., Rosengren, A., Szuba, A., ... Yusuf, S. (2013).

- Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in rural and urban communities in high-, middle-, and low-income countries. *Jama*, 310(9).  
<https://doi.org/10.1001/jama.2013.184182>
- 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), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11886-019-1235-4>
- Dalla Vecchia, L. A., & Bussotti, M. (2018). Exercise training in pulmonary arterial hypertension. *Journal of thoracic disease*, 10(1), 508.  
<https://doi.org/10.21037/jtd.2018.01.90>
- Dan Dunn, J., Alvarez, L. A., Zhang, X., & Soldati, T. (2015). Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox biology*, 6, 472–485.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.09.005>
- Davis, J. R., Langford, G. A., & Kirby, P. J. (1970). The testicular capsule. *The Testis. Development, Anatomy and Physiology; Johnson, AD, Gomes, R., Vandemark, NL, Eds*, 281-337. Google Livros
- Deaton, C. M., & Marlin, D. J. (2003). Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 2(3). [https://doi.org/10.1053/S1534-7516\(03\)00070-2](https://doi.org/10.1053/S1534-7516(03)00070-2)
- Dikalov, S. I., & Ungvari, Z. (2013). Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension. *In American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* (Vol. 305, Issue 10).  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00089.2013>
- Dikalova, A. E., Bikineyeva, A. T., Budzyn, K., Nazarewicz, R. R., McCann, L., Lewis, W., ... & Dikalov, S. I. (2010). Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circulation research*, 107(1), 106-116.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.214601>

- Dodson, M. W., Brown, L. M., & Elliott, C. G. (2018). Pulmonary arterial hypertension. *Heart failure clinics, 14*(3), 255-269. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2018.02.003>
- Doggrell, S. A., & Brown, L. (1998). Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. In *Cardiovascular Research* (Vol. 39, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(98\)00076-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00076-5)
- Domeniconi, R. F., Souza, A. C. F., Xu, B., Washington, A. M., & Hinton, B. T. (2016). Is the epididymis a series of organs placed side by side?. *Biology of reproduction, 95*(1), 10-1. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.138768>
- EUGenMed Cardiovascular Clinical Study Group, Regitz-Zagrosek, V., Oertelt-Prigione, S., Prescott, E., Franconi, F., Gerds, E., Foryst-Ludwig, A., Maas, A. H., Kautzky-Willer, A., Knappe-Wegner, D., Kintscher, U., Ladwig, K. H., Schenck-Gustafsson, K., & Stangl, V. (2016). Gender in cardiovascular diseases: impact on clinical manifestations, management, and outcomes. *European heart journal, 37*(1), 24–34. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv598>
- Fijak, M., Meinhardt, A. (2006). The testis in immune privilege. *Immunological Reviews, 213*: 66–81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.2006.00438.x>
- 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). <https://doi.org/10.1111/andr.12165>
- Galiè, N., Humbert, M., Vachiery, J. L., Gibbs, S., Lang, I., Torbicki, A., ... & Hoeper, M. (2015). 2015 ESC/ERS guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the joint task force for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital

Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *European heart journal*, 37(1), 67-119.

Gallo, G., Volpe, M., & Savoia, C. (2022). Endothelial Dysfunction in Hypertension: Current Concepts and Clinical Implications. *Frontiers in medicine*, 8, 798958. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.798958>

Gerds, E., Sudano, I., Brouwers, S., Borghi, C., Bruno, R. M., Ceconi, C., Cornelissen, V., Diévar, F., Ferrini, M., Kahan, T., Løchen, M. L., Maas, A. H. E. M., Mahfoud, F., Mihailidou, A. S., Moholdt, T., Parati, G., & de Simone, G. (2022). Sex differences in arterial hypertension. *European heart journal*, 43(46), 4777–4788. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac470>

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. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00212.2011>

Griendling, K. K., Camargo, L. L., Rios, F. J., Alves-Lopes, R., Montezano, A. C., & Touyz, R. M. (2021). Oxidative stress and hypertension. *Circulation Research*, 128(7), 993-1020. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318063>

Guimarães-Ervilha, L. O. (2021). *O efeito da hipertensão arterial pulmonar induzida sobre parâmetros testiculares de ratos Wistar submetidos ao treinamento físico resistido*. 90 f. [Dissertação Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa] <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/28642>

Guo, D., Li, S., Behr, B., & Eisenberg, M. L. (2017). Hypertension and Male Fertility. *The World Journal of Men's Health*, 35(2). <https://doi.org/10.5534/wjmh.2017.35.2.59>

- Guzik, T. J., & Touyz, R. M. (2017). Oxidative stress, inflammation, and vascular aging in hypertension. *Hypertension*, *70*(4), 660-667.  
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.07802>
- Harrison, D. G. (2013). The Mosaic Theory revisited: Common molecular mechanisms coordinating diverse organ and cellular events in hypertension. In *Journal of the American Society of Hypertension* (Vol. 7, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.jash.2012.11.007>
- Harrison, D. G., Coffman, T. M., & Wilcox, C. S. (2021). Pathophysiology of Hypertension: The Mosaic Theory and Beyond. *Circulation research*, *128*(7), 847–863.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318082>
- Hassoun P. M. (2021). Pulmonary Arterial Hypertension. *The New England journal of medicine*, *385*(25), 2361–2376. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2000348>
- 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 2: Changes in spermatid organelles associated with development of spermatozoa. *Microscopy Research and Technique*, *73*(4). <https://doi.org/10.1002/jemt.20787>
- Hernández-Gea, V., Baiges, A., Turon, F., & Garcia-Pagán, J. C. (2018). Idiopathic portal hypertension. *Hepatology*, *68*(6), 2413-2423. <https://doi.org/10.1002/hep.30132>
- Herrmann, S. M., & Textor, S. C. (2019). Renovascular hypertension. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, *48*(4), 765-778. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2019.08.007>
- Hess, R. A., & De Franca, L. R. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Molecular mechanisms in spermatogenesis*, 1-15.
- Hooper, M. M., Bogaard, H. J., Condliffe, R., Frantz, R., Khanna, D., Kurzyna, M., Langleben, D., Manes, A., Satoh, T., Torres, F., Wilkins, M. R., & Badesch, D. B. (2013). Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, *62*(25 SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.10.032>

- Hoeper, M. M., Humbert, M., Souza, R., Idrees, M., Kawut, S. M., Sliwa-Hahnle, K., ... & Gibbs, J. S. R. (2016). A global view of pulmonary hypertension. *The Lancet Respiratory Medicine*, 4(4), 306-322. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00543-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00543-3)
- Humbert, M., Morrell, N. W., Archer, S. L., Stenmark, K. R., MacLean, M. R., Lang, I. M., Christman, B. W., Weir, E. K., Eickelberg, O., Voelkel, N. F., & Rabinovitch, M. (2004a). Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 43(12 SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.02.029>
- Humbert, M., Sitbon, O., & Simonneau, G. (2004b). Treatment of pulmonary arterial hypertension. *New England Journal of Medicine*, 351(14), 1425-1436. <https://doi.org/10.1056/NEJMra040291>
- Jordan, J., Kurschat, C., & Reuter, H. (2018). Arterial hypertension-diagnosis and treatment. *Deutsches Arzteblatt International*, 115(33–34). <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0557>
- Jurkiewicz, N. H., Jurkiewicz, A., & da Silva Júnior, E. D. (2020). Physiopharmacological properties of the testicular capsule: A concise review. *European Journal of Pharmacology*, 883, 173345. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173345>
- Ko, E. Y., Sabanegh, E. S., & Agarwal, A. (2014). Male infertility testing: Reactive oxygen species and antioxidant capacity. In *Fertility and Sterility* (Vol. 102, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.10.020>
- Konukoglu, D., & Uzun, H. (2017). Endothelial dysfunction and hypertension. *Hypertension: from basic research to clinical practice*, 511-540. DOI 10.1007/5584\_2016\_90
- Krzemińska, J., Wronka, M., Młynarska, E., Franczyk, B., & Rysz, J. (2022). Arterial Hypertension-Oxidative Stress and Inflammation. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 11(1), 172. <https://doi.org/10.3390/antiox11010172>

- Kurakula, K., Smolders, V. F., Tura-Ceide, O., Jukema, J. W., Quax, P. H., & Goumans, M. J. (2021). Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension: cause or consequence?. *Biomedicines*, *9*(1),57. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9010057>
- Lassègue, B., San Martín, A., & Griendling, K. K. (2012). Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circulation research*, *110*(10), 1364–1390. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.243972>
- Lawes, C. M., Hoorn, S. vander, & Rodgers, A. (2008). Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *The Lancet*, *371*(9623). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60655-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60655-8)
- Malenfant, S., Lebret, M., Breton-Gagnon, É., Potus, F., Paulin, R., Bonnet, S., & Provencher, S. (2021). Exercise intolerance in pulmonary arterial hypertension: Insight into central and peripheral pathophysiological mechanisms. *European Respiratory Review*, *30*(160). <https://doi.org/10.1183/16000617.0284-2020>
- Mills, K. T., Stefanescu, A., & He, J. (2020). The global epidemiology of hypertension. In *Nature Reviews Nephrology* (Vol. 16, Issue 4). <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0244-2>
- Moreira-Gonçalves, D., Ferreira, R., Fonseca, H., Padrão, A. I., Moreno, N., Silva, A. F., Vasques-Nóvoa, F., Gonçalves, N., Vieira, S., Santos, M., Amado, F., Duarte, J. A., Leite-Moreira, A. F., & Henriques-Coelho, T. (2015). Cardioprotective effects of early and late aerobic exercise training in experimental pulmonary arterial hypertension. *Basic Research in Cardiology*, *110*(6). <https://doi.org/10.1007/s00395-015-0514-5>
- Natali, A. J., Fowler, E. D., Calaghan, S. C., & White, E. (2015). Voluntary exercise delays heart failure onset in rats with pulmonary artery hypertension. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *309*(3). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00262.2015>

- Nickel, N. P., Yuan, K., Dorfmueller, P., Provencher, S., Lai, Y. C., Bonnet, S., ... & de Jesus Perez, V. A. (2020). Beyond the lungs: systemic manifestations of pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 201(2), 148-157. <https://doi.org/10.1164/rccm.201903-0656CI>
- Oparil, S., Acelajado, M. C., Bakris, G. L., Berlowitz, D. R., Cífková, R., Dominiczak, A. F., Grassi, G., Jordan, J., Poulter, N. R., Rodgers, A., & Whelton, P. K. (2018). Hypertension. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 4). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.14>
- Ozemek, C., Berry, M. J., & Arena, R. (2019). A review of exercise interventions in pulmonary arterial hypertension and recommendations for rehabilitation programming. *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention*, 39(3), 138-145. <https://doi.org/10.1097/HCR.0000000000000402>
- Paravicini, T. M., & Touyz, R. M. (2006). Redox signaling in hypertension. *Cardiovascular research*, 71(2), 247-258. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.05.001>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Portes, A. M. O. (2020). *Efeitos do treinamento resistido prévio sobre a força muscular e a morfologia e função cardiopulmonar em ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina*. 88 f. [Dissertação Mestrado em Educação Física, Universidade Federal de Viçosa] <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/28061>
- Robaire, B., Hinton, B. T., & Orgebin-Crist, M. C. (2006). The epididymis. In Knobil and Neill's physiology of reproduction (pp. 1071-1148). Academic Press.

- Rodrigo, R., González, J., & Paoletto, F. (2011). The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension. *Hypertension Research*, *34*(4), 431-440. <https://doi.org/10.1038/hr.2010.264>
- Sanches, I. C., Conti, F. F., Bernardes, N., de O Brito, J., Galdini, E. G., Cavaglieri, C. R., Irigoyen, M. C., & de Angelis, K. (2015). Impact of combined exercise training on cardiovascular autonomic control and mortality in diabetic ovariectomized rats. *Journal of Applied Physiology*, *119*(6). <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00883.2014>
- Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Wilkins, M. R., & Grimminger, F. (2011). Mechanisms of disease: Pulmonary arterial hypertension. *Nature Reviews Cardiology* (Vol. 8, Issue 8). <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2011.87>
- Setchell, B. P., & Breed, W. G. (2006). Anatomy, vasculature, and innervation of the male reproductive tract. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50022-1>
- Shalet, S.M. (2009). Normal Testicular Function and Spermatogenesis. *Pediatr Blood Cancer*, *53*:285–288. <https://doi.org/10.1002/pbc.22000>.
- Sharma, R. K., & Agarwal, A. (2011). Spermatogenesis: an overview. *Sperm chromatin*, 19-44. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6857-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6857-9_2)
- Sharma, R. K. (2007). Physiology of male gametogenesis. *Clinical reproductive medicine and surgery*, 73-83.
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual review of biochemistry*, *86*, 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
- Silverthorn, D. U. (2010). *Fisiologia Humana: Uma abordagem integrada*. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed.
- Simonneau, G., Gatzoulis, M. A., Adatia, I., Celermajer, D., Denton, C., Ghofrani, A., Gomez Sanchez, M. A., Krishna Kumar, R., Landzberg, M., Machado, R. F., Olschewski, H.,

- Robbins, I. M., & Souza, R. (2013). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(25 SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.10.029>
- Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D. S., Denton, C. P., Gatzoulis, M. A., Krowka, M., Williams, P. G., & Souza, R. (2019). Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*, 53(1). <https://doi.org/10.1183/13993003.01913-2018>
- 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. (2019). Voluntary running counteracts right ventricular adverse remodeling and myocyte contraction impairment in pulmonary arterial hypertension model. *Life Sciences*, 238. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116974>
- 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. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00217.2009>
- Tadic, M., Cuspidi, C., Grassi, G., & Ivanovic, B. (2019). Gender-specific therapeutic approach in arterial hypertension - Challenges ahead. *Pharmacological research*, 141, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.12.021>
- Thenappan, T., Ormiston, M. L., Ryan, J. J., & Archer, S. L. (2018). Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *Bmj*, 360. <https://doi.org/10.1136/bmj.j5492>
- Touyz, R. M., Rios, F. J., Alves-Lopes, R., Neves, K. B., Camargo, L. L., & Montezano, A. C. (2020). Oxidative Stress: A Unifying Paradigm in Hypertension. In *Canadian Journal of Cardiology* (Vol. 36, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2020.02.081>

- Unger, T., Borghi, C., Charchar, F., Khan, N. A., Poulter, N. R., Prabhakaran, D., Ramirez, A., Schlaich, M., Stergiou, G. S., Tomaszewski, M., Wainford, R. D., Williams, B., & Schutte, A. E. (2020). 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines. *Hypertension*, 75(6).  
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15026>
- Vernet, P., Aitken, R. J., & Drevet, J. R. (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 216(1–2).  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.10.069>
- Whelton, P. K., Carey, R. M., Aronow, W. S., Casey, D. E., Collins, K. J., Dennison Himmelfarb, C., DePalma, S. M., Gidding, S., Jamerson, K. A., Jones, D. W., MacLaughlin, E. J., Muntner, P., Ovbigele, B., Smith, S. C., Spencer, C. C., Stafford, R. S., Taler, S. J., Thomas, R. J., Williams, K. A., ... Wright, J. T. (2018). 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary. *Journal of the American Society of Hypertension*, 12(8).  
<https://doi.org/10.1016/j.jash.2018.06.010>
- Williams, B., Mancia, G., Spiering, W., Rosei, E. A., Azizi, M., Burnier, M., Clement, D. L., Coca, A., de Simone, G., Dominiczak, A., Kahan, T., Mahfoud, F., Redon, J., Ruilope, L., Zanchetti, A., Kerins, M., Kjeldsen, S. E., Kreutz, R., Laurent, S., ... Zamorano, J. L. (2018). 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. In *European Heart Journal* (Vol. 39, Issue 33). <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy339>
- Zhao, S., Zhu, W., Xue, S., & Han, D. (2014). Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cellular & molecular immunology*, 11(5), 428-437. Zhao, S., Zhu, W., Xue, S., & Han, D. (2014). Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cellular & molecular immunology*, 11(5), 428-437.

Zhou, B., Perel, P., Mensah, G. A., & Ezzati, M. (2021). Global epidemiology, health burden and effective interventions for elevated blood pressure and hypertension. In *Nature Reviews Cardiology* (Vol. 18, Issue 11). <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00559-8>

### 3. CAPÍTULO 1: A hipertensão arterial sistêmica pode comprometer parâmetros testiculares de modelos murinos? Uma revisão sistemática

#### 3.1 Resumo

A hipertensão arterial sistêmica é uma condição multifatorial que se caracteriza pela pressão elevada e persistente nas artérias corporais sistêmicas. Assim, objetiva-se entender e reunir resultados de como seus danos sistêmicos podem comprometer testículos de modelos murinos. A presente revisão sistemática foi realizada de acordo com as diretrizes PRISMA e envolveu busca estruturada de artigos científicos em bases de dados (PubMed/Medline, Embase e Web of Science) utilizando os termos “testículo” e “hipertensão”. Vinte e um estudos experimentais, publicados até setembro de 2022, foram recuperados e incluídos, uma vez que avaliavam efeitos da hipertensão arterial sistêmica em parâmetros reprodutivos testiculares. Os resultados destes artigos foram extraídos, organizados em tabelas e analisados quanto à qualidade segundo diretrizes ARRIVE 2.0. Os artigos selecionados trouxeram informações sobre alterações na histologia e histomorfometria de testículos e epidídimos de modelos murinos, bem como redução de hormônios e atividade de enzimas antioxidantes e aumento de marcadores de estresse oxidativo. Não foram informados critérios para randomização, cegamento, tamanho da amostra, cuidados e detalhes sobre animais, o que pode comprometer a qualidade metodológica. Os estudos relataram alterações significativas em testículos de animais hipertensos, com potencial comprometimento da fertilidade masculina. Pode-se concluir que a hipertensão deve ser considerada um fator de risco para a saúde reprodutiva masculina. Esperamos que nossa análise crítica possa ajudar a agilizar a pesquisa clínica e embasar pesquisas futuras que possam preencher lacunas ainda existentes, melhorando assim a qualidade da evidência. O número de registro na plataforma Prospero é CRD42022371011.

**Palavras-chave:** pressão alta; macho; testículos; histologia; estresse oxidativo.

### 3.2 Introdução

A hipertensão arterial sistêmica é mais frequente em regiões de baixa e média renda, sendo que, em 2019, mais de 1 bilhão de pessoas (82% do total de hipertensos), viviam nestas localidades (Zhou et al., 2021). Por estar envolvida na ocorrência de outras doenças cardiovasculares, a hipertensão causa mortes prematuras em todo mundo (Mills et al., 2017; Oparil et al., 2018). Em 2015, estimou-se que cerca de 10 milhões de pessoas morreram em decorrência de pressão arterial elevada (Stanaway et al., 2018). De fato, o aumento da pressão de forma crônica causa danos a órgãos como coração, cérebro, rins, resultando em aumento da morbidade e mortalidade (Foëx & Sear, 2004; Williams et al., 2018). O risco de desenvolvimento de comorbidades coronarianas, cerebrovasculares e renais aumenta com idade e presença de outros fatores de risco adicionais, como diabetes, sobrepeso-obesidade e hábitos de vida pouco saudáveis (tabagismo, alto consumo de álcool, sedentarismo) (Barroso et al., 2021; Foëx & Sear, 2004; Unger et al., 2020).

Apesar da etiologia da hipertensão ser complexa, na década de 1940, o médico Irvine Page desenvolveu o conceito da *Mosaic Theory*, a fim de explicá-la como resultado da interação de vários fatores que culminam no aumento da pressão sanguínea (Harrison, 2013; Harrison et al., 2021). Entre estes fatores estão os genéticos/epigenéticos, ambientais, adaptativos, neurais, imunes e hormonais (Barroso et al., 2021; Harrison, 2013; Oparil et al., 2018). No geral, acredita-se que estresse oxidativo seja essencial para induzir perturbação primária (Harrison, 2013; Oparil et al., 2018; Touyz et al., 2020). Estímulos pró-hipertensivos como alterações de estresse de cisalhamento, sistema renina angiotensina, endotelina, angiotensina II, promovem a superexpressão de enzimas, como as NOXs na vasculatura, que produzem de espécies reativas em excesso (Rodrigo et al., 2011; Gallo et al., 2022). As EROs influenciam muitas moléculas sinalizadoras que regulam a função cardiovascular, por modificações pós-translacionais oxidativas, incluindo quinases, fosfatases, canais de  $Ca^{2+}$ , fatores de transcrição e genes

(Griendling et al., 2021) e limita a biodisponibilidade vascular de NO (Koh et al., 2009). Adicionado a isso, é sugerido que aumento no estresse oxidativo pode estimular expressão de quimiocinas e citocinas por células inflamatórias e da parede dos vasos levando ao aumento da inflamação (Mittal et al., 2014). Estresse oxidativo e inflamação comprometem estrutura e função da vasculatura arterial, devido à disfunção do endotélio, deposição de matriz extracelular que aumenta resistência periférica e pressão sanguínea, alterações na parede e no calibre dos vasos (Briones & Touyz, 2010; Dikalov & Ungvari, 2013; Griendling et al., 2021; Harrison et al., 2021; Meijles & Pagano, 2016). Portanto, ao considerar a função endotelial, uma perturbação pode gerar mediadores que provavelmente afetam outras células e órgãos (Harrison et al., 2021; Oparil et al., 2018).

A importância da hipertensão em órgãos-alvo já é bem estabelecida (Barroso et al., 2021; Unger et al., 2020; Williams et al., 2018). Na literatura, há também trabalhos que relatam efeitos em outros órgãos como os do sistema reprodutor masculino. Entre as consequências da hipertensão em pacientes masculinos, já foram verificadas redução em parâmetros espermáticos, da atividade sexual, e concentrações séricas de testosterona. Além disso, há relatos de disfunção erétil e baixo volume seminal (Aranda et al., 2004; Barroso et al., 2021; Fogari et al., 2002; Guo et al., 2017; Navaneethalakrishnan et al., 2020). Em modelos murinos, já foram relatadas alterações na espermatogênese e esteroidogênese (Atanassova et al., 2009), diminuição da qualidade do sêmen (Colli et al., 2019) e aumento do estresse oxidativo em testículos e epidídimos (Akinyemi et al., 2015).

O controle do fluxo sanguíneo é imprescindível para o funcionamento de todos os órgãos do corpo e tem se mostrado particularmente crítico para as funções testiculares. O fluxo sanguíneo nos testículos é responsável pela termorregulação e pelo transporte de nutrientes, oxigênio, hormônios e outras substâncias entre os testículos e outras partes do corpo (Bergh et al., 2001; Samir et al., 2022). Para que a espermatogênese aconteça de forma eficiente, o

ambiente dos túbulos seminíferos deve ter baixa tensão de oxigênio, o que fornece às células a vantagem de evitar danos causados por EROs (Azu, 2015; Samir et al., 2022). Embora a baixa tensão de oxigênio seja importante para a produção de espermatozoide, o testículo é muito suscetível a danos isquêmicos devido a restrição vascular (Kay et al., 1992). Evidências mostram que a hipertensão arterial sistêmica reduz a microcirculação testicular e aumenta o estresse oxidativo (Colli et al., 2019), o que pode comprometer a fisiologia deste órgão.

Os testículos são órgãos altamente vascularizados (Heinrich & DeFalco, 2020) e estão diretamente relacionados à produção dos espermatozoides e de andrógenos. Dado que danos nos testículos podem ser causa importante de infertilidade (Colli et al., 2019), esta é a primeira revisão sistemática que busca integrar evidências experimentais para uma análise crítica e investigação da relevância de efeitos da hipertensão arterial sistêmica em órgãos do sistema reprodutor masculino. Para isso, foram analisados efeitos na histologia, nos hormônios e na atividade de enzimas do sistema antioxidante e marcadores de estresse oxidativo nos testículos de modelos murinos, a saber, ratos e camundongos.

### **3.3 Materiais e métodos**

#### **3.3.1 Pergunta foco, protocolo, registro e PRISMA**

A pergunta de pesquisa seguiu a estratégia do acrônimo PICOS (Tabela suplementar 1), derivando o questionamento: “Quais são as consequências da hipertensão arterial sistêmica para a funcionalidade e estrutura testicular de modelos murinos?” Este estudo foi registrado no *International prospective register of systematic reviews* (PROSPERO) sob o número de registro CRD42022371011. Esta revisão sistemática foi baseada na diretriz PRISMA (Itens Preferenciais de Relatórios para Revisões Sistemáticas e Meta-análises) atualizada (Page et al., 2021) (Fig. 1).

### 3.3.2 Estratégia de busca

A revisão sistemática foi realizada por meio de uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados eletrônicas PubMed/MEDLINE, Embase e Web of Science. Para todas as bases de dados, foram usadas termos associados aos descritores: (i) testículos e (ii) hipertensão, sendo combinados por conectores booleanos [OR, AND] (Tabela suplementar 2). Inicialmente, utilizou-se o Pubmed para desenvolver os filtros de busca, aplicando os algoritmos de busca [MeSH Terms] e [título/resumo/palavras-chave] (Hooijmans et al., 2010). Em seguida, usou-se filtros de busca de cada base de dados, para detectar estudos com “animais”, em “inglês” e “masculino/macho”, aumentando assim a especificidade da busca. Não foi aplicado nenhum limite cronológico na nossa estratégia de busca. Todos os estudos relevantes publicados até 15 de setembro de 2022, às 11h56, foram recuperados e incluídos na revisão sistemática.

### 3.3.3 Seleção dos estudos

Inicialmente, todos os registros de busca recuperados em bancos de dados eletrônicos foram carregados no *Mendeley Reference Management Program* (Mendeley, London, Westminster, UK), que foi usado para remover duplicatas comparando metadados de indexação (por exemplo, títulos, autores, ano, volume, edição, periódico de publicação e doi) de todos os bancos de dados. Em seguida, os dados foram carregados no *software Start (State of the Art through Systematic Review)*, e foram selecionados considerando título, resumo e palavras-chave, excluindo aqueles não relacionados ao tema da pesquisa. Após esta etapa, todos os registros potencialmente relevantes foram recuperados em texto completo e avaliados quanto à elegibilidade de acordo com critérios específicos de inclusão e exclusão. As listas de referências dos artigos selecionados foram avaliadas manualmente para verificar se havia outros estudos relevantes que pudessem ser incluídos nesta revisão sistemática. Todas essas etapas foram

realizadas por dois pesquisadores (M.Q.A e L.O.G.E), de forma independente. As discordâncias que ocorreram entre os dois foram resolvidas por consenso entre os membros da equipe.

#### 3.3.4 Critérios de exclusão

Os estudos foram considerados irrelevantes e excluídos quando: (i) não eram estudos experimentais (resumos, conferências, editoriais, capítulos de livros, artigos de revisão e relatos de casos); (ii) usaram outros modelos animais que não murinos, machos e sexualmente maduros; (iii) animais que não eram hipertensos; (iv) estudos *in vitro*; e (v) outros estudos que não avaliaram diretamente as variáveis testiculares em modelos experimentais de hipertensão arterial sistêmica.

#### 3.3.5 Extração de dados

Os dados dos artigos foram extraídos, processados no *software Microsoft Office Excel®* e sistematizados em tabelas padronizadas. As tabelas produzidas apresentam informações dos artigos, como referência, país do estudo, título, periódico, DOI, características dos modelos animais (linhagem, peso, idade), design experimental (grupos, n amostral, método de indução da hipertensão, via e tempo de exposição) e medição da pressão sanguínea. Os dados primários extraídos foram os parâmetros testiculares, como biometria, histologia (histopatologia e histomorfometria), análise hormonal e de estresse oxidativo (atividade de enzimas antioxidantes e marcadores de dano oxidativo). Complementarmente, extraímos como dados secundários parâmetros sanguíneos, a fim de validar a hipertensão arterial nos modelos animais utilizados, e os resultados de biometria corporal, análises histopatológicas, funcionais e de estresse oxidativo em epidídimos e espermatozoides. Estes dados podem ser úteis para explicar o quadro geral da doença no sistema reprodutor, especialmente por que os epidídimos são

cruciais para reprodução masculina, uma vez que estão diretamente relacionados à maturação e qualidade dos espermatozoides (Sharma & Agarwal, 2011).

### 3.3.6 Análise de qualidade dos estudos

A qualidade dos estudos incluídos foi avaliada pelos critérios descritos nas diretrizes ARRIVE 2.0 (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*), que consiste em um checklist com 21 itens (du Sert, Ahluwalia, et al., 2020; du Sert, Hurst, et al., 2020 com modificações). Em cada trabalho incluído, foram analisados: (1) Desenho do Estudo; (2) Tamanho da amostra; (3) Critérios de inclusão e exclusão; (4) Randomização; (5) Cegamento; (6) Desfechos; (7) Métodos estatísticos; (8) Animais experimentais; (9) Procedimentos experimentais; (10) Resultados; (11) Resumo; (12) Embasamento científico; (13) Objetivos; (14) Declaração ética; (15) Alojamento e manejo; (16) Cuidados com animais e monitoramento; (17) Interpretação /Implicações científicas; (18) Aplicabilidade / tradução; (19) Registro do Protocolo; (20) Acesso aos dados e (21) Declaração de interesses. Não foram incluídas questões relacionadas a medições de resultados primários, tamanho do efeito e registro de protocolo. Este procedimento foi conduzido de forma independente por dois membros da equipe (M.Q.A e L.O.G.E) e, em caso de discordância, foi resolvida com um terceiro revisor.

## 3.4 Resultados

### 3.4.1 Estudos incluídos

A estratégia de busca permitiu a recuperação de 883 artigos nas três bases de dados (Fig. 1). Após exclusão das duplicatas (n = 313), 570 registros foram triados por meio da leitura de título, resumo e palavras-chave. Destes, 531 artigos foram excluídos de acordo com os critérios de exclusão. Ao final, apenas 21 artigos foram considerados elegíveis a prosseguirem nesta revisão sistemática (Fig. 1). Nenhum estudo relevante foi encontrado nas referências dos trabalhos incluídos. A lista com todos os estudos relevantes incluídos nesta revisão sistemática é apresentada na Tabela suplementar 3.

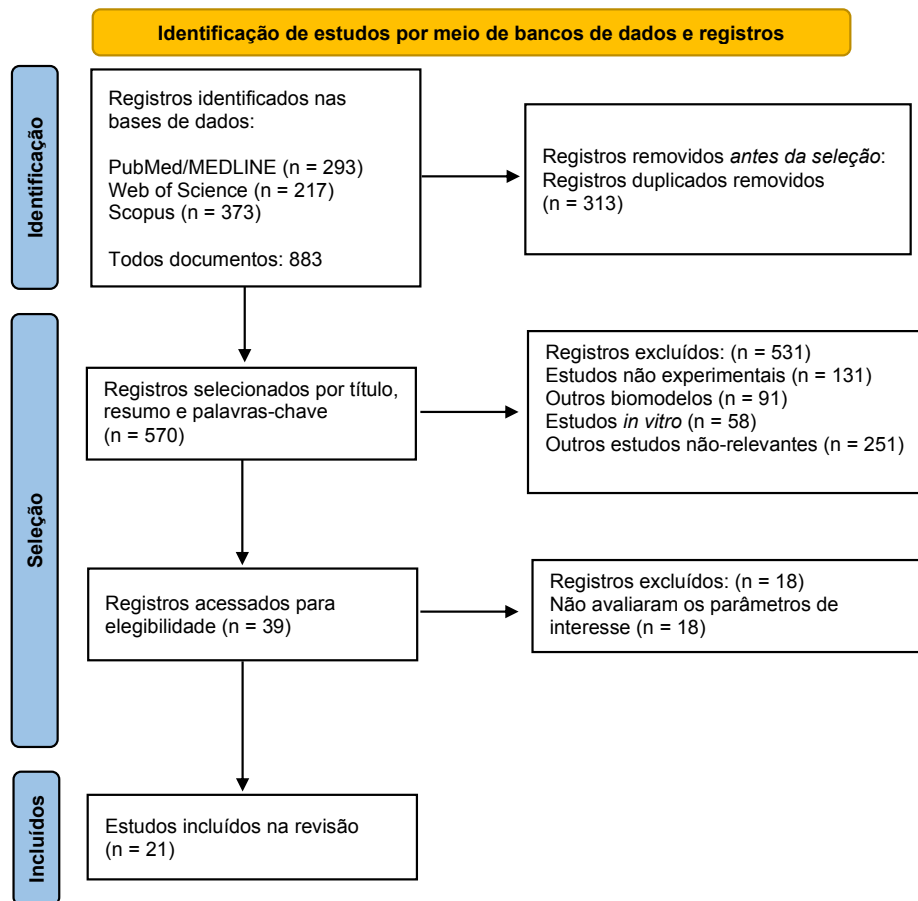


Figura 1: Diagrama de fluxo dos resultados das buscas bibliográficas para a revisão sistemática, adaptado de PRISMA ([www.prisma-statement.org](http://www.prisma-statement.org)). (n) = número de estudos.

### 3.4.2 Características das publicações, design experimental e medição da pressão sanguínea

Os estudos selecionados para esta revisão foram publicados entre 1983 e 2022. Os países que mais estudaram os efeitos da hipertensão sobre parâmetros testiculares foram Nigéria (n = 4), Brasil, Espanha e Turquia (n = 3 cada), Estados Unidos e Tailândia (n = 2 cada), seguidos de Bulgária, Canadá, Indonésia e Taiwan (n = 1 cada) (Tabela suplementar 3). Todos os estudos utilizaram ratos como modelo experimental, sendo a linhagem Wistar a mais utilizada (n = 7), seguida de Sprague-Dawley (n = 3). Os demais trabalhos usaram mais de uma linhagem de forma combinada, como Wistar-Kyoto e SHR (n = 6), Wistar e SHR (n = 2), além de Wistar-Kyoto, SHR e Long-Evans, Wistar-Kyoto, SHR e Sprague-Dawley (n = 1 cada). Apenas um estudo não reportou este dado. Doze estudos reportaram o peso dos animais, que pesavam entre 100g e 300g e nove estudos não indicaram essa informação. Os ratos usados tinham entre 30 dias de vida a 8 meses (n = 11) e três trabalhos informaram apenas que os animais já eram adultos, sem indicar a real idade. Sete estudos não informaram qual a idade dos animais usados (Tabela 1).

O composto mais usado para a indução de hipertensão foi o N(G)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) na dose de 40 mg kg<sup>-1</sup> (n = 8; Tabela 1). Os outros trabalhos utilizaram 25 mg kg<sup>-1</sup> de ciclosporina, 30 µg kg<sup>-1</sup> dexametasona ou cloreto de sódio a 8% (n = 1 cada). A administração dos compostos para indução da hipertensão foi feita por via oral e intraperitoneal (n = 4 cada), gavagem (n = 2) e via subcutânea (n = 1; Tabela 1). Os trabalhos que não relataram tais informações são aqueles em que os animais eram SHR e não receberam nenhum tipo de tratamento específico (n = 10). O tempo dos experimentos variou entre 1 e 20 semanas (n = 14), sendo que sete dos artigos incluídos não relataram este dado. A pressão sanguínea dos animais foi medida usando o método não invasivo (pletismografia do manguito da cauda) (n = 11) e método invasivo (inserção de cateter na artéria carótida) (n = 4). Um trabalho usou os dois

métodos para medir a pressão sanguínea dos animais e cinco não relataram ter feito a medição da pressão (Tabela 1).

Tabela 1: Características das publicações e dos animais experimentais dos estudos com hipertensão arterial sistêmica em modelos murinos machos.

Estudo ID	Referência	Modelos animais	Design experimental (n animal)	Medição da pressão sanguínea
1	Adedara et al., 2018	Linhagem animal: Wistar Peso (g): 134 - 152 Idade: 7 semanas	Grupo controle: água destilada (n=10) Grupo hipertenso: L- NAME (40 mg kg <sup>-1</sup> ) (n=10) Administração: oral Tempo de experimento: 4 semanas	Método não-invasivo
2	Aguilar et al., 1992	Linhagem animal: SHR e WKY Peso (g): NC Idade: 30, 60 e 90 dias	Grupo controle: WKY (n=NC) Grupo hipertenso: SHR (n=NC) Administração: NA Tempo de experimento: NC	Método não-invasivo
3	Akinyemi et al., 2015	Linhagem animal: Wistar Peso (g): 200 - 300 Idade: adulto	Grupo controle: água destilada (n=10) Grupo hipertenso: L- NAME 40 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> (n=10) Administração: gavagem Tempo de experimento: 10 dias	Método não-invasivo
4	Akomolafe et al., 2022	Linhagem animal: Wistar Peso (g): 170 - 230 Idade: NC	Grupo controle: NC (n=10) Grupo hipertenso: Ciclosporina 25 mg kg <sup>-1</sup> (n=10) Administração: intraperitoneal Tempo de experimento: 7 dias	Método não-invasivo
5	Amador et al., 1983	Linhagem animal: SHR e WKY Peso (g): NC Idade: 17 semanas	Grupo controle: WKY (n= 9) Grupo hipertenso: SHR (n=10) Administração: NA Tempo de experimento: NC	NA
6	Atanassova et al., 2009	Linhagem animal: SHR e Wistar Peso (g): NC Idade: 16 semanas	Grupo controle: Wistar (n=6) Grupo hipertenso: SHR (n=11) Administração: NA Tempo de experimento: NC	Método não-invasivo
7	Aykan et al., 2020	Linhagem animal: Wistar Peso (g): 200 - 300 Idade: adulto	Grupo controle: solução salina (n= 6) Grupo hipertenso: Dexametasona 30 µg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> (n= 6)	Método invasivo

			Administração: subcutânea Tempo de experimento: 18 dias	
8	Aziz et al., 2021	Linhagem animal: Wistar Peso (g): 150 - 200 Idade: 2 -3 meses	Grupo controle: solução salina (n= NC) Grupo hipertenso: L-NAME 40 mg kg <sup>-1</sup> (n= NC) Administração: intraperitoneal Tempo de experimento: 14 dias	NA
9	Bechara et al., 2015	Linhagem animal: SHR e WKY Peso (g): NC Idade: 12 semanas	Grupo controle: WKY (n=8) Grupo hipertenso: SHR (n=13) Administração: NA Tempo de experimento: 10 semanas	Método não-invasivo
10	Belanger et al., 2003	Linhagem animal: SHR, WKY e Sprague- Dawley Peso (g): NC Idade: 6 – 8 meses	Grupo controle: WKY (n = 23) e Sprague- Dawley (n=30) Grupo hipertenso: SHR (n=27) Administração: NA Tempo de experimento: NC	Método invasivo
11	Chiangsaen et al., 2020	Linhagem animal: Sprague – Dawley Peso (g): 220 - 240 Idade: adulto	Grupo controle: água da torneira (n=8) Grupo hipertenso: L- NAME 40 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> (n=8) Administração: oral/água de beber Tempo de experimento: 5 semanas	Método invasivo
12	Clark et al., 1991	Linhagem animal: SHR, WKY e Long-Evans Peso (g): NC Idade: 7 semanas	Grupos controles: WKY e Long-Evans (n=13 cada) Grupo hipertenso: SHR (n=13) Administração: NA Tempo de experimento: 13 semanas	Método não invasivo
13	Colli et al., 2019	Linhagem animal: SHR e Wistar Peso (g): NC Idade: NC	Grupo controle: Wistar (n= NC) Grupo hipertenso: SHR (n= NC) Administração: NA Tempo de experimento: NC	Método não-invasivo e invasivo
14	Gulhan, 2018	Linhagem animal: Sprague – Dawley Peso (g): 250 - 300 Idade: NC	Grupo controle: Solução salina (n=7) Grupo hipertenso: L- NAME 40 mg kg <sup>-1</sup> (n=7) Administração: Intraperitoneal Tempo de experimento: 28 dias	NA

15	Iloh et al., 2022	Linagem animal: Wistar Peso (g): 100 - 110 Idade: NC	Grupo controle: NC (n= 8) Grupo hipertenso: 8% NaCl (n= 8) Administração: gavagem Tempo de experimento: 8 semanas	NA
16	Kuo et al., 2022	Linagem animal: SHR e WKY Peso (g): NC Idade: NC	Grupo controle: WKY (n=NC) Grupo hipertenso: SHR (n=NC) Administração: NA Tempo de experimento: 20 semanas	NA
17	Pinilla et al., 1992	Linagem animal: SHR e WKY Peso (g): NC Idade: 90 dias	Grupo controle: WKY (n=5) Grupo hipertenso: SHR (n=5) Administração: NA Tempo de experimento: NC	Método não-invasivo
18	Poasakate et al., 2020	Linagem animal: Sprague – Dawley Peso (g): 180 - 220 Idade: NC	Grupo controle: água (n=8) Grupo hipertenso: L- NAME 40 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> (n=8) Administração: oral Tempo de experimento: 5 semanas	Método não-invasivo
19	Rodriguez-Padilla et al., 1987	Linagem animal: SHR e WKY Peso (g): NC Idade: 60 e 90 dias	Grupo controle: SHR (n=NC) Grupo hipertenso: WKY (n=NC) Administração: NA Tempo de experimento: NC	Método não invasivo
20	Salami et al., 2017	Linagem animal: NC Peso (g): 150 - 190 Idade: 8 semanas	Grupo controle: solução salina (n=5) Grupo hipertenso: L- NAME 40 mg kg <sup>-1</sup> (n=5) Administração: oral Tempo de experimento: 6 semanas	Método não-invasivo
21	Talas, 2013	Linagem animal: Wistar Peso (g): 200 - 250 Idade: NC	Grupo controle: solução salina (n=7) Grupo hipertenso: L- NAME 40 mg kg <sup>-1</sup> Administração: intraperitoneal Tempo de experimento: 15 dias	Método invasivo

---

NC: dados não citados no texto; NA: não se aplica; SHR: Ratos espontaneamente hipertensos; WKY: Wistar-Kyoto; L- NAME: N(G)-nitro-L-arginina metil éster.

### 3.4.3.1 Validação da hipertensão arterial sistêmica

Em relação a parâmetros de hipertensão arterial nos animais experimentais, estes apresentaram elevação da sístole (Tabela 2<sup>1, 3, 4, 6, 9-13, 18-21</sup>), da diástole (Tabela 2<sup>1, 4, 11, 13, 20, 21</sup>), da pressão arterial média (Tabela 2<sup>1, 4, 11, 13, 20, 21</sup>) e da frequência cardíaca (Tabela 2<sup>4, 11, 13</sup>). Estes parâmetros validam a presença da hipertensão arterial sistêmica nos animais usados em cada estudo.

### 3.4.3.2 Efeitos da hipertensão arterial sistêmica em parâmetros testiculares e hormonais

Alguns trabalhos descreveram aumento do peso absoluto testicular (Tabela 2<sup>5, 9, 13, 16</sup>) e outros apresentaram redução neste parâmetro (Tabela 2<sup>10, 20</sup>). Aumento no peso relativo (Tabela 2<sup>2, 10, 12, 13, 19</sup>), volume (Tabela 2<sup>9, 17</sup>) e tamanho testicular (Tabela 2<sup>16</sup>) também foram relatados.

No geral, gonadotrofinas hormônio folículo estimulante (FSH) (Tabela 2<sup>1, 4</sup>) e hormônio luteinizante (LH) (Tabela 2<sup>1, 4</sup>) encontraram-se reduzidas na circulação sanguínea de animais hipertensos, assim como concentrações séricas de testosterona (Tabela 2<sup>1, 3 - 5, 11, 18</sup>). Outros estudos relataram aumento nas concentrações de FSH (Tabela 2<sup>2, 5</sup>), LH (Tabela 2<sup>19</sup>) e testosterona (Tabela 2<sup>2, 12, 19</sup>). A expressão e/ou atividade das enzimas esteroideogênicas 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (3 $\beta$ -HSD) (Tabela 2<sup>4, 16</sup>) e 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (17 $\beta$ -HSD) (Tabela 2<sup>4</sup>) e expressão da proteína reguladora aguda da esteroideogênese (StAR) (Tabela 2<sup>4, 11, 18</sup>) também estavam reduzidas em animais hipertensos.

Alguns artigos incluídos nesta revisão reportaram alterações histológicas testiculares, como aumento nos espaços intersticiais (Tabela 2<sup>4, 16</sup>) e lúmen (Tabela 2<sup>1</sup>), redução de espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos (Tabela 2<sup>1</sup>), presença de células imaturas no lúmen (Tabela 2<sup>13</sup>), túbulos seminíferos atróficos (Tabela 2<sup>1, 16</sup>) e necrose (Tabela 2<sup>13</sup>).

As principais alterações histomorfométricas descritas nos túbulos seminíferos de animais com hipertensão arterial incluíram aumento no diâmetro do lúmen (Tabela 2<sup>11</sup>), na

densidade volumétrica (Tabela 2<sup>9</sup>) e no volume luminal e dos túbulos seminíferos (Tabela 2<sup>9</sup>). Um artigo relatou diminuição de volume da membrana basal (Tabela 2<sup>9</sup>), densidade volumétrica do epitélio seminífero e da membrana basal (Tabela 2<sup>9</sup>) no testículo dos animais experimentais, enquanto outros dois estudos reportaram redução da área celular e da área de seção transversal dos túbulos, com aumento da área do lúmen (Tabela 2<sup>11,18</sup>). No intertúbulo, observou-se redução da densidade volumétrica do compartimento intertubular (Tabela 2<sup>9</sup>) e aumento no volume e na densidade volumétrica vascular (Tabela 2<sup>9</sup>).

Em relação a parâmetros oxidativos, sete estudos observaram redução na atividade de enzimas antioxidantes testiculares, como catalase (CAT) (Tabela 2<sup>1,4,14,15,18,21</sup>), superóxido dismutase (SOD) (Tabela 2<sup>1,15,18</sup>), glutathione peroxidase (GPx) (Tabela 2<sup>1</sup>) e glutathione S-transferases (GST) (Tabela 2<sup>4,15</sup>) e da molécula glutathione reduzida (GSH) (Tabela 2<sup>1,3</sup>). Estudos também observaram que testículos de animais hipertensos apresentaram altas concentrações de malondialdeído (MDA) (Tabela 2<sup>1,3,4,8,11,14,15,18,21</sup>), proteína carbonilada (Tabela 2<sup>11</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Tabela 2<sup>1</sup>) e EROs (Tabela 2<sup>3,4</sup>). Cinco estudos descreveram diminuição de óxido nítrico (NO) nestes órgãos de animais hipertensos (Tabela 2<sup>1,3,4,14,21</sup>). Portanto, as alterações encontradas em parâmetros histológicos, hormonais e de estresse oxidativo evidenciam danos estruturais e funcionais nos testículos dos modelos murinos provocados pela hipertensão.

#### 3.4.3.3 Efeitos da hipertensão arterial sistêmica em parâmetros biométricos corporais, epididimários e espermáticos

Estudos relataram redução no peso corporal final (Tabela 3<sup>3,6,12,20</sup>) e, outros dois, relataram aumento (Tabela 3<sup>2,10</sup>). No epidídimo, foi relatado diminuição do número de espermatozoides no lúmen (Tabela 3<sup>1</sup>), degeneração do ducto (Tabela 3<sup>1</sup>) e leve congestão intersticial (Tabela 3<sup>20</sup>).

Em relação a parâmetros oxidativos, foi observada redução na atividade das enzimas antioxidantes CAT (Tabela 3<sup>1,4</sup>), GPx (Tabela 3<sup>1</sup>) e GST (Tabela 3<sup>3,4</sup>) e da GSH (Tabela 3<sup>3</sup>). Estudos também observaram nos epidídimos de animais hipertensos altas concentrações de MDA (Tabela 3<sup>1,3,4</sup>), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabela 3<sup>1</sup>) e EROs (Tabela 3<sup>3,4</sup>) e diminuição de NO (Tabela 3<sup>1,3,4</sup>).

Por fim, dez estudos avaliaram parâmetros espermáticos em animais com hipertensão arterial. As principais alterações descritas incluíram diminuição da concentração espermática (Tabela 3<sup>9,11,13,18</sup>), do número de espermatozoides testiculares (Tabela 3<sup>1,4,20</sup>) e epididimários (Tabela 3<sup>1</sup>), aumento na anormalidade morfológica (Tabela 3<sup>3,4,13</sup>), redução no percentual de gametas progressivamente móveis (Tabela 3<sup>1,3,4,7,8,11,18,20</sup>) e com DNA íntegro (Tabela 3<sup>13</sup>). Houve relato de aumento da ocorrência de danos de acrossomo, fragmentação inicial de DNA e aumento na concentração de ânion superóxido e cálcio intracelular no espermatozoide (Tabela 3<sup>13</sup>).

No geral, os danos relatados nos testículos se complementam às alterações encontradas nos epidídimos. Os testículos são órgãos produtores de hormônios, como a testosterona. Distúrbios na expressão e atividade das enzimas da esteroidogênese podem impactar a produção da testosterona, o que compromete a estrutura e função das gônadas e de epidídimos, que são órgãos andrógeno-dependentes. O estresse oxidativo pode ser um dos mecanismos-chave que corrobora com estes prejuízos, uma vez que espécies reativas promovem danos na sinalização e funções celulares, devido à oxidação de proteínas, por exemplo. Coletivamente, estes achados culminam em prejuízos em parâmetros espermáticos, uma vez que os testículos são os órgãos produtores destes gametas e os epidídimos são responsáveis pela sua maturação e estocagem. Com isso, efeitos advindos da hipertensão arterial sistêmica podem comprometer a fertilidade masculina.

**Tabela 2:** Validação da hipertensão arterial sistêmica e seus efeitos em parâmetros testiculares e hormonais em modelos murinos

Categorias	Evidências detalhadas	Referências
Parâmetros sanguíneos	↑ Sístole	1, 3, 4, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 18, 19, 20, 21
	↑ Diástole	1, 4, 11, 13, 20, 21
	↑ Pressão arterial média e pressão sanguínea	1, 4, 11, 13, 20, 21
	↑ Frequência cardíaca	4, 11, 13
	Não alterou - Pressão de pulso	11
Parâmetros biométricos testiculares	Não alterou - Peso absoluto testicular	3, 6, 7, 18
	↓ Peso absoluto testicular	10, 20
	↑ Peso absoluto testicular	5, 9, 13, 16
	Não alterou - Índice organo-somático testicular	1, 6, 11, 18
	Não alterou - Peso relativo testículos	3, 20
	↑ Peso relativo testicular	2, 10, 12, 13, 19
	↑ Volume testicular	9, 17
Hormônios e enzimas esteroidogênicas	↑ Tamanho testicular	16
	↓ Hormônio luteinizante	1, 4
	↑ Hormônio luteinizante	19
	Não alterou - Hormônio luteinizante	5, 19, 20
	↓ Hormônio folículo estimulante	1, 4
	↑ Hormônio folículo estimulante	2, 5
	Não alterou - Testosterona	7, 6, 12, 19, 20
	↓ Testosterona	1, 3, 4, 5, 11, 18
	↑ Testosterona	2, 12, 19
	↓ Atividade e expressão 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase	4, 16
	↓ Atividade e expressão 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase	4
	↓ Expressão proteína reguladora aguda da esteroidogênese	4, 11, 18
↑ Espaços intersticiais	4, 16	

Histopatologia	↑ Lúmen	1
	↓ Espermatozoides no lúmen	1
	Células imaturas no lúmen	13
	Túbulos seminíferos atrofícos	1, 16
	Necrose	13
	Sem alterações importantes	20
Histomorfometria	<b>Túbulo seminífero:</b>	
	Não alterou - Diâmetro do túbulo seminífero	9, 11, 17, 18
	Não alterou - Altura do epitélio	9
	↑ Diâmetro do lúmen	11
	↑ Densidade volumétrica túbulo seminífero e lúmen	9
	Não alterou - Densidade volumétrica túbulo seminífero	17
	↑ Volume túbulo seminífero e lúmen	9
	↓ Volume da membrana basal	9
	↓ Densidade volumétrica epitélio seminífero e membrana basal	9
	Não alterou - Volume epitélio seminífero	9
	↓ Área celular	11, 18
	↓ Área seção transversal dos túbulos	11, 18
	↑ Área luminal	11, 18
	Não alterou - Pontuação de Johnsen	7, 9
	<b>Intertúbulo:</b>	
	Não alterou - Volume do compartimento intertubular	9
	↓ Densidade volumétrica do compartimento intertubular	9
	Não alterou - Densidade volumétrica compartimento intertubular	17
	↑ Volume vascular	9
	↑ Densidade volumétrica vascular	9
	Não alterou - nº de núcleos de Leydig por mm <sup>2</sup> de intertúbulo	17
	Não alterou - nº de núcleos de Sertoli por seção transversal do túbulo seminífero	17

Estresse oxidativo	↓ Catalase	1, 4, 14, 15, 18, 21
	↓ Superóxido dismutase	1, 15, 18
	↓ Glutaciona peroxidase	1
	↓ Glutaciona reduzida	1, 3
	↓ Glutacionas S- transferases	4, 15
	Não alterou - Glutacionas S- transferases	3
	↑ Peróxido de hidrogênio	1
	↓ Óxido nítrico	1, 3, 4, 14, 21
	↑ Malondialdeído	1, 3, 4, 8, 11, 14, 15, 18, 21
	↑ Proteína carbonilada	11
	↓ Nível de tiol proteico e não proteico	3, 4
	↑ Espécies reativas de oxigênio	3, 4
	↓ Status antioxidante total	14
	↓ Status oxidante total	14
	↓ Capacidade antioxidante total	15

↑ aumento; ↓ diminuição. Os trabalhos que correspondem aos números aqui mostrados estão indicados na Tabela 2.

**Tabela 3:** Efeitos da hipertensão arterial em parâmetros biométricos corporais, epididimários e espermáticos em modelos murinos

Categorias	Evidências detalhadas	Referências
Parâmetros biométricos corporais	Não alterou - Ganho de peso corporal	1
	Não alterou - Peso corporal final	10, 11, 18, 19
	↓ Peso corporal final	3, 6, 12, 20
	↑ Peso corporal final	2, 10
	Não alterou – Peso relativo da cauda do epidídimo	12
Histopatologia do epidídimo	Degeneração do ducto epididimário	1
	↓ espermatozoides no lúmen ductal	1
	Leve congestão intersticial	20
	Sem alterações importantes	4, 20
Estresse oxidativo do epidídimo	↓ Catalase	1, 4
	Não alterou – Superóxido dismutase	1
	↓ Glutaciona peroxidase	1
	↓ Glutaciona reduzida	3
	Não alterou – Glutaciona reduzida	1
	↓ Glutacionas S- transferases	3, 4
	↑ Peróxido de hidrogênio	1
	↓ Óxido nítrico	1, 3, 4
	↑ Malondialdeído	1, 3, 4
	↓ Nível de tiol proteico e não proteico	3, 4
	↑ Espécies reativas de oxigênio	3, 4
Parâmetros espermáticos epididimários	↓ Concentração espermática	9, 11, 13, 18
	↓ Número de espermatozoides testiculares	1, 4, 20
	↓ Número de espermatozoides epididimários	1
	↑ Anormalidade	3, 4, 13
	Não alterou – Anormalidade	1, 7, 20

Não alterou – Viabilidade celular	1, 3, 9, 20
Não alterou - Porcentagem de motilidade progressiva	9, 13
↓ Porcentagem de motilidade progressiva	1, 3, 4, 7, 8, 11, 18, 20
Atividade mitocondrial: ↓ Classe I – alta atividade mitocondrial; ↑ Classe III e IV – maioria inativa e apenas mitocôndrias inativas, respectivamente.	13
↑ Danos no acrossomo	13
↓ Integridade de DNA	13
↑ Fragmentação inicial de DNA	13
↑ Presença do ânion superóxido intracelular	13
Não alterou – Análises espermáticas assistidas por computador (CASA)	13
↑ Cálcio intracelular	8

↑ aumento; ↓ diminuição. Os trabalhos que correspondem aos números aqui mostrados estão indicados na Tabela 2.

#### 3.4.4 Análise de qualidade dos estudos

Todos os 21 estudos incluídos nesta revisão sistemática relataram seu desenho de estudo, detalhes sobre espécies animais, design experimental, resultados, suas interpretações e resumo (Fig. 2). A maioria dos estudos, forneceu informações de grupos experimentais (n = 20), tamanho amostral (n = 15), critérios de inclusão (n = 11), número de animais por grupo (n = 16), desfechos (n = 17), métodos estatísticos e *softwares* usados (n = 20). Eles também reportaram quando, com que frequência (n = 19) e onde foram feitos os procedimentos experimentais (n = 11), embasamento científico (n = 19), objetivos de realização dos experimentos (n = 19), declarações éticas e fontes de financiamento (n = 14, cada) e declarações de conflito de interesse (n = 13). Apesar disso, menos da metade dos trabalhos detalhou métodos usados na definição de análises estatísticas (n = 7), relevância para a biologia humana (n = 9), alojamento e manejo dos animais (n = 10), estado de saúde, redução de dor, desfechos humanitários e limitações dos estudos (n = 1, cada), generalização dos resultados para outras condições experimentais (n = 6) e disponibilidade de acesso aos dados dos estudos (n = 4). Nenhum dos artigos relatou como foi determinado o tamanho amostral, se houve exclusão de animais, justificativa para procedimentos e intervenções no cuidado e monitoramento dos animais (eventos adversos), bem como se usaram estratégias de randomização (alocação e fatores de confusão) e experimentos cegos (Fig. 2). Portanto, a partir da ferramenta ARRIVE Guidelines 2.0, foram verificadas limitações nos 21 estudos incluídos nesta revisão. A caracterização inexistente de itens relacionados, por exemplo, aos cuidados dos animais, randomização e cegamento e o relato incompleto das metodologias usadas acabou gerando viés importante nos resultados. Como apenas em um trabalho os autores discutiram as limitações do estudo, isso pode interferir no planejamento e realização de estudos futuros. Portanto, no geral, a reprodutibilidade dos experimentos e comparações futuras com outros estudos podem ser comprometidas.



Figura 2: Gráfico de barras com as perguntas das diretrizes ARRIVE 2.0 e as frequências das opções 'Sim' e 'Não' dos 21 artigos elegidos nesta revisão sistemática. Linha azul tracejada - mediana das frequências.

### 3.5 Discussão

Este trabalho é a primeira revisão sistemática referente aos efeitos adversos da hipertensão arterial sistêmica em parâmetros reprodutivos masculinos, com enfoque em eventos

gonadais. Apesar da avaliação da qualidade dos estudos ter mostrado alguns pontos frágeis, espera-se que, com o uso das diretrizes ARRIVE 2.0, eleve-se a transparência, comparação e reprodutibilidade de trabalhos futuros. De maneira geral, a hipertensão arterial sistêmica foi capaz de afetar parâmetros testiculares, comprometendo histologia do órgão e balanço oxidativo local, o que prejudicou a função dos testículos, resultando na redução de testosterona e da produção de espermatozoides. Além disso, a hipertensão arterial afetou eventos pós-testiculares, alterando parâmetros teciduais dos epidídimos, hormonais e espermáticos que podem comprometer a fertilidade masculina.

Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são frequentemente usados como modelo genético de hipertensão primária, comparado com o controle normotenso Wistar Kyoto (Pinto et al., 1998). A linhagem SHR foi obtida através da endogamia de ratos Wistar que possuíam a pressão sanguínea mais elevada, sendo que a pressão arterial nestes animais aumenta por volta da 5ª e 6ª semana de idade e atinge um platô na 12ª semana de vida (Clark et al., 1991; Pinto et al., 1998). Há também modelos com hipertensão induzida por substâncias como o L-NAME, um inibidor da enzima NO sintase (NOS), que catalisa a produção de NO, importante vasodilatador que atua na manutenção da pressão arterial normal (Saravanakumar & Raja, 2011). De fato, análogos de L-arginina, como L-NAME, têm sido amplamente utilizados para alcançar condições de deficiência de NO, fator importante no desenvolvimento da hipertensão (Kopincová et al., 2012). A administração crônica de L-NAME aumenta a pressão sanguínea nos animais, sendo que os ratos usados para essa indução são animais normotensos de linhagens como Wistar e Sprague-Dawley (Pollock & Rekito, 1998; Mishra et al., 2008). Além de L-NAME, a hipertensão também pode ser induzida por uso crônico de dexametasona, que influencia volume plasmático, sistema renina-angiotensina-aldosterona e papel de vasoconstritores e vasodilatadores (Ong et al., 2009), sendo o sulfeto de hidrogênio mediador químico importante para disfunção vascular na hipertensão induzida por dexametasona (di Villa

Bianca et al., 2015). Em ratos com hipertensão induzida por ciclosporina, há alterações marcantes nos rins, incluindo vasoconstrição, redução da filtração glomerular e retenção de sódio (Taler et al., 1999), sendo que há mudanças nos transportadores de sódio e canais de água nos túbulos renais, de forma a reter sódio especialmente na alça de Henle (Esteva-Font et al., 2007).

A maior parte dos animais usados nos experimentos possuíam idade mínima próxima ou superior ao adulto jovem (~ 60 dias), essencial para avaliação dos parâmetros reprodutivos, uma vez que atingiram o estágio de maturação sexual (Picut et al., 2017). Por ser uma doença sistêmica, o peso corporal pode ser um indicador do status geral de saúde dos animais (EPA, 1996) após a indução da hipertensão. Curiosamente, para aqueles experimentos em que os animais usados eram espontaneamente hipertensos, a medição do peso corporal não parece ser um dado relevante, uma vez que não é necessária para evidenciar a validação do quadro clínico ou ajustar a dosagem de substância indutora.

Estudos prévios mostram que a elevação da pressão é um dos indicadores da hipertensão (Atanassova et al., 2009; Belanger et al., 2003; Lissbrant et al., 1997; Mills et al., 2020; Oparil et al., 2018). Alguns dos métodos de medição da pressão arterial mais usados em modelos murinos são a pletismografia do manguito da cauda e a inserção de cateter com fluido. O método não invasivo é mais recomendado por ser de mais fácil execução e seguro. Já o método invasivo oferece medição direta e contínua, porém sua execução é mais difícil por ser um método cirúrgico (Valério et al., 2022). Nos trabalhos avaliados, o aumento nos parâmetros sanguíneos como a pressão arterial média, as pressões sanguíneas sistólica e diastólica e a frequência cardíaca validam a presença da hipertensão arterial nos modelos animais.

Em condições de hipertensão arterial, foi encontrado comprometimento nas concentrações plasmáticas dos hormônios hipofisários (Adedara et al., 2018; Akinyemi et al., 2015). Isto influencia diretamente na produção de testosterona, uma vez que a atuação do LH e

FSH garante a manutenção da produção testicular deste hormônio e do processo de espermatogênese (Oduwole et al., 2018). Acredita-se que os andrógenos têm um papel importante na pressão sanguínea de humanos e ratos (Azu, 2015). Ratos SHR possuem baixas concentrações séricas de testosterona (Rodriguez-Padilla et al., 1987), sendo associadas à disfunção endotelial e ao aumento do risco de eventos cardiovasculares adversos (Chasland et al., 2021; Vlachopoulos et al., 2013). Portanto, têm-se hipotetizado que a testosterona influencia na regulação da pressão arterial, modulando a função endotelial e esta, quando elevada, afeta negativamente a esteroidogênese (Fogari et al., 2005), afetando a atividade de enzimas deste processo (Akomolafe et al., 2022). Portanto, baixa concentração de testosterona pode ser também consequência da redução da expressão e/ou atividade de enzimas da esteroidogênese, como  $3\beta$ -HSD,  $17\beta$ -HSD e StAR. Evidências indicam a ocorrência de redução na expressão de StAR e nas concentrações de testosterona sérica em ratos hipertensos (Alves-Pereira et al., 2014). Baixas concentrações deste hormônio, associados ao estresse oxidativo, podem levar à disfunção endotelial. Essa disfunção do endotélio pode, entre outros fatores, comprometer a dilatação das artérias do corpo cavernoso (Navaneethabalakrishnan et al., 2020), levando à disfunção erétil, que prejudica a atividade sexual de indivíduos hipertensos (Bansal, 1988; Fogari et al., 2002).

Por serem órgãos andrógeno-dependentes, era esperado que houvesse uma diminuição do peso e tamanho/volume dos testículos em resposta à redução das concentrações de testosterona nos animais hipertensos. Porém, apesar das concentrações de testosterona plasmática terem sido menores, os trabalhos que apontaram um aumento no peso absoluto dos testículos foram aqueles que trabalharam com ratos SHR, em que naturalmente se encontra um peso maior/hipertrofia nestes órgãos quando comparados com os Wistar Kyoto, (Amador et al., 1983; Clark et al., 1991), possivelmente devido às mudanças vasculares (Colli et al., 2019).

Em geral, houve diminuição da atividade de enzimas antioxidantes, com aumento concomitante na produção de EROs e marcadores de estresse oxidativo nos testículos e epidídimos de ratos hipertensos. Estudos clínicos já relataram uma relação inversa entre a pressão arterial e antioxidantes plasmáticos (Redón et al., 2003) e uma correlação positiva entre aumento da pressão e biomarcadores de estresse oxidativo (Verma et al., 2019). A maquinaria antioxidante da célula desempenha um papel essencial no estabelecimento do equilíbrio entre a produção de EROs e ERNs e lesões inflamatórias nos tecidos (Mittal et al., 2014). Mas em pacientes hipertensos, enzimas como GPx, CAT e SOD já demonstraram ter atividade reduzida (Briones & Touyz, 2010), comprometendo a proteção de tecidos contra atuação dos radicais livres (Dikalov & Ungvari, 2013). Este comprometimento pode acontecer, por exemplo, por alterações na expressão destas enzimas (Briones & Touyz, 2010). EROs podem inibir a atividade da Sirtuina 1, que reduz ativação da proteína quinase ativada por AMP e faz com que a expressão de enzimas antioxidantes, como manganês superóxido dismutase e catalase também seja diminuída. (Gallo et al., 2022).

Concentrações aumentadas de EROs e peróxidos lipídicos são relatados em pacientes hipertensos (Touyz, 2000), enquanto o poder antioxidante redutor férrico (FRAP) se mostra reduzido (Verma et al., 2019). Para o sistema cardiovascular, as espécies reativas  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  e NO são de grande importância (Ardanaz & Pagano, 2006). No processo hipertensivo, medeiam efeitos em nível celular, com sinalização celular aberrante e modificação pós-translacional e/ou inativação de proteínas (oxidação e fosforilação) (Gallo et al., 2022; Rodrigo et al., 2011). Ang II aumenta a produção de EROs mitocondrial (Dikalova et al., 2010; Koh et al., 2009) e EROs derivadas de NOXs atravessam a membrana mitocondrial e promovem vazamento de elétrons, o que faz com que mitocôndrias funcionem como maquinarias de desregulação do status redox e amplificação do estresse oxidativo (Dikalov & Ungvari, 2013; Dikalova et al., 2010; Griendling et al., 2021). EROs podem ativar fator nuclear (NF- $\kappa$ B) pela inibição de Sirtuina 1,

por exemplo, proteína tirosina fosfatases e fatores de transcrição sensíveis a redox e alterar homeostase do cálcio intracelular (Gallo et al., 2022). Também comprometem produção e biodisponibilidade de NO, devido a desacoplamento de eNOS (Dikalov & Ungvari, 2013) e pela formação de peroxinitrito a partir da reação de  $O_2^-$  e NO (Rodrigo et al., 2011).  $H_2O_2$  pode comprometer a arquitetura testicular (Bisht et al., 2017), modular a função das células de Leydig e diminuir a atividade da enzima esteroidogênica  $3\beta$ -HSD (Wang et al., 2015) devido a peroxidação lipídica e apoptose (Gautam et al., 2006). Como consequência deste desbalanço, já foi mostrado que pacientes e animais experimentais hipertensos tem redução no status antioxidante total e aumento nas concentrações circulantes de MDA quando comparados com os indivíduos normotensos (Redón et al., 2003).

O estresse oxidativo colabora para aparecimento de características do fenótipo vascular na hipertensão (Gallo et al., 2022; Griendling et al., 2021; Paravicini & Touyz, 2006). De fato, os principais impulsionadores da hipertensão são processos de estresse oxidativo e inflamação (Harrison, 2013; Oparil et al., 2018; Touyz et al., 2020). Ainda não está bem elucidado se a elevação das EROs é causa ou consequência do aumento da pressão sanguínea (Briones & Touyz, 2010). Mas sabe-se que um sistema *feedforward* é formado, de maneira que o estresse oxidativo induz a elevação da pressão, que por sua vez eleva a geração de EROS e consequentemente agrava o dano oxidativo (Azu, 2015; Briones & Touyz, 2010). Apesar de ainda não haver um consenso, evidências mostram que fatores pró-hipertensivos e inflamatórios como Ang II, endotelina-1 (ET-1), aldosterona, fator de crescimento do endotélio vascular, fator de necrose tumoral (TNF) e forças mecânicas, como tensão de cisalhamento, são estímulos que ativam sistemas pró-oxidantes (Paravicini & Touyz, 2006). Estes fatores atuam nas enzimas encontradas nas células da parede de vasos sanguíneos (Harrison, 1997), como NOXs e eNOS, em mecanismos mitocondriais e do retículo endoplasmático, resultando no aumento de EROs (Guzik & Griendling, 2009; Griendling et al., 2021). Mediadores inflamatórios como citocinas

podem ativar cascatas de transdução de sinal, bem como induzir alterações em fatores de transcrição, como NF- $\kappa$ B, transdutor de sinal e que medeiam respostas imediatas ao estresse celular (Reuter et al., 2010). Diante deste contexto, estresse oxidativo é central na patologia da hipertensão, tanto como iniciador da inflamação vascular e renal, pela atuação das espécies reativas, quanto como consequência de respostas inflamatórias e citocinas (Guzik & Touyz, 2017; Mittal et al., 2014). Todos estes processos contribuem para remodelação vascular, pela vasoconstrição, crescimento celular, deposição de proteínas da matriz extracelular, ativação de metaloproteinases da matriz, inflamação e aumento do tônus vascular (Gallo et al., 2022).

A eNOS já foi identificada em várias partes do corpo, incluindo o ducto deferente, epidídimo e testículos, mas sobretudo nas células de Leydig, de Sertoli e do endotélio vascular. Com isso, é sugerido um papel para a eNOS na espermatogênese, na maturação do espermatozoide (O'Bryan et al., 1998; Zini et al., 1996) e na modulação das funções sexuais e reprodutivas em espécies de mamíferos. Isso ocorre pois, quando ativada, produz NO que influencia na hemodinâmica, na mediação da ereção peniana (Burnett et al., 1995; Zini et al., 1996) e na motilidade e capacitação do espermatozoide em ensaios *in vitro* (O'Bryan et al., 1998; Zini et al., 1996). Assim, estresse oxidativo também parece ter um papel importante no dimorfismo sexual na hipertensão. Estudos com animais mostram que ele participa no desenvolvimento e manutenção da hipertensão em ratos machos e estudos clínicos e pré-clínicos demonstram que os biomarcadores de estresse oxidativo são mais elevados em homens do que em mulheres (Reckelhoff et al., 2019; Touyz et al., 2020).

Há evidências que correlacionam a deficiência crônica de NO e supressão da liberação de LH e FSH, com consequente alteração do controle de *feedback* negativo da testosterona em ratos (Barnes et al., 2002). A diminuição significativa das concentrações plasmáticas destes hormônios contribui para alterações degenerativas na morfometria e estereologia testicular em ratos hipertensos. FSH e testosterona atuam na manutenção das células germinativas para que

não ocorra descolamento prematuro do epitélio seminífero (Blanco-Rodríguez & Martínez-García, 1998), sendo essencial para manter a integridade do compartimento tubular (Sharpe et al., 1992). Uma vez que houve a redução hormonal nos animais hipertensos, era esperado comprometimento da função das células de Sertoli e da progressão da espermatogênese (Azu, 2015), com desprendimento das células germinativas do epitélio seminífero (Smith; Walker, 2014) e apoptose (Blanco-Rodríguez & Martínez-García, 1998). Alterações como depleção de células germinativas dos túbulos seminíferos já foram relatadas em ratos espontaneamente hipertensos, podendo ser também consequência das mudanças vasculares que levam a distúrbios no epitélio seminífero (Atanassova et al., 2009). Estágios iniciais da espermatogênese são muito sensíveis e até mesmo reduções discretas no fluxo sanguíneo podem ter um grande impacto na produção espermática, sendo que túbulos seminíferos podem degenerar e apresentar espermatogônias em morte celular (Bergh et al., 2001). Nos SHR, as alterações vasculares induzem isquemia e diminuição da nutrição dos testículos e isso pode comprometer as células de Sertoli, que recebem suprimento sanguíneo direto nos túbulos seminíferos e nas células germinativas, com danos à espermatogênese (Azu, 2015). Em SHRSP, já foram relatados vários graus de hipoespermatogênese e túbulos seminíferos atróficos com células de Sertoli predominantes (Akagashi et al., 1996). Portanto, parece muito plausível que essas manifestações histopatológicas e morfométricas encontradas nos túbulos seminíferos sejam também resultados das condições vasculares perturbadas e de hipóxia resultantes da hipertensão (Azu, 2015). Adicionado a isso, as alterações observadas nas arquiteturas testicular e epididimária de ratos hipertensos induzidos por L-NAME podem estar relacionadas ao efeito direto ou indireto da elevação de EROs e ocorrência de peroxidação lipídica (Adedara et al., 2018; Akinyemi et al., 2015). Coletivamente, todos esses distúrbios, provocados pelas diferentes causas supracitadas, podem resultar em túbulos seminíferos atróficos, células

destacadas do epitélio seminífero e redução na quantidade de espermatozoides presentes no lúmen dos túbulos seminíferos e, conseqüentemente, no ducto epididimário.

É consenso na literatura que o estresse oxidativo é uma das principais causas de falha reprodutiva masculina (John Aitken, 1995; Ko et al., 2014; Lavranos et al., 2012). Os danos causados por espécies reativas incluem danos à integridade do DNA (Agarwal et al., 2003), como fragmentação do DNA (Hales et al., 2005) e peroxidação lipídica. Esta última pode prejudicar a fluidez da membrana plasmática do espermatozoide, resultando em penetração ineficiente no ovócito, comprometendo a fertilização (John Aitken, 1995). Adicionado a isso, como efeitos adversos da hipertensão, também já foram relatados diminuição no volume de sêmen, motilidade espermática, contagem total de espermatozoides e contagem de espermatozoides móveis (Guo et al., 2017), redução na integridade do DNA e aumento na morfologia anormal dos espermatozoides (Colli et al., 2019). Acentuada diminuição da motilidade progressiva do espermatozoide pode resultar na sua incapacidade de atingir o local de fertilização (Adedara et al., 2018), o que compromete a fertilidade masculina. A má qualidade do espermatozoide em ratos hipertensos também pode ser devido a uma redução da disponibilidade de NO, já que acomete fluxo sanguíneo testicular, essencial para espermatogênese nos túbulos seminíferos (Barlas & Hatiboğlu, 2002).

### **3.6 Conclusões e perspectivas**

Coletivamente, esses achados apontam para possibilidade dos indivíduos do sexo masculino e hipertensos terem comprometimento das funções testiculares, tanto por distúrbios na produção hormonal quanto na produção de espermatozoides. Um dos mecanismos mais prováveis que conduzem esses resultados é estresse oxidativo, com redução da atividade das enzimas antioxidantes e produção excessiva de EROs. Este desequilíbrio interfere na fisiologia testicular e espermática e pode, portanto, comprometer a produção de espermatozoides.

Porém, por não estar muito claro como a maior parte dos artigos realizou pontos importantes do delineamento experimental, tais como decisão do tamanho da amostra, randomização das unidades experimentais e detalhes sobre cuidados com animais, foi imputado aos trabalhos risco de viés considerável. Tal fato pode comprometer a qualidade das informações encontradas na literatura e encobrir principais lacunas e limitações da pesquisa relacionada ao uso de animais modelos para condições humanas como hipertensão. Portanto, espera-se que em pesquisas futuras haja maior transparência e precisão no relato da metodologia e dos dados que podem aumentar fontes de variação, de forma que haja possibilidade de reprodutibilidade dos estudos e de maior confiabilidade dos dados. Além disso, ainda há poucos trabalhos que relacionam a hipertensão com sistema reprodutor masculino, o que explica os poucos resultados encontrados, por exemplo, nas análises histológicas, que são essenciais para auxiliar no entendimento da patologia da hipertensão.

Diante do exposto, os resultados encontrados possuem relevância científica e clínica ao considerar a relação entre doenças cardiovasculares e fertilidade masculina, contribuindo para entendimento dos principais mecanismos envolvidos nas alterações desencadeadas pela hipertensão e, conseqüentemente, para avaliação do impacto na saúde humana. Portanto, a principal vantagem deste estudo é fornecer uma direção para futuras pesquisas neste campo.

### **3.7 Referências Bibliográficas**

Adedara, I. A., Alake, S. E., Adeyemo, M. O., Olajide, L. O., Ajibade, T. O., & Farombi, E. O. (2018). Taurine enhances spermatogenic function and antioxidant defense mechanisms in testes and epididymis of L-NAME-induced hypertensive rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *97*, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.095>

- Agarwal, A., Saleh, R. A., & Bedaiwy, M. A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. In *Fertility and Sterility* (Vol. 79, Issue 4). [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04948-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04948-8)
- Akagashi, K., Itoh, N., Kumamoto, Y., Tsukamoto, T., Suzuki, T., & Ohta, Y. (1996). Hypertensive changes in intratesticular arteries impair spermatogenesis of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Journal of Andrology*, *17*(4), 367–374.
- Akinyemi, A. J., Adedara, I. A., Thome, G. R., Morsch, V. M., Rovani, M. T., Mujica, L. K. S., Duarte, T., Duarte, M., Oboh, G., & Schetinger, M. R. C. (2015). Dietary supplementation of ginger and turmeric improves reproductive function in hypertensive male rats. *Toxicology Reports*, *2*, 1357–1366. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.10.001>
- Akomolafe, S. F., Olasehinde, T. A., Oladapo, I. F., & Oyeleye I, S. (2022). Diet Supplemented with *Chrysophyllum albidum* G. Don (Sapotaceae) Fruit Pulp Improves Reproductive Function in Hypertensive Male Rats. *Reproductive Sciences*, *29*, 540–556. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00746-5>
- Alves-Pereira, J. L., Frantz, E. D. C., Ramos, C. da F., & da Fonte Ramos, C. (2014). Beneficial Effects of Renin-Angiotensin System Blockers on Testicular Steroidogenesis. *Journal Of Urology*, *192*(6), 1878–1883. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.05.093>
- Amador, A., Steger, R. W., Bartke, A., Johns, A., Hayashi, R. H., & Stallings, M. H. (1983). Pituitary and testicular function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Andrology*, *4*(1), 67–70. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1983.tb00722.x>
- Aranda, P., Ruilope, L. M., Calvo, C., Luque, M., Coca, A., & de Miguel, Á. G. (2004). Erectile dysfunction in essential arterial hypertension and effects of sildenafil: Results of a Spanish national study. *American Journal of Hypertension*, *17*(2). <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2003.09.006>

- Ardanaz, N., & Pagano, P. J. (2006). Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: Regulation and signaling leading to dysfunction. In *Experimental Biology and Medicine* (Vol. 231, Issue 3). <https://doi.org/10.1177/153537020623100302>
- Atanassova, N., Lakova, E., Bratchkova, Y., Krasteva, G., & Donchev, M. (2009). Expression of testicular angiotensin-converting enzyme in adult spontaneously hypertensive rats. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 47(1), 117–122. <https://doi.org/10.2478/v10042-009-0002-6>
- Azu, O. O. (2015). Testicular morphology in spontaneously hypertensive rat model: oxidant status and stereological implications. *Andrologia*, 47(2), 123–137. <https://doi.org/10.1111/and.12233>
- Bansal, S. (1988). Sexual dysfunction in hypertensive men. A critical review of the literature. In *Hypertension* (Vol. 12, Issue 1). <https://doi.org/10.1161/01.HYP.12.1.1>
- Barlas, M., & Hatiboğlu, C. (2002). The effect of nitric oxide in testicular ischemia-reperfusion injury. *International Urology and Nephrology*, 34(1). <https://doi.org/10.1023/A:1021311029572>
- Barnes, M. J., Lapanowski, K., Rafols, J. A., Lawson, D. M., & Dunbar, J. C. (2002). Chronic nitric oxide deficiency is associated with altered leutinizing hormone and follicle-stimulating hormone release in ovariectomized rats. *Experimental Biology and Medicine*, 227(9). <https://doi.org/10.1177/153537020222700915>
- Barroso, W. K. S., Rodrigues, C. I. S., Bortolotto, L. A., Mota-Gomes, M. A., Brandão, A. A., de Magalhães Feitosa, A. D., Machado, C. A., Poli-de-Figueiredo, C. E., Amodeo, C., Mion Júnior, D., Barbosa, E. C. D., Nobre, F., Guimarães, I. C. B., Vilela-Martin, J. F., Yugar-Toledo, J. C., Magalhães, M. E. C., Neves, M. F. T., Jardim, P. C. B. V., Miranda, R. D., ... Nadruz, W. (2021). Brazilian guidelines of hypertension - 2020. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 116(3). <https://doi.org/10.36660/abc.20201238>

- Belanger, M. P., Wallen, W. J., Askin, N., & Wittnich, C. (2003). Effect of hypertension on reproductive organ weights in various strains of rats. *Contemporary Topics In Laboratory Animal Science*, 42(6), 39–41.
- Bergh, A., Collin, O., & Lissbrant, E. (2001). Effects of acute graded reductions in testicular blood flow on testicular morphology in the adult rat. *Biology of Reproduction*, 64(1). <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.1.13>
- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., & Dada, R. (2017). Oxidative stress and male infertility. In *Nature Reviews Urology* (Vol. 14, Issue 8). <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.69>
- Blanco-Rodríguez, J., & Martínez-García, C. (1998). Apoptosis precedes detachment of germ cells from the seminiferous epithelium after hormone suppression by short-term oestradiol treatment of rats. *International Journal of Andrology*, 21(2). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.1998.00109.x>
- Briones, A. M., & Touyz, R. M. (2010). Oxidative stress and hypertension: Current concepts. In *Current Hypertension Reports* (Vol. 12, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s11906-010-0100-z>
- Burnett, A. L., Ricker, D. D., Chamness, S. L., Maguire, M. P., Crone, J. K., Brecht, D. S., Snyder, S. H., & Chang, T. S. K. (1995). Localization of nitric oxide synthase in the reproductive organs of the male rat. *Biology of Reproduction*, 52(1). <https://doi.org/10.1095/biolreprod52.1.1>
- Chasland, L. C., Naylor, L. H., Yeap, B. B., Maiorana, A. J., & Green, D. J. (2021). Testosterone and Exercise in Middle-to-Older Aged Men. *Hypertension*, 77(4). <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.120.16411>
- Chiangsaen, P., Maneesai, P., Kukongviriyapan, U., Tong-un, T., Ishida, W., Prachaney, P., & Pakdeechote, P. (2020). Tangeretin ameliorates erectile and testicular dysfunction in a rat

model of hypertension. *Reproductive Toxicology*, 96, 1–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.05.012>

Clark, J. T., Sahu, A., Mrotek, J. J., & Kalra, S. P. (1991). Sexual function and neuropeptide-y levels in selected brain-regions in male spontaneously hypertensive rats. *American Journal Of Physiology*, 261(5, 2), R1234--R1241.  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1991.261.5.R1234>

Colli, L. G., Belardin, L. B., Echem, C., Akamine, E. H., Antoniassi, M. P., Andretta, R. R., Mathias, L. S., Rodrigues, S. F. de P., Bertolla, R. P., & de Carvalho, M. H. C. (2019). Systemic arterial hypertension leads to decreased semen quality and alterations in the testicular microcirculation in rats. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47157-w>

de Gennaro Colonna, V., Rigamonti, A., Fioretti, S., Bonomo, S., Manfredi, B., Ferrario, P., Bianchi, M., Berti, F., Muller, E. E., & Rossoni, G. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin AT 1-receptor antagonism equally improve endothelial vasodilator function in L-NAME-induced hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology*, 516(3). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.04.004>

Dikalova, A. E., Bikineyeva, A. T., Budzyn, K., Nazarewicz, R. R., McCann, L., Lewis, W., ... & Dikalov, S. I. (2010). Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circulation research*, 107(1), 106-116.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.214601>

di Villa Bianca, R. D. E., Mitidieri, E., Donnarumma, E., Tramontano, T., Brancaleone, V., Cirino, G., ... & Sorrentino, R. (2015). Hydrogen sulfide is involved in dexamethasone-induced hypertension in rat. *Nitric Oxide*, 46, 80-86.  
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.11.013>

- Dikalov, S. I., & Ungvari, Z. (2013). Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension. In *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* (Vol. 305, Issue 10).  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00089.2013>
- Doggrell, S. A., & Brown, L. (1998). Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. In *Cardiovascular Research* (Vol. 39, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(98\)00076-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00076-5)
- du Sert, N. P., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Hurst, V., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., ... Würbel, H. (2020). Reporting animal research: Explanation and elaboration for the arrive guidelines 2.0. In *PLoS Biology* (Vol. 18, Issue 7). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411>
- du Sert, N. P., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., ... Würbel, H. (2020). The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*, 18(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
- Environmental Protection Agency U. S. (EPA) (1996). *Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment*. [https://www.epa.gov/sites/default/files/2014-11/documents/guidelines\\_repro\\_toxicity.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2014-11/documents/guidelines_repro_toxicity.pdf)
- Esteva-Font, C., Ars, E., Guillen-Gomez, E., Campistol, J. M., Sanz, L., Jimenez, W., ... & Fernandez-Llama, P. (2007). Ciclosporin-induced hypertension is associated with increased sodium transporter of the loop of Henle (NKCC2). *Nephrology Dialysis Transplantation*, 22(10), 2810-2816. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfm390>

- Foëx, P., & Sear, J. W. (2004). Hypertension: Pathophysiology and treatment. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain*, 4(3).  
<https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkh020>
- Fogari, R., Preti, P., Zoppi, A., Fogari, E., Rinaldi, A., Corradi, L., & Mugellini, A. (2005). Serum testosterone levels and arterial blood pressure in the elderly. *Hypertension Research*, 28(8). <https://doi.org/10.1291/hypres.28.625>
- Fogari, R., Zoppi, A., Preti, P., Rinaldi, A., Marasi, G., Vanasia, A., & Mugellini, A. (2002). Sexual activity and plasma testosterone levels in hypertensive males. *American Journal of Hypertension*, 15(3). [https://doi.org/10.1016/S0895-7061\(01\)02280-4](https://doi.org/10.1016/S0895-7061(01)02280-4)
- Gallo, G., Volpe, M., & Savoia, C. (2022). Endothelial Dysfunction in Hypertension: Current Concepts and Clinical Implications. *Frontiers in medicine*, 8, 798958.  
<https://doi.org/10.3389/fmed.2021.798958>
- Gautam, D. K., Misro, M. M., Chaki, S. P., & Sehgal, N. (2006). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at physiological concentrations modulates Leydig cell function inducing oxidative stress and apoptosis. *Apoptosis*, 11(1). <https://doi.org/10.1007/s10495-005-3087-1>
- Gonzaga, C. C., Sousa, M. G., & Amodeo, C. (2009). Fisiopatologia da hipertensão sistólica isolada Physiopathology of isolated systolic hypertension. *Rev Bras Hipertens*, 16(1).
- Griendling, K. K., Touyz, R. M., Zweier, J. L., Dikalov, S., Chilian, W., Chen, Y.-R., Harrison, D. G., & Bhatnagar, A. (2016). Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System. *Circulation Research*, 119(5). <https://doi.org/10.1161/res.000000000000110>
- Guo, D., Li, S., Behr, B., & Eisenberg, M. L. (2017). Hypertension and Male Fertility. *The World Journal of Men's Health*, 35(2). <https://doi.org/10.5534/wjmh.2017.35.2.59>

- Guzik, T. J., & Griending, K. K. (2009). NADPH oxidases: molecular understanding finally reaching the clinical level?. *Antioxidants & redox signaling*, *11*(10), 2365-2370. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2615>
- Guzik, T. J., & Touyz, R. M. (2017). Oxidative stress, inflammation, and vascular aging in hypertension. *Hypertension*, *70*(4), 660-667. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.07802>
- Hales, B. F., Aguilar-Mahecha, A., & Robaire, B. (2005). The stress response in gametes and embryos after paternal chemical exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *207*(2 SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.12.021>
- Harrison, D. G. (1997). Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 100, Issue 9). <https://doi.org/10.1172/JCI119751>
- Harrison, D. G. (2013). The Mosaic Theory revisited: Common molecular mechanisms coordinating diverse organ and cellular events in hypertension. In *Journal of the American Society of Hypertension* (Vol. 7, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.jash.2012.11.007>
- Heinrich, A., & DeFalco, T. (2020). Essential roles of interstitial cells in testicular development and function. In *Andrology* (Vol. 8, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/andr.12703>
- Hooijmans, C. R., Tillema, A., Leenaars, M., & Ritskes-Hoitinga, M. (2010). Enhancing search efficiency by means of a search filter for finding all studies on animal experimentation in PubMed. *Laboratory Animals*, *44*(3), 170–175. <https://doi.org/10.1258/la.2010.009117>
- Isidori, A. M., Buvat, J., Corona, G., Goldstein, I., Jannini, E. A., Lenzi, A., Porst, H., Salonia, A., Traish, A. M., & Maggi, M. (2014). A critical analysis of the role of testosterone in erectile function: From pathophysiology to treatment - A systematic review. In *European Urology* (Vol. 65, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.08.048>
- John Aitken, R. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development*, *7*(4). <https://doi.org/10.1071/RD9950659>

- Jordan, J., Kurschat, C., & Reuter, H. (2018). Arterial hypertension-diagnosis and treatment. *Deutsches Arzteblatt International*, *115*(33–34). <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0557>
- Kay, G. W., Grobbelaar, J. A. N., & Hattingh, J. (1992). Effect of surgical restriction of growth of the testicular artery on testis size and histology in bulls. *Journal of Reproduction and Fertility*, *96*(2). <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0960549>
- Ko, E. Y., Sabanegh, E. S., & Agarwal, A. (2014). Male infertility testing: Reactive oxygen species and antioxidant capacity. In *Fertility and Sterility* (Vol. 102, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.10.020>
- Koh, K. K., Oh, P. C., & Quon, M. J. (2009). Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection? In *Cardiovascular Research* (Vol. 81, Issue 4). <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn354>
- Kopincová, J., Púzserová, A., & Bernátová, I. (2012). L-NAME in the cardiovascular system—nitric oxide synthase activator?. *Pharmacological Reports*, *64*(3), 511-520. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70846-0](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70846-0)
- Lavranos, G., Balla, M., Tzortzopoulou, A., Syriou, V., & Angelopoulou, R. (2012). Investigating ROS sources in male infertility: A common end for numerous pathways. In *Reproductive Toxicology* (Vol. 34, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.06.007>
- Lissbrant, E., Lofmark, U., Collin, O., & Bergh, A. (1997). Is nitric oxide involved in the regulation of the rat testicular vasculature? *Biology Of Reproduction*, *56*(5), 1221–1227. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.5.1221>
- Malta, D. C., dos Santos, N. B., Perillo, R. D., & Szwarcwald, C. L. (2016). Prevalence of high blood pressure measured in the Brazilian population, national health survey, 2013. *Sao Paulo Medical Journal*, *134*(2). <https://doi.org/10.1590/1516-3180.2015.02090911>

- Meijles, D. N., & Pagano, P. J. (2016). Nox and inflammation in the vascular adventitia. *Hypertension*, *67*(1),14-19.  
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.03622>
- Midzak, A. S., Chen, H., Papadopoulos, V., & Zirkin, B. R. (2009). Leydig cell aging and the mechanisms of reduced testosterone synthesis. In *Molecular and Cellular Endocrinology* (Vol. 299, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.07.016>
- Mikolajewicz, N., & Komarova, S. v. (2019). Meta-analytic methodology for basic research: A practical guide. *Frontiers in Physiology*, *10*(MAR).  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00203>
- Mills, K. T., Bundy, J. D., Kelly, T. N., Reed, J., Kearney, P., Reynolds, K., Chen, J., & He, J. (2017). Global disparities of hypertension prevalence and Control: A systematic analysis of population-based studies from 90 countries. *Physiology & Behavior*, *176*(3).
- Mills, K. T., Stefanescu, A., & He, J. (2020). The global epidemiology of hypertension. In *Nature Reviews Nephrology* (Vol. 16, Issue 4). <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0244-2>
- Mishra, R. C., Tripathy, S., Quest, D., Desai, K. M., Akhtar, J., Dattani, I. D., & Gopalakrishnan, V. (2008). L-Serine lowers while glycine increases blood pressure in chronic L-NAME-treated and spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension*, *26*(12), 2339-2348. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328312c8a3>
- Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., & Malik, A. B. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & redox signaling*, *20*(7), 1126–1167. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>
- Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D. G., Altman, D., Antes, G., Atkins, D., Barbour, V., Barrowman, N., Berlin, J. A., Clark, J., Clarke, M., Cook, D., D'Amico, R., Deeks, J. J., Devereaux, P. J., Dickersin, K., Egger, M., Ernst, E., ... Tugwell, P. (2009). Preferred

- reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. In *PLoS Medicine* (Vol. 6, Issue 7). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>
- Navaneethalakrishnan, S., Goodlett, B. L., Lopez, A. H., Rutkowski, J. M., & Mitchell, B. M. (2020). Hypertension and reproductive dysfunction: a possible role of inflammation and inflammation-associated lymphangiogenesis in gonads. *Clinical Science (London, England: 1979)*, *134*(24), 3237–3257. <https://doi.org/10.1042/CS20201023>
- O'Bryan, M. K., Zini, A., Cheng, C. Y., & Schlegel, P. N. (1998). Human sperm endothelial nitric oxide synthase expression: Correlation with sperm motility. *Fertility and Sterility*, *70*(6). [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00382-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00382-3)
- Oduwole, O. O., Peltoketo, H., & Huhtaniemi, I. T. (2018). Role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00763>
- Ong, S. L., Zhang, Y., & Whitworth, J. A. (2009). Mechanisms of dexamethasone-induced hypertension. *Current Hypertension Reviews*, *5*(1), 61-74. <https://doi.org/10.2174/157340209787314315>
- Oparil, S., Acelajado, M. C., Bakris, G. L., Berlowitz, D. R., Cifková, R., Dominiczak, A. F., Grassi, G., Jordan, J., Poulter, N. R., Rodgers, A., & Whelton, P. K. (2018). Hypertension. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 4). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.14>
- Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., ... & Moher, D. (2021). The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *International journal of surgery*, *88*, 105906. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2021.105906>

- Payne, A. H., & Hales, D. B. (2004). Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. In *Endocrine Reviews* (Vol. 25, Issue 6). <https://doi.org/10.1210/er.2003-0030>
- Picut, C. A., Ziejewski, M. K., & Stanislaus, D. (2017). Comparative aspects of pre-and postnatal development of the male reproductive system. *Birth defects research, 110*(3), 190-227. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1133>
- Pinto, Y. M., Paul, M., & Ganten, D. (1998). Lessons from rat models of hypertension: From Goldblatt to genetic engineering. In *Cardiovascular Research* (Vol. 39, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(98\)00077-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00077-7)
- Poasakate, A., Manesai, P., Chiangsaen, P., Bunbupha, S., Settheetham-Ishida, W., & Pakdeechote, P. (2021). Cratoxylum formosum dyer extract alleviates testicular damage in hypertensive rats. *Andrologia, 53*(2, SI), e13917. <https://doi.org/10.1111/and.13917>
- Pollock, D. M., & Rekito, A. (1998). Hypertensive response to chronic NO synthase inhibition is different in Sprague-Dawley rats from two suppliers. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 275*(5), R1719-R1723. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.275.5.R1719>
- Reckelhoff, J. F., Romero, D. G., & Yanes Cardozo, L. L. (2019). Sex, Oxidative Stress, and Hypertension: Insights From Animal Models. In *Physiology (Bethesda, Md.)* (Vol. 34, Issue 3). <https://doi.org/10.1152/physiol.00035.2018>
- Redón, J., Oliva, M. R., Tormos, C., Giner, V., Chaves, J., Iradi, A., & Sáez, G. T. (2003). Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension, 41*(5). <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000068370.21009.38>
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., & Aggarwal, B.B. (2010). Estresse oxidativo, inflamação e câncer: como eles estão ligados? *Free Radical Biology and Medicine, 49*(11), 1603–1616. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006

- Rodriguez-Padilla, M., Bellido, C., Pinilla, L., & Aguilar, E. (1987). Secretion of LH in spontaneously hypertensive rats. *The Journal of Endocrinology*, *113*(2), 255–260. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1130255>
- Saravanakumar, M., & Raja, B. (2011). Veratric acid, a phenolic acid attenuates blood pressure and oxidative stress in l-NAME induced hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology*, *671*(1–3). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.08.052>
- Samir, H., ElSayed, M. I., Radwan, F., Hedia, M., Hendawy, H., Hendawy, A. O., ... & Watanabe, G. (2022). An updated insight on testicular hemodynamics: Environmental, physiological, and technical perspectives in farm and companion animals. *Veterinary Research Communications*, 1-23. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-10022-9>
- Sharma, R. K., & Agarwal, A. (2011). Spermatogenesis: an overview. *Sperm chromatin*, 19-44. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6857-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6857-9_2)
- Sharpe, R. M., Maddocks, S., Millar, M., Kerr, J. B., Saunders, P. T. K., & McKinnell, C. (1992). Testosterone and spermatogenesis identification of stage-specific, androgen-regulated proteins secreted by adult rat seminiferous tubules. *Journal of andrology*, *13*(2), 172-184. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1992.tb01653.x>
- Smith, L. B., & Walker, W. H. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 30). <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.012>
- Stanaway, J. D., Afshin, A., Gakidou, E., Lim, S. S., Abate, D., Abate, K. H., ... Abd-Allah, F. (2018). Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, *392*(10159), 1923–1994. doi:10.1016/s0140-6736(18)32225-6

- Taler, S. J., Textor, S. C., Canzanello, V. J., & Schwartz, L. (1999). Cyclosporin-induced hypertension: incidence, pathogenesis and management. *Drug Safety*, *20*, 437-449. <https://doi.org/10.2165/00002018-199920050-00004>
- Touyz, R. M. (2000). Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Current Hypertension Reports*, *2*(1). <https://doi.org/10.1007/s11906-000-0066-3>
- Touyz, R. M., Rios, F. J., Alves-Lopes, R., Neves, K. B., Camargo, L. L., & Montezano, A. C. (2020). Oxidative Stress: A Unifying Paradigm in Hypertension. In *Canadian Journal of Cardiology* (Vol. 36, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2020.02.081>
- Unger, T., Borghi, C., Charchar, F., Khan, N. A., Poulter, N. R., Prabhakaran, D., Ramirez, A., Schlaich, M., Stergiou, G. S., Tomaszewski, M., Wainford, R. D., Williams, B., & Schutte, A. E. (2020). 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines. *Hypertension*, *75*(6). <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15026>
- Valério, M. da P., Martini, S. C. ., Boschi, S. R. M. da S. ., Scardovelli, T. A. ., & Silva, A. P. da . (2022). Non-invasive versus invasive method to measure blood pressure in rodents: an integrative literature review. *Research, Society and Development*, *11*(8), e4911830789. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i8.30789>
- Verma, M. K., Jaiswal, A., Sharma, P., Kumar, P., & Singh, A. N. (2019). Oxidative stress and biomarker of TNF- $\alpha$ , MDA and FRAP in hypertension. *Journal of Medicine and Life*, *12*(3). <https://doi.org/10.25122/jml-2019-0031>
- Vernet, P., Aitken, R. J., & Drevet, J. R. (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *216*(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.10.069>
- Vlachopoulos, C., Ioakeimidis, N., Terentes-Printzios, D., Aznaouridis, K., Rokkas, K., Aggelis, A., Synodinos, A., Lazaros, G., & Stefanadis, C. (2013). Plasma total testosterone

- and incident cardiovascular events in hypertensive patients. *American Journal of Hypertension*, 26(3). <https://doi.org/10.1093/ajh/hps056>
- 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). <https://doi.org/10.3390/md13031375>
- Wenzel, P., Kossmann, S., Münzel, T., & Daiber, A. (2017). Redox regulation of cardiovascular inflammation – Immunomodulatory function of mitochondrial and Nox-derived reactive oxygen and nitrogen species. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 109). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.027>
- Whelton, P. K., Carey, R. M., Aronow, W. S., Casey, D. E., Collins, K. J., Dennison Himmelfarb, C., DePalma, S. M., Gidding, S., Jamerson, K. A., Jones, D. W., MacLaughlin, E. J., Muntner, P., Ovbigele, B., Smith, S. C., Spencer, C. C., Stafford, R. S., Taler, S. J., Thomas, R. J., Williams, K. A., ... Wright, J. T. (2018). 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary. *Journal of the American Society of Hypertension*, 12(8). <https://doi.org/10.1016/j.jash.2018.06.010>
- Williams, B., Mancia, G., Spiering, W., Rosei, E. A., Azizi, M., Burnier, M., Clement, D. L., Coca, A., de Simone, G., Dominiczak, A., Kahan, T., Mahfoud, F., Redon, J., Ruilope, L., Zanchetti, A., Kerins, M., Kjeldsen, S. E., Kreutz, R., Laurent, S., ... Zamorano, J. L. (2018). 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. In *European Heart Journal* (Vol. 39, Issue 33). <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy339>
- Xu, Q., Lin, H. Y., Yeh, S. der, Yu, I. C., Wang, R. S., Chen, Y. T., Zhang, C., Altuwaijri, S., Chen, L. M., Chuang, K. H., Chiang, H. S., Yeh, S., & Chang, C. (2007). Infertility with

defective spermatogenesis and steroidogenesis in male mice lacking androgen receptor in Leydig cells. *Endocrine*, 32(1). <https://doi.org/10.1007/s12020-007-9015-0>

Zhou, B., Bentham, J., di Cesare, M., Bixby, H., Danaei, G., Cowan, M. J., Paciorek, C. J., Singh, G., Hajifathalian, K., Bennett, J. E., Taddei, C., Bilano, V., Carrillo-Larco, R. M., Djalalinia, S., Khatibzadeh, S., Lugero, C., Peykari, N., Zhang, W. Z., Lu, Y., ... Eggertsen, R. (2017). Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19.1 million participants. *The Lancet*, 389(10064). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31919-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31919-5)

Zhou, B., Carrillo-Larco, R. M., Danaei, G., Riley, L. M., Paciorek, C. J., Stevens, G. A., ... & Breckenkamp, J. (2021). Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. *The Lancet*, 398(10304), 957-980. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01330-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01330-1)

Zini, A., O'Bryan, M. K., Magid, M. S., & Schlegel, P. N. (1996). Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biology of Reproduction*, 55(5). <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.5.935>

### 3.8 Anexos

**Tabela suplementar 1:** Estratégia PICOS (*Population, Intervention, Comparator, Outcomes, Study design*).

Parâmetro	Definição
População	Espécies de modelos murinos machos adultos (camundongos ou ratos).
Intervenção	Os estudos devem ter animais induzidos experimentalmente à hipertensão arterial ou animais espontaneamente hipertensos.
Comparador	O grupo controle é composto por animais normotensos que não receberam nenhum tratamento para induzir ou tratar a hipertensão.
Resultados	Análise dos testículos, em especial histologia, histomorfometria, hormônios e estresse oxidativo e outros parâmetros secundários que possam ajudar a explicar os efeitos da hipertensão arterial nos testículos e epidídimos.
Desenho de estudo	Apenas estudos experimentais com grupo controle e grupo hipertenso.

**Tabela suplementar 2:** Estratégia de pesquisa completa em "PubMed/Medline", Embase e Web of Science, incluindo termos de pesquisa e filtros.

Base de dados	Descritores/filtros	Itens encontrados	Tempo	Data
PUBMED	<b>#1. TESTIS</b> "testis"[MeSH Terms] OR "spermatogenesis"[MeSH Terms] OR "spermatogonia"[MeSH Terms] OR "spermatocytes"[MeSH Terms] OR "spermatids"[MeSH Terms] OR "testis"[Title/Abstract] OR "testicle"[Title/Abstract] OR "testicles"[Title/Abstract] OR "testes"[Title/Abstract] OR "spermatogenesis"[Title/Abstract] OR "spermatogonia"[Title/Abstract] OR "spermatogonias"[Title/Abstract] OR "spermatocyte"[Title/Abstract] OR "spermatocytes"[Title/Abstract] OR "spermatid"[Title/Abstract] OR "spermatids"[Title/Abstract] OR "leydig cells"[Title/Abstract] OR "seminiferous tubules"[Title/Abstract] OR "blood-testis barrier"[Title/Abstract] OR "seminiferous epithelium"[Title/Abstract] OR "sertoli cells"[Title/Abstract]	143,583	11h40	15/09/2022
	<b>#2. HYPERTENSION</b>	762,386	11h42	15/09/2022

	"hypertense"[Title/Abstract] OR "hypertension"[MeSH Terms] OR "hypertension"[Title/Abstract] OR "hypertension's"[Title/Abstract] OR "hypertensions"[Title/Abstract] OR "hypertensive"[Title/Abstract] OR "hypertensive's"[Title/Abstract] OR "hypertensives"[Title/Abstract] OR "blood pressure"[Title/Abstract] OR "diastolic pressure"[Title/Abstract] OR "systolic pressure"[Title/Abstract] OR "systemic hypertension"[Title/Abstract]			
	Busca combinada: #1 AND #2	670	11h42	15/09/2022
	Filtro aplicado: Outros animais	368	11h43	15/09/2022
	Filtro aplicado: Inglês	343	11h44	15/09/2022
	Filtro aplicado: Macho	<b>293</b>	11h44	15/09/2022
EMBASE	<b>#1. TESTIS</b> 'testis':ab,ti OR 'spermatogenesis':ab,ti OR 'spermatogonia':ab,ti OR 'spermatogonial':ab,ti OR 'spermatocytes':ab,ti OR 'spermatocytes':ab,ti OR 'spermatids':ab,ti OR 'spermatid':ab,ti OR 'testicle':ab,ti OR 'testicles':ab,ti OR 'testes':ab,ti OR 'leydig cells':ab,ti OR 'semiferous tubules':ab,ti OR 'blood-testis barrier':ab,ti OR 'seminiferous epithelium':ab,ti OR 'sertoli cells':ab,ti	133,697	11h47	15/09/2022
	<b>#2. HYPERTENSION</b> 'hypertense':ab,ti OR 'hypertension':ab,ti OR 'hypertensions':ab,ti OR 'hypertensive':ab,ti OR 'hypertensives':ab,ti OR 'blood pressure':ab,ti OR 'diastolic pressure':ab,ti OR 'systolic pressure':ab,ti OR 'systemic hypertension':ab,ti	1,063,110	11h47	15/09/2022
	Busca combinada: #1 AND #2	859	11h48	15/09/2022
	Filtro aplicado: Animals	376	11h48	15/09/2022
	Filtro aplicado: Apenas inglês	360	11h48	15/09/2022
	Filtro aplicado: Macho	237	11h49	15/09/2022
	Filtro aplicado (Fonte): Embase	<b>217</b>	11h49	15/09/2022
	<b>#1. TESTIS</b>	121,026	11h53	15/09/2022

WEB OF SCIENCE	TS=(testis OR testicle OR testicles OR testes OR spermatogenesis OR spermatogonia OR spermatogonial OR spermatocyte OR spermatocytes OR spermatid OR spermatids OR "leydig cells" OR "semineferous tubules" OR "blood-testis barrier" OR "seminiferous epithelium" OR "sertoli cells")			
	<b>#2. HYPERTENSION</b> TS=(hypertense OR hypertension OR hypertension OR hypertension's OR hypertensions OR hypertensive OR hypertensive's OR hypertensives OR "blood pressure" OR "diastolic pressure" OR "systolic pressure" OR "systemic hypertension")	794,168	11h54	15/09/2022
	<b>#3. ANIMAL</b> TS=(animal OR mice OR mouse OR rat OR rats OR "murine model" OR "animal model" OR "in vivo model" OR "in vivo")	4,981,240	11h55	15/09/2022
	Busca combinada: #1 AND #2 AND #3	377	11h55	15/09/2022
	Filtro aplicado: Apenas inglês	<b>373</b>	11h56	15/09/2022

**Tabela suplementar 3:** Informações dos estudos incluídos na revisão sistemática. Informações de autores, ano de publicação, país, título do trabalho, periódico e DOI.

Autores	Ano	País	Título	Periódico	DOI
Adedara et al.	2018	Nigéria	Taurine enhances spermatogenic function and antioxidant defense mechanisms in testes and epididymis of L-NAME-induced hypertensive rats	Biomedicine & Pharmacotherapy	10.1016/j.biopha.2017.10.095
Aguilar et al.	1992	Espanha	Changes in follicle-stimulating hormone secretion in spontaneously hypertensive rats	Neuroendocrinology	10.1159/000126212
Akinyemi et al.	2015	Brasil	Dietary supplementation of ginger and turmeric improves reproductive function in hypertensive male rats	Toxicology Reports	10.1016/j.toxrep.2015.10.001
Akomolafe et al.	2022	Nigéria	Diet Supplemented with <i>Chrysophyllum albidum</i> G. Don (Sapotaceae) Fruit Pulp Improves Reproductive Function in Hypertensive Male Rats	Reproductive Sciences	10.1007/s43032-021-00746-5
Amador et al.	1983	Estados Unidos	Pituitary and Testicular Function in Spontaneously Hypertensive Rats	Journal of andrology	10.1002/j.1939-4640.1983.tb00722.x
Atanassova et al.	2009	Bulgária	Expression of testicular angiotensin-converting enzyme in adult spontaneously hypertensive rats	Folia Histochemica et Cytobiologica	10.2478/v10042-009-0002-6
Aykan et al.	2020	Turquia	The effects of sacubitril/valsartan and ramipril on the male fertility in hypertensive rats	Northern Clinics Of Istanbul	10.14744/nci.2020.30906
Aziz et al.	2021	Indonésia	Effect of <i>Physalis angulata</i> L. Leaf Water Extract on Malondialdehyde (MDA) Testis, Calcium Intracellular Sperm and Total Motile Sperm of Male Wistar Rats ( <i>Rattus Novergicus</i> ) Model of Hypertension	Medico-Legal Update	10.37506/mlu.v21i2.2648
Bechara et al.	2015	Brasil	Testicular Morphology and Spermatozoid Parameters In Spontaneously Hypertensive Rats Treated Or Not With	The Journal of Urology	10.1016/j.juro.2015.06.073

			Enalapril		
Belanger et al.	2003	Canadá	Effect of hypertension on reproductive organ weights in various strains of rats	Contemporary topics in laboratory animal science	-
Chiangsaen et al.	2020	Tailândia	Tangeretin ameliorates erectile and testicular dysfunction in a rat model of hypertension	Reproductive Toxicology	10.1016/j.reprotox.2020.05.012
Clark et al.	1991	Estados Unidos	Sexual function and neuropeptide Y levels in selected brain regions in male spontaneously hypertensive rats	American Journal of Physiology	10.1152/ajpregu.1991.261.5.R1234
Colli et al.	2019	Brasil	Systemic arterial hypertension leads to decreased semen quality and alterations in the testicular microcirculation in rats	Scientific Reports	10.1038/s41598-019-47157-w
Gulhan	2018	Turquia	Therapeutic potentials of propolis and pollen on biochemical changes in reproductive function of L- NAME induced hypertensive male rats	Clinical and Experimental Hypertension	10.1080/10641963.2018.1506470
Iloh et al.	2022	Nigéria	Phytochemical, Mineral Analysis and Antioxidative Effect of Methanolic Extract of <i>Ocimum gratissimum</i> in Hypertensive Male Wistar Rats	IDOSR Journal of Applied Science	-
Kuo et al.	2022	Taiwan	Low-dose rapamycin prevents Ang-II-induced toxicity in Leydig cells and testicular dysfunction in hypertensive SHR model	Journal of Biochemical and Molecular Toxicology	10.1002/jbt.23128
Pinilla et al.	1992	Espanha	Mechanism of Reproductive Deficiency in Spontaneously Hypertensive Rats	Physiology & Behavior	10.1016/0031-9384(92)90209-K
Poasakate et al.	2020	Tailândia	<i>Cratoxylum formosum</i> dyer extract alleviates testicular damage in hypertensive rats	Andrologia	10.1111/and.13917
Rodriguez-Padilla et al.	1987	Espanha	Secretion of LH in spontaneously hypertensive rats	Journal of Endocrinology	10.1677/joe.0.1130255

Salami et al.	2017	Nigéria	Oral administration of <i>Tridax procumbens</i> aqueous leaf extract attenuates reproductive function impairments in L-NAME induced hypertensive male rats	Middle East Fertility Society Journal	10.1016/j.mefs.2017.03.001
Talas	2013	Turquia	Propolis reduces oxidative stress in L-NAME-induced hypertension rats	Cell Biochemistry and Function	10.1002/cbf.2986

---

## 4. CAPÍTULO 2: Efeitos do treinamento físico combinado sobre morfologia e funcionalidade testicular e epididimária em animais com hipertensão arterial pulmonar

### 4.1 Resumo

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do treinamento físico combinado (TFC) sobre testículos e epidídimo de ratos Wistar com hipertensão arterial pulmonar (HAP). Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais, a saber: controle sedentário (n=8), hipertenso sedentário (n=8) e hipertenso exercício (n=8) (CEUA nº 02/2021). A HAP foi induzida nos animais dos grupos hipertenso sedentário e hipertenso exercício usando uma aplicação de monocrotalina (MCT) (60 mg kg<sup>-1</sup> de massa corporal; via intraperitoneal) dissolvida em solução salina, enquanto animais controle sedentário receberam uma única injeção de solução salina por via intraperitoneal. Apenas animais do grupo hipertenso exercício passaram por um processo de adaptação ao TFC, utilizando atividade aeróbica em esteira rolante associada ao treinamento resistido, com uso de cargas em escada adaptada para ratos, cinco dias da semana por três semanas. A eutanásia aconteceu no 23º dia após a injeção de MCT. Testículos e epidídimos foram dissecados e analisados quanto a características histológicas e histomorfométricas, atividade de enzimas antioxidantes e metabólitos oriundos do estresse oxidativo e avaliações espermáticas. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, seguido de teste t de *Student*, sendo que as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Animais sedentários com HAP, quando comparados com os animais sedentários, tiveram redução em parâmetros biométricos, como peso corporal e peso do epidídimo, diminuição na concentração de testosterona sérica, na contagem de túbulos seminíferos normais e apresentaram alterações morfométricas testiculares. As alterações morfométricas culminaram em desorganização na arquitetura dos túbulos seminíferos, que comprometeu a produção espermática. O TFC foi capaz de aumentar o percentual de túbulos seminíferos normais, alterar parâmetros morfométricos testiculares e aumentar a contagem espermática nos animais com HAP. Portanto, a HAP apresentou efeitos negativos na organização e função testicular e o TFC pode melhorar alguns parâmetros afetados pela doença.

**Palavras-chave:** exercício físico; hipertensão; testículos; epidídimos

## 4.2 Introdução

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença multifatorial que tem prevalência de 11 a 26 casos por milhão de adultos (Thenappan et al., 2018), afetando cerca de 100 milhões de pessoas em todo o mundo (Simonneau et al., 2009; Schermuly et al., 2011). A HAP provoca remodelação da vasculatura pulmonar pela elevação da pressão arterial pulmonar, o que pode promover insuficiência ventricular direita e até levar a morte de pacientes (Hassoun, 2021). Por isso, diante da gravidade da doença, buscam-se alternativas terapêuticas que minimizem os sintomas e melhorem a qualidade de vida dos indivíduos afetados, uma vez que ainda não há cura para a HAP (Nogueira-Ferreira et al., 2018). Dentre estas alternativas, encontram-se práticas farmacológicas e físicas que, quando combinadas, proporcionam melhorias no quadro clínico da doença (Coons et al., 2019).

Os efeitos benéficos do treinamento físico nos sistemas cardiopulmonar e muscular têm sido evidenciados tanto em modelos animais quanto em estudos humanos (Benjamin et al., 2018; Coste et al., 2017; Mereles et al., 2006; Meyer et al., 2005; Schmidt et al., 2020). Melhorias clinicamente relevantes desta prática compreendem tolerância ao exercício, incrementos na capacidade aeróbica, força muscular e qualidade de vida dos pacientes (Arena et al., 2015). Vale destacar que diferentes programas de exercícios podem promover impactos distintos no manejo da HAP. Além disso, atividades físicas têm se mostrado seguras quando bem estruturadas e incluídas em estratégias terapêuticas multimodais (Nogueira-Ferreira et al., 2018).

Para a realização de experimentos em modelos animais experimentais, a monocrotalina (MCT) vem sendo usada como importante indutor da HAP, especialmente em modelos murinos (Schermuly et al., 2011). Derivada da planta *Crotalaria spectabilis*, é um alcaloide pirrolizidínico tóxico que resulta no desenvolvimento progressivo da doença (Stenmark et al., 2009). Porém, apesar dos mecanismos de toxicidade da MCT ainda não serem bem elucidados,

sabe-se que a mesma danifica células endoteliais pulmonares e, por isso tem papel importante no contexto de inflamação e lesão pulmonar (Gomez-Arroyo et al., 2012).

Já são conhecidos alguns efeitos da hipertensão arterial sistêmica no sistema reprodutor masculino (Colli et al., 2019; Guo et al., 2017). No entanto, informações sobre a HAP e possíveis distúrbios reprodutivos provenientes deste quadro clínico são escassos, já que não há trabalhos suficientes que correlacionem efeitos da doença em epidídimos e testículos, por exemplo, que são órgãos muito vascularizados e susceptíveis a danos (Heinrich & Defalco, 2020). Ainda não há trabalhos publicados sobre as implicações da HAP nos epidídimos, que são órgãos essenciais para maturação e capacitação espermática (Sharma & Agarwal, 2011). Mas, em um estudo pioneiro na avaliação da HAP nos testículos de ratos, foi constatado que a doença reduz a produção de testosterona, a atividade de enzimas antioxidantes e a concentração de óxido nítrico. A HAP, induzida por duas doses de monocrotalina ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ ), também foi capaz de promover desorganização da arquitetura tecidual testicular, culminando em diminuição da produção de espermatozoides (Guimarães-Ervilha et al., 2023).

O conhecimento de danos potencialmente causados pela HAP sobre testículos e epidídimos é crucial para entender o efeito da doença sobre a reprodução masculina, uma vez que estes órgãos estão diretamente relacionados à produção e qualidade dos espermatozoides, respectivamente. Desta forma, o presente trabalho buscou avaliar os efeitos da prática de treinamento físico combinado (TFC) sobre a morfologia e funcionalidade testicular e epididimária em animais com HAP. Para isso, foram avaliados parâmetros hormonais (testosterona), biométricos, espermáticos (motilidade e morfologia), histomorfométricos, funcionais (produção espermática diária, número de espermatozoides e trânsito epididimário) e de estresse oxidativo usando, respectivamente, sangue, espermatozoides epididimários e tecidos testiculares e epididimários. Espera-se que os resultados obtidos neste trabalho venham contribuir com as práticas clínicas no tratamento da HAP e a melhora na qualidade de vida dos

pacientes, deixando clara a relação existente entre prática de exercícios físicos e doenças cardiovasculares com a fertilidade masculina.

### 4.3 Materiais e métodos

#### 4.3.1 Animais e desenho experimental

Este estudo faz parte de um trabalho mais amplo que envolve a análise dos efeitos do TFC sobre a morfologia e a função cardiopulmonar em ratos com HAP, induzidos por MCT, desenvolvido no Departamento de Educação Física da UFV (Leite, 2022).

Ratos Wistar (idade: ~ seis semanas; massa corporal: ~200g) provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV, foram utilizados no presente estudo. O tamanho amostral foi definido conforme sugerido por (Charan & Biswas, 2013), usando-se a seguinte fórmula:

$$Tac = \frac{Ta}{\left(1 - \left[\frac{\% \text{ atrito}}{100}\right]\right)}$$

Sendo:

Tac: Tamanho da amostra corrigido

Ta: Tamanho da amostra

Assim,

$$\begin{aligned} Tac &= \\ &= \frac{6 \text{ (tamanho da amostra representativa mínima estimada em estudos com animais)}}{\left(1 - \left[\frac{20 \text{ (porcentagem de atrito esperado)}}{100}\right]\right)} \end{aligned}$$

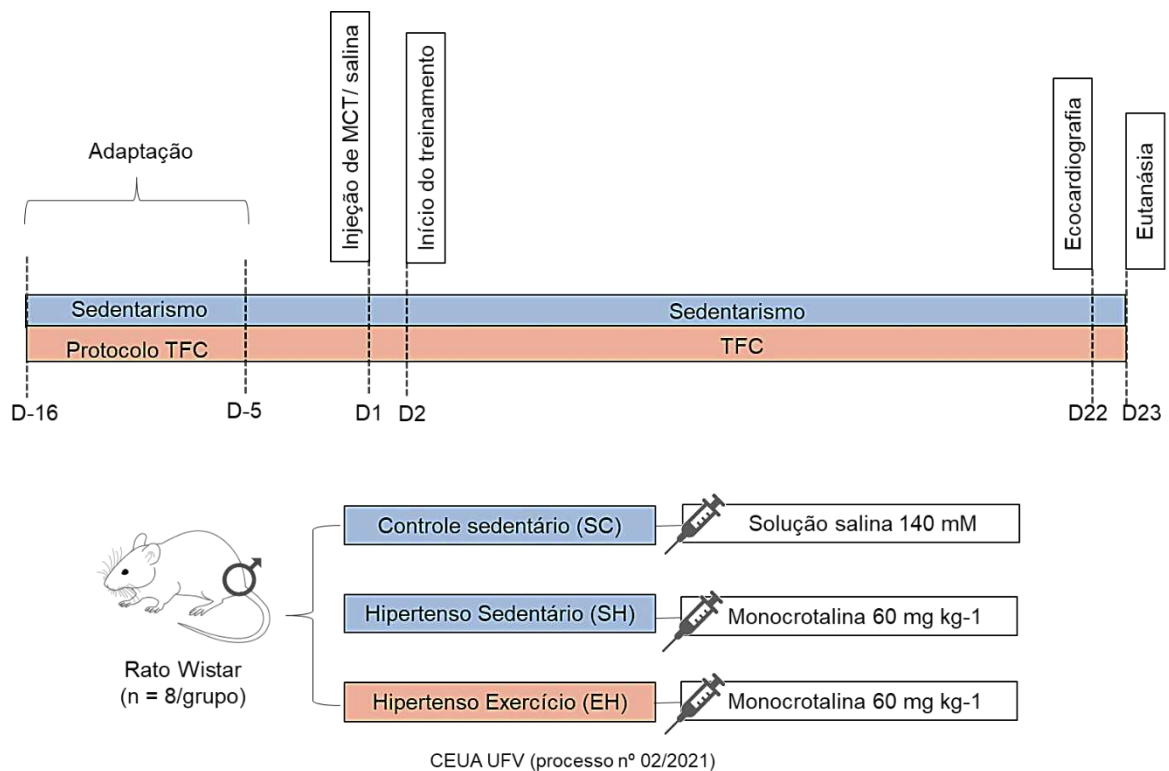
Logo,

$$Tac = \frac{6}{0,8} = 7,5 \text{ (resultado encontrado)} = 8 \text{ animais por grupo (resultado arredado)}$$

Os animais foram alojados em caixas de polietileno, com quatro ratos por caixa, com acesso a ração comercial e água filtrada *ad libitum*. A temperatura ambiente do biotério foi mantida em  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e ciclo de luminosidade controlada de 12/12h claro/escuro. Todos os procedimentos experimentais foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA UFV (processo nº 02/2021).

O experimento teve duração de três semanas, contadas a partir da semana que os animais iniciaram o treinamento físico combinado (Fig. 1). Os ratos foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais, a saber:

- Grupo controle sedentário (n=8), contendo ratos que receberam solução salina e não foram submetidos ao treinamento físico combinado;
- Grupo hipertenso sedentário (HAP sedentário; n=8), que contemplou ratos que receberam injeção de MCT e não foram submetidos ao treinamento físico combinado;
- Grupo hipertenso exercício (HAP + TFC; n=8), composto por ratos que receberam injeção de MCT e foram submetidos ao treinamento físico combinado.



**Figura 1:** Esquema do delineamento experimental utilizando o treinamento físico combinado e indução de hipertensão arterial pulmonar. Durante o período de adaptação (12 dias), animais do grupo HAP exercício (n=8/grupo) foram submetidos ao protocolo de TFC, enquanto os demais ratos controle sedentário e HAP sedentário (n=8/grupo) ficavam em suas respectivas caixas. No dia experimental D1, os animais HAP receberam a dose de monocrotalina ( $60 \text{ mg kg}^{-1}$ ), enquanto os animais controle receberam solução salina. 24h após a aplicação da injeção, ratos do grupo HAP exercício começaram o TFC. No D22 houve a realização da ecocardiografia e no D23, os animais foram eutanasiados para coleta dos testículos e epidídimos.

#### 4.3.2 Indução da HAP

A HAP foi induzida com uma única injeção intraperitoneal de MCT (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) na concentração de  $60 \text{ mg kg}^{-1}$  de massa corporal, dissolvida em 0,5mL de solução salina (NaCl 140 mM; pH 7,4) (Natali et al., 2015). Animais do grupo controle sedentário receberam uma injeção de solução salina de igual volume. A progressão da HAP foi avaliada por ecocardiografia.

#### 4.3.3 Ecocardiografia

O exame ecocardiográfico foi realizado no 22º dia após a injeção de MCT. Para tal, os animais foram imobilizados por meio de anestesia com Isoflurano (Isoflurano, BioChimico, ItatiaiaRJ, Brasil). O agente anestésico foi administrado por meio de um vaporizador e a indução foi feita pela administração de isoflurano 3% e oxigênio 100% em fluxo constante de um litro por minuto, por um período aproximado de 3 min. Foram adquiridas imagens transtorácicas bidimensionais (2D) (frame rate de 60 a 120 fps – *frame per second*), modo-M e Doppler espectral usando um sistema de ultrassom (MyLabTM30 – Esaote, Genova, Itália) e um transdutor de 10 MHz de frequência nominal. Durante toda a fase de coleta foi mantida a respiração espontânea dos animais. Após armazenamento dos dados, foi realizada a análise das imagens de forma aleatória e com o observador cego quanto aos grupos experimentais. As imagens em modo-M e espectral Doppler foram gravadas a uma velocidade de varredura de aproximadamente 200mm/s e ajustadas de acordo com a frequência cardíaca. Os valores de tempo de aceleração (TA) e de ejeção (TE) do VD foram obtidos por meio do Doppler pulsátil.

Foi avaliada a morfologia do ventrículo direito, tanto pelo espessamento da parede livre do ventrículo direito (EPLVD) quanto pelo diâmetro diastólico final do ventrículo direito (DDFVD). O EPLVD foi avaliado a partir da imagem obtida do eixo curto paraesternal logo abaixo da valva tricúspide ou do eixo longo paraesternal em modo-M (dependendo da qualidade da imagem). O DDFVD foi mensurado a partir da distância máxima da parede livre do ventrículo direito até o septo na vista apical das quatro câmaras. A função do ventrículo direito por meio da excursão sistólica no plano anular da válvula tricúspide (TAPSE - *Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion*), na porção lateral do plano anular da tricúspide. O ânulo lateral da valva tricúspide, a distância diastólica final e a distância sistólica final foram identificadas e mensuradas até um determinado ponto da tela o qual era sempre o mesmo tanto para a sístole quanto para a diástole. O fluxo da artéria pulmonar foi obtido por meio do Doppler pulsátil. As seguintes variáveis relacionadas ao VD foram avaliadas: função sistólica, tempo de

aceleração do fluxo na artéria pulmonar (TA) e seu tempo de ejeção (TE) e, posteriormente, a razão TA/TE foi calculada. As imagens foram coletadas de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia e armazenadas para posterior análise (Sahn et al., 1978). Todo o processo da ecocardiografia foi realizado por uma médica veterinária com experiência prévia nesse tipo de procedimento.

#### 4.3.4 Protocolo de treinamento físico combinado

O treinamento físico combinado de intensidade moderada foi realizado em esteira rolante (treinamento aeróbico) e em escada adaptada para ratos (treinamento resistido) cinco dias/semana, por aproximadamente três semanas. Cada tipo de exercício foi realizado em dias alternados. A utilização do treinamento físico combinado em dias alternados justifica-se pela tentativa de equalizar o volume de treinamento (Sale et al., 1990).

##### 4.3.4.1 Treinamento físico aeróbico

Os animais do grupo hipertenso exercício foram submetidos a um protocolo de treinamento de corrida de intensidade moderada em esteira (Zimmer et al., 2017), que foi iniciado 24h após a aplicação da MCT. Resumidamente, os ratos foram familiarizados com a esteira rolante elétrica (AVS Projetos®, São Paulo, Brasil) por duas semanas. Na semana 1, foram submetidos a um curto período de exercício leve (5 min, sem inclinação, 5m/min) por três dias (alternados com o TR). Na semana 2, a 10 min/dia, sem inclinação, 5m/min por três dias (alternados com o TR). O teste de tolerância ao esforço físico foi realizado 48 h após o período de adaptação. A tolerância ao esforço físico foi medida pela distância total percorrida, avaliada por um protocolo de exercício progressivo em esteira, como previamente descrito por (Trueblood et al., 2005). A intensidade do exercício inicial foi de 5m/min e incrementos de 3m/min a cada 3min, sem inclinação, até a fadiga. O momento da fadiga foi definido e o teste

foi interrompido quando os animais não mantiveram a corrida de acordo com a velocidade da esteira (Trueblood et al., 2005). Ao término, foi registrado o tempo, velocidade e intensidade de corrida de cada rato. O teste de tolerância ao esforço físico foi realizado em três momentos: cinco dias após a familiarização do animal com o equipamento, no 12º dia de treinamento e 24h após a última sessão de treinamento. O treinamento de corrida em esteira rolante, foi realizado 2/3 dias por semana alternados com o treinamento resistido, 60 min/dia. Cada sessão consistiu em um período de aquecimento (5min; velocidade: 20 % da velocidade máxima de corrida [VMC]), treino (50 min; velocidade: 60 % da VMC) e desaquecimento (5 min; velocidade: 20 % da VMC). Na primeira semana, a velocidade inicial foi de 5m/min e incrementos de 3m/min a cada 3min, até atingir 60% da VMC. Ao final da segunda semana de treinamento as intensidades de corrida foram reajustadas, de acordo com a VMC obtida no teste de tolerância ao exercício.

#### 4.3.4.2 Treinamento físico resistido

Os animais do grupo hipertenso exercício também foram submetidos a um protocolo de treinamento resistido adaptado de Hornberger e Farrar (2004). Inicialmente os ratos foram familiarizados por duas semanas ao treinamento físico resistido que consiste em subida de escadas (Altura: 1,1m; largura: 0,18m; espaçamento entre os degraus da grade: 2cm; Inclinação: 80º) com uma carga de aparatos fixados em suas caudas. O aparato foi fixado à cauda dos animais envolvendo a parcela proximal da mesma com uma tira autoadesiva (1,5cm, 3M Tartan). Para iniciar o movimento, os animais foram incentivados a escalar aplicando-se em sua cauda um estímulo (pinçar dos dedos). No topo da escada, encontraram uma gaiola (20 x 20 x 20cm) onde descansaram por 120seg. Este procedimento foi repetido três vezes por semana durante duas semanas para que os ratos voluntariamente subissem a escada três vezes consecutivas, sem o incentivo do estímulo na cauda. Para determinação da carga máxima os

ratos realizaram um teste de carga máxima 24h após o teste de tolerância ao esforço físico. Na escalada inicial, foi aplicado 75% do peso do corpo do animal. Após completar o carregamento desta carga com sucesso, um peso adicional de 30g foi adicionado ao aparato. Este procedimento foi sucessivamente repetido até que a carga alcançasse um peso que não permitiu mais que o rato escalasse, ponto no qual foi considerada a carga máxima dos ratos para aquela sessão.

O teste de carga máxima foi realizado em três momentos: quatro dias após a adaptação ao modelo de exercício, no 14º e 21º dia após a aplicação da MCT. A carga máxima carregada foi utilizada como índice de tolerância ao esforço resistido. O treinamento resistido foi iniciado 48h após a aplicação de MCT, usando-se uma escada vertical adaptada para ratos. O treinamento resistido foi realizado 2/3 dias por semana, com intensidade moderada (60% da carga máxima), alternado com o treinamento aeróbico, durante aproximadamente três semanas. Os ratos realizaram 15 escaladas por sessão com intervalo de 1min entre escaladas (Sanches et al., 2014).

#### 4.3.5 Eutanásia e coleta de material biológico

A eutanásia dos animais foi realizada no 23º dia após injeção de MCT ou quando os animais dos grupos hipertenso sedentário e hipertenso exercício manifestaram sinais clínicos de falha do VD (ex. perda de 10 g do peso corporal de um dia para outro e/ou dispneia; cianose; letargia). Os ratos foram pesados no primeiro dia do experimento e no último dia, quando ocorreu a eutanásia, e foi feito o cálculo de ganho de peso corporal dos animais. Todos os animais foram eutanasiados por decapitação usando-se uma guilhotina própria para o uso em roedores (Insight EB 271) e sem a utilização de anestesia. Este método foi utilizado, pois não está relacionado com a percepção da dor e não contamina o material biológico a ser processado (Concea, 2013).

Os testículos e epidídimos foram removidos, dissecados e separados para análises histomorfométricas, enzimáticas e funcionais. Órgãos do lado esquerdo foram separados e fixados em solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído a 4% e paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,2M/pH 7,3) por 24 h para análises biométricas e microscópicas, enquanto órgãos do lado direito foram congelados e armazenados a -80°C para análises espermáticas e funcionais do epidídimo e ensaios enzimáticos.

#### 4.3.6 Determinação da concentração sérica de testosterona

O sangue coletado no momento da eutanásia foi centrifugado por 15 minutos a 4.119 x g, sendo o soro armazenado a -20°C para quantificação de testosterona. O ensaio foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde da UFV, utilizando a metodologia de quimioluminescência. Os resultados foram expressos em ng/dL.

#### 4.3.7 Biometria dos órgãos

Testículos e epidídimos fixados foram dissecados e pesados em balança analítica para obtenção dos pesos absolutos e relativo. No caso do peso relativo do epidídimo, o peso absoluto foi multiplicado por 100, sendo o resultado dividido pelo peso final do animal (Amann, 1970). Para determinar o peso do parênquima testicular a túnica albugínea foi retirada e pesada, descontando-se o seu peso daquele obtido para o peso total da gônada. A partir dos pesos corporal (PC) e dos dois testículos (PG) foi obtido o índice gonadossomático (IGS), pela fórmula:  $IGS (\%) = PG / PC * 100$  (Amann, 1970).

#### 4.3.8 Processamento histológico dos órgãos

Fragmentos fixados de testículos e das quatro regiões epididimárias (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda) foram desidratados em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e

absoluto) e incluídos em 2-hidroxietil metacrilato, historesina (Historesin<sup>®</sup>, Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha). Cortes semi-seriados de 3 $\mu$ m de espessura foram obtidos utilizando-se navalhas de vidro acopladas em micrótomo rotativo (RM 2255; Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha). Para evitar análises repetidas da mesma área histológica, foi respeitado o intervalo de 30 $\mu$ m (10 cortes) entre cortes histológicos avaliados para testículo e 39 $\mu$ m (13 cortes) para cortes de epidídimo. Lâminas contendo os cortes histológicos foram coradas com azul de toluidina + borato de sódio (1%), montadas com Entellan<sup>®</sup> (Merck) e analisadas em microscópio óptico (Olympus CX40, Tóquio, Japão).

#### 4.3.9 Contagem de túbulos seminíferos normais e patológicos

A análise histológica do testículo foi realizada em microscópio óptico (Olympus CX40, Tóquio, Japão), sendo analisados 200 túbulos seminíferos por animal de cada grupo, considerando lúmen e epitélio seminífero contendo células germinativas e de Sertoli. Os túbulos seminíferos foram classificados em dois tipos, de acordo com o aparecimento de alterações histológicas: i) túbulos seminíferos com morfologia normal, epitélio seminífero íntegro e formado por células dispostas em camadas, sem presença de vacúolos, descamação ou células germinativas no lúmen; ii) Túbulos seminíferos anormais, com presença de células germinativas e restos celulares no lúmen, poucas camadas de células germinativas, vacuolização e degeneração do epitélio seminífero. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem (adaptado de Leite et al., 2017; Dias et al., 2019).

#### 4.3.10 Análise histológica epididimária

A análise histológica do epidídimo foi realizada em microscópio óptico nos aumentos de 100, 200 e 400x. Esta etapa envolveu a observação de características teciduais do órgão, como organização e integridade de epitélio e lúmen do ducto epididimário, bem como de tecido

conjuntivo e seus componentes no interstício. A ocorrência de alterações, como células germinativas no lúmen, alteração cribriforme no epitélio, infiltrados inflamatórios no interstício, vacuolização epitelial, quantidade e aspecto dos espermatozoides no lúmen foram registradas (Kempinas & Klinefelter, 2014).

#### 4.3.11 Histomorfometria e estereologia testicular

Para as análises morfométricas testiculares, 10 imagens digitais de campos histológicos aleatórios foram capturadas usando fotomicroscópio de campo claro (Olympus BX -53, Tóquio, Japão) equipado com câmera digital (Olympus AX 70 TRF, Tóquio, Japão), nas objetivas de 10x e 40x. As imagens foram analisadas pelos softwares Image J<sup>®</sup> (National Institute of Health, USA) e Image Pro Plus 4.5<sup>®</sup> (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

A proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular (túbulos seminíferos e intertúbulo) foi realizada utilizando uma grátula com 266 pontos incidentes sobre cada uma das dez imagens digitalizadas, totalizando 2.660 pontos para cada animal. Foram contabilizadas interseções coincidentes sobre componentes do compartimento tubular, como epitélio, lúmen com espermatozoide, lúmen sem espermatozoides e túnica própria, e do compartimento intertubular, como tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, células do tecido conjuntivo. A proporção volumétrica desses componentes (PV<sub>x</sub>) foi determinada pela fórmula:  $PV_x (\%) = (NT / NTT) * 100$ , onde x = componente em questão, NT = número de pontos sobre o componente específico e NTT é o número de pontos totais (2.660 por animal). O volume de cada componente testicular, expresso em mL, foi estimado multiplicando a proporção volumétrica de cada componente pelo volume do parênquima de um testículo, dividido por 100. Como a densidade do testículo de mamíferos é em torno de  $1 \text{ g mL}^{-1}$ , então a massa do testículo, em gramas, foi considerada igual ao seu volume em mL (Tae et al., 2005).

O diâmetro do túbulo seminífero ( $\mu\text{m}$ ) foi obtido pela média da mensuração de 30 secções transversais de túbulos seminíferos por animal, que tiverem o contorno mais circular possível, independente da fase do ciclo do epitélio seminífero. O diâmetro foi medido por uma linha reta entre os dois polos do túbulo usando o Programa *Image ProPlus*, partindo da túnica própria de uma extremidade, passando pelo centro do túbulo e terminando na túnica própria na outra extremidade. Nas mesmas secções utilizadas para medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio seminífero, a partir de uma linha reta traçada no centro da secção, da base do epitélio em contato com a túnica própria até o lúmen do túbulo, nos dois polos do túbulo seminífero. Portanto, o valor final encontrado para a altura do epitélio foi correspondente à média de duas medidas diametralmente opostas. De posse do diâmetro tubular e da altura do epitélio, podemos calcular o diâmetro luminal ( $\mu\text{m}$ ), subtraindo o diâmetro do túbulo seminífero da altura final do seu epitélio (Dias et al., 2019).

A proporção volumétrica dos componentes do intertúbulo foi realizada no aumento de 400x, contando-se 1.000 pontos por animal sobre tecido conjuntivo, espaço linfático, vasos sanguíneos, macrófagos e célula de Leydig, incluído pontos coincidentes em seu núcleo e citoplasma. A proporção volumétrica dos componentes intertubulares foi obtida utilizando a fórmula:  $\text{compartimento intertubular (\%)} = (\text{número de pontos no componente intertubular} / 1.000 \text{ pontos totais}) \times 100$ . O volume (mL) de cada componente intertubular por testículo foi calculado pela fórmula:  $\text{proporção do elemento no testículo (\%)} / (100 \times \text{massa parenquimatosa de um testículo})$ . O volume (mL) dos elementos intertubulares foi calculado a partir da porcentagem do elemento no testículo/ peso do parênquima de 2 testículos X 100 (Dias et al., 2020).

Análises estereológicas das células de Leydig foram realizadas no aumento de 400x. O diâmetro do núcleo de Leydig ( $\mu\text{m}$ ) foi determinado pela média de 30 núcleos por animal, sendo cinco animais por grupo. O volume ocupado pelo núcleo foi calculado usando a média do

diâmetro nuclear e a fórmula:  $4/3\pi R^3$ , em que  $R = \text{diâmetro nuclear}/2$ . O volume do citoplasma foi estimado pela fórmula: porcentagem de citoplasma X volume nuclear obtido/porcentagem nuclear. Assim, o volume total da célula de Leydig foi calculado pela soma dos volumes nuclear e citoplasmático (Dias et al., 2020) e os valores foram expressos em  $\mu\text{m}^3$ . O número de células de Leydig por testículo (NLT) foi calculado de acordo com a equação:  $\text{NLT} = \text{volume que as células de Leydig ocupam por testículo} (\mu\text{m}^3) / \text{volume de uma célula de Leydig} (\mu\text{m}^3)$ , em que o volume que as células de Leydig ocupam por testículo = proporção da célula de Leydig no testículo X peso do parênquima de um testículo / 100 (Dias et al., 2019).

#### 4.3.12 Análise de enzimas antioxidantes e metabólitos oxidativos

Amostras de testículo, cabeça e cauda do epidídimo congelados (100mg; n = 5/grupo), foram separadas, homogeneizadas em tampão fosfato (1mL; pH 7,4) e centrifugadas durante 10min a 10.000 xg (12.000rpm), sob refrigeração de 4°C. O sobrenadante foi separado para análises da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-s-transferase (GST), metabólitos da peroxidação lipídica, como malondialdeído (MDA), estresse nitrosativo, como óxido nítrico e capacidade antioxidante total (FRAP). Tais análises foram realizadas em leitor de microplaca ELISA (Multiskan SkyHigh, Thermo Scientific). A quantificação de proteínas totais foi realizada por meio do método de Bradford (Bradford, 1976).

A atividade da SOD foi estimada pelo método de Dieterich et al. (2000) modificado, baseada na capacidade da enzima em catalisar a reação do superóxido  $\text{O}_2^-$  e do peróxido de hidrogênio e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol. A leitura da placa foi realizada em leitor de Elisa em 320nm. 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 CAT foi avaliada medindo-se a taxa

de decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de acordo com o descrito por Aebi (1984). Um coeficiente de extinção de  $\epsilon_{240} = 0,036 \text{ mmol/L} \times \text{cm}$  foi usado para os cálculos. Uma unidade de atividade CAT foi definida como a quantidade de enzima que decompõe um  $\text{mmol H}_2\text{O}_2$  por 1min. A atividade da catalase foi calculada como U por miligrama de proteína. Uma unidade de atividade da CAT foi definida como a quantidade da enzima que se decompõe por 1min. A atividade de CAT foi calculada como U por miligrama de proteína. Já a atividade da GST foi estimada em 340nm, em dois intervalos (30s e 90s), conforme descrito por Habig et al. (1974) e calculada a partir da taxa de formação do conjugado 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com glutathiona. O coeficiente de extinção molar usado para CDNB foi  $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ . Uma unidade de atividade de GST é definida como a quantidade da enzima que catalisou a formação de um  $\mu\text{mol}$  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 MDA foi avaliada pela metodologia descrita por Buege e Aust (1978). O homogenato foi misturado com solução TBARS (ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico 0,375% e HCl 0,25 N) e mantido 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 foi adicionado  $600\mu\text{L}$  de álcool butílico. A mistura foi levada ao vórtex para homogeneização e, posteriormente, centrifugada para que o sobrenadante fosse retirado para a análise. As concentrações totais de MDA em cada amostra foram determinadas por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1,1,3,3-tetrametoxipropano. A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi monitorada a 535nm, em microplacas, em leitor de ELISA. Os resultados foram expressos por  $\mu\text{M/mg}$  de proteína. A concentração de óxido nítrico foi mensurada através do reativo de Griess (1% de sulfanilamida e 0,1% naftil-etileno-diamina em 2,5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Neste ensaio, a quantidade de nitrito foi determinada nas amostras e utilizada como indicador da síntese de óxido nítrico. O sobrenadante das amostras foi adicionado com

igual volume do Reativo de Griess em placa de leitura, que foi incubada por 10min no escuro e, em seguida, foi determinada as absorbâncias, com leitura em 570nm. O óxido nítrico das amostras de testículo foi determinado através da curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (Tsikas, 2007).

Por fim, FRAP foi determinada pelo método descrito por Benzie e Strain (1996), envolvendo o método de redução do ferro. O FRAP consiste em uma dosagem colorimétrica baseada no princípio de redução do complexo de tripiridiltriazina férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) a forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ), pelos antioxidantes de uma amostra, com desenvolvimento de uma cor azul intensa com um máximo de absorção a 593nm. A reação foi realizada adicionando 10 $\mu\text{L}$  de amostra, ou padrão, com 190 $\mu\text{L}$  da solução de FRAP em microplacas. A mistura foi incubada no escuro por 30min e levada ao leitor de microplacas.

#### 4.3.13 Avaliações espermáticas

Imediatamente após a eutanásia, a região da cauda do epidídimo esquerdo dos animais foi cortada 3 vezes em placa de Petri contendo 500 $\mu\text{l}$  BWW para permitir a liberação dos espermatozoides. Este fluido foi diluído em 500 $\mu\text{l}$  de Tris-cítrico-frutose (Tris 3,025 g, ácido cítrico 1,7 g, frutose 1,25 g, água destilada 100mL q.s.p.) aquecido a 34°C. Alíquotas de fluido foram coletadas para avaliação da motilidade e morfologia espermática.

##### 4.3.13.1 Motilidade total

Para analisar a motilidade total, 10 $\mu\text{l}$  do fluido epididimário foi colocado entre lâmina e lamínula, previamente aquecidos a 37°C, e avaliados sob aumento de 400x, em microscópio óptico. As células foram classificadas em móveis ou imóveis (Morakinyo et al., 2010) e a motilidade foi expressa em porcentagem (0-100) (CBRA, 1998).

#### 4.3.13.2 Morfologia espermática

Para a análise da morfologia espermática, 50µl de fluido fixado da cauda epididimária foi fixado em 100µl de formaldeído 4% tamponado. Esta preparação foi examinada em microscópio de contraste de fase (Bioval) com aumento de 1000x, sendo avaliadas 200 células. Foram contabilizados espermatozoides com morfologia normal e anormal (defeitos da cabeça e cauda), sendo os resultados expressos em porcentagem (Filler, 1993).

#### 4.3.14 Produção espermática testicular diária, número de espermatozoides e tempo de trânsito no epidídimo

Espermátides testiculares resistentes à homogeneização (estágio 19 da espermatogênese), bem como espermatozoides na cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram contados (Robb et al., 1978 modificado), seguindo o protocolo: testículo esquerdo foi descapsulado e pesado e homogeneizado em 5mL de NaCl 0,9% contendo Triton X-100 0,05%. Após uma diluição de dez vezes, uma amostra foi transferida para câmaras de Neubauer (quatro campos por animal), e o número de espermátides maduras foi contado. Para calcular a produção diária de espermatozoides (PDE), o número de espermátides no estágio 19 foi dividido por 6,1, que é o número de dias em que as espermátides estão presentes no epitélio seminífero. Da mesma forma, as porções da cabeça/corpo e da cauda do epidídimo foram cortadas em pequenos fragmentos com tesoura e homogeneizadas, e os espermatozoides foram contados conforme descrito para o testículo. O tempo de trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo foi determinado dividindo-se o número de espermatozoides em cada porção pela PDE (Hood & Hood, 2005).

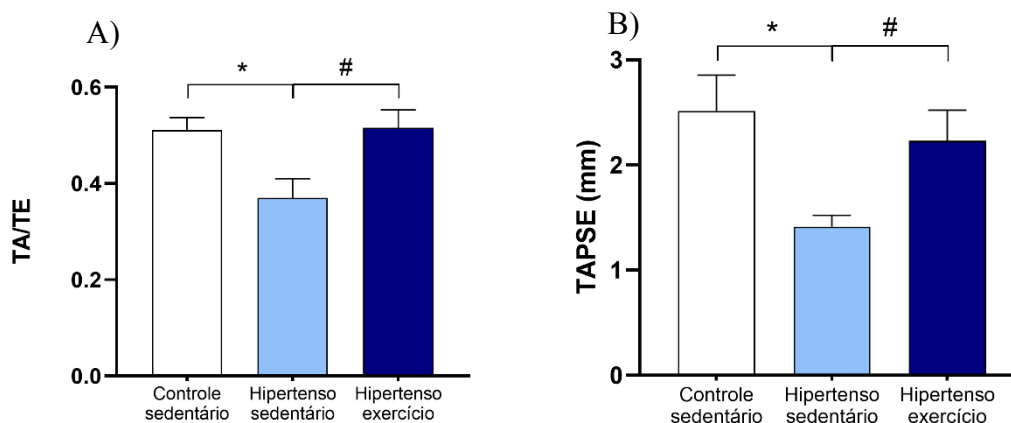
#### 4.3.15 Análises Estatísticas

Os resultados foram submetidos a avaliação de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, foram realizados dois testes t de *Student*. Primeiramente, comparou-se dados de animais dos grupos hipertenso sedentário e controle sedentário, para verificar o efeito da doença sobre os órgãos reprodutivos masculinos. O outro teste de t foi feito para comparar resultados de ratos dos grupos hipertenso sedentário e hipertenso exercício, para avaliar se o treinamento físico combinado foi capaz de minimizar os potenciais danos testiculares e epididimários causados pela HAP. Diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas utilizando-se o *software GraphPad Prism 8.2.1* (GraphPad Software Inc., SanDiego, CA, USA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (D.P.M).

#### 4.4. Resultados

##### 4.4.1 Validação da indução da HAP

Os resultados da ecocardiografia mostraram que a MCT foi capaz de induzir a HAP em ratos que receberam sua injeção (Fig. 2). No 22º dia após a aplicação de MCT, ratos do grupo HAP sedentário apresentaram menor razão TA/TE da artéria pulmonar e redução da função sistólica do ventrículo direito, avaliada pela TAPSE, em comparação com animais dos grupos controle sedentário e HAP exercício ( $p < 0,05$ ; Fig. 2).



**Figura 2:** Resistência da artéria pulmonar e função sistólica do ventrículo direito. A) Relação tempo de aceleração/tempo de ejeção (TA/TE) medido no 22º dia após injeção de MCT. B) Valores médios da excursão sistólica do plano anular tricúspide (TAPSE), medida no 22º dia após injeção de MCT. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre animais dos grupos controle sedentário e HAP sedentário pelo Teste t de Student. (n = 6-7 animais/grupo).

#### 4.4.2 Efeitos da HAP sobre parâmetros testiculares e epididimários

Animais do grupo hipertenso sedentário apresentaram peso corporal final, ganho de peso corporal, peso absoluto do epidídimo e concentrações de testosterona sérica menores que o observado em ratos controle sedentário ( $p < 0,05$ ; Tabela 1). Peso corporal inicial, peso absoluto dos testículos, peso relativo do epidídimo e índice gonadossomático dos animais dos grupos experimentais não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ; Tabela 1).

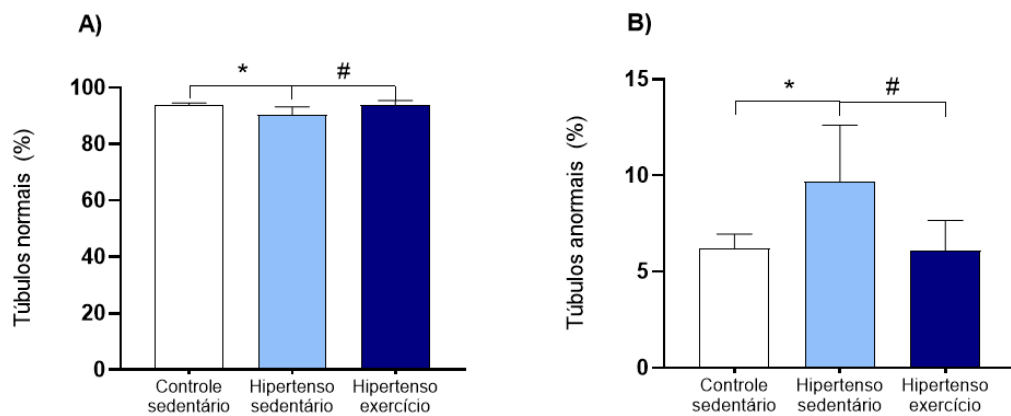
**Tabela 1:** Parâmetros biométricos corporais, testiculares, epididimários e concentração de testosterona sérica de ratos Wistar saudáveis (controle sedentário) ou com hipertensão arterial pulmonar (HAP) induzida por monocrotalina, submetidos ou não ao treinamento físico combinado (TFC).

Parâmetros	Controle sedentário	HAP sedentário	HAP + TFC
Peso corporal inicial (g)	197,40 ± 14,24	192,80 ± 10,23	207,40 ± 11,26
Peso corporal final (g)	306,00 ± 15,76	267,40 ± 19,57*	274,00 ± 29,81
Ganho de peso corporal (g)	108,60 ± 26,27	74,60 ± 18,41*	66,60 ± 35,66
Testículo (g)	1,29 ± 0,16	1,16 ± 0,10	1,20 ± 0,15
Epidídimo (g)	0,46 ± 0,04	0,39 ± 0,04*	0,40 ± 0,04
Epidídimo (g/100g)	0,31 ± 0,04	0,29 ± 0,03	0,29 ± 0,03
Índice gonadossomático	0,84 ± 0,11	0,87 ± 0,09	0,87 ± 0,06
Testosterona (ng/dL)	9,75 ± 2,06	7,00 ± 0,00*	7,00 ± 0,81

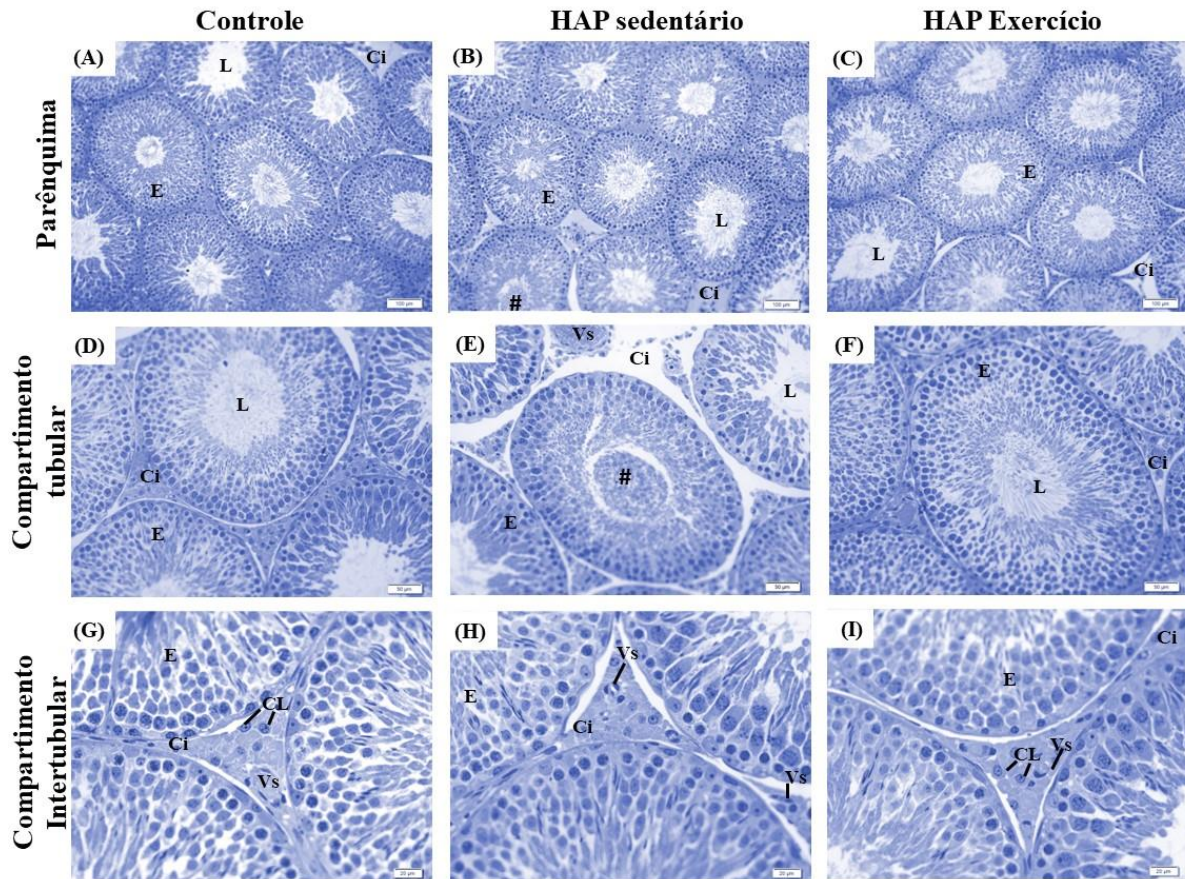
Valores expressos em média ± D.P.M. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre animais dos grupos controle sedentário e HAP sedentário pelo Teste t de Student. (n = 5 animais/grupo).

Os testículos de ratos do grupo controle sedentário apresentaram túbulos seminíferos exibindo epitélio íntegro, com camadas regulares e distribuição normal de células germinativas

e células de Sertoli, com espermatozoides no lúmen tubular (Fig. 3A, 4A e D). Já ratos hipertensos sedentários mostraram redução na proporção de túbulos seminíferos normais quando comparados com o observado em animais do grupo controle ( $p < 0,05$ ; Fig. 3A, 4B e E). Houve aumento no percentual de túbulos seminíferos anormais, especialmente com células desprendidas no lúmen tubular, em animais do grupo HAP sedentário comparados com os do grupo controle sedentário ( $p < 0,05$ ; Fig. 3B, 4B e E).

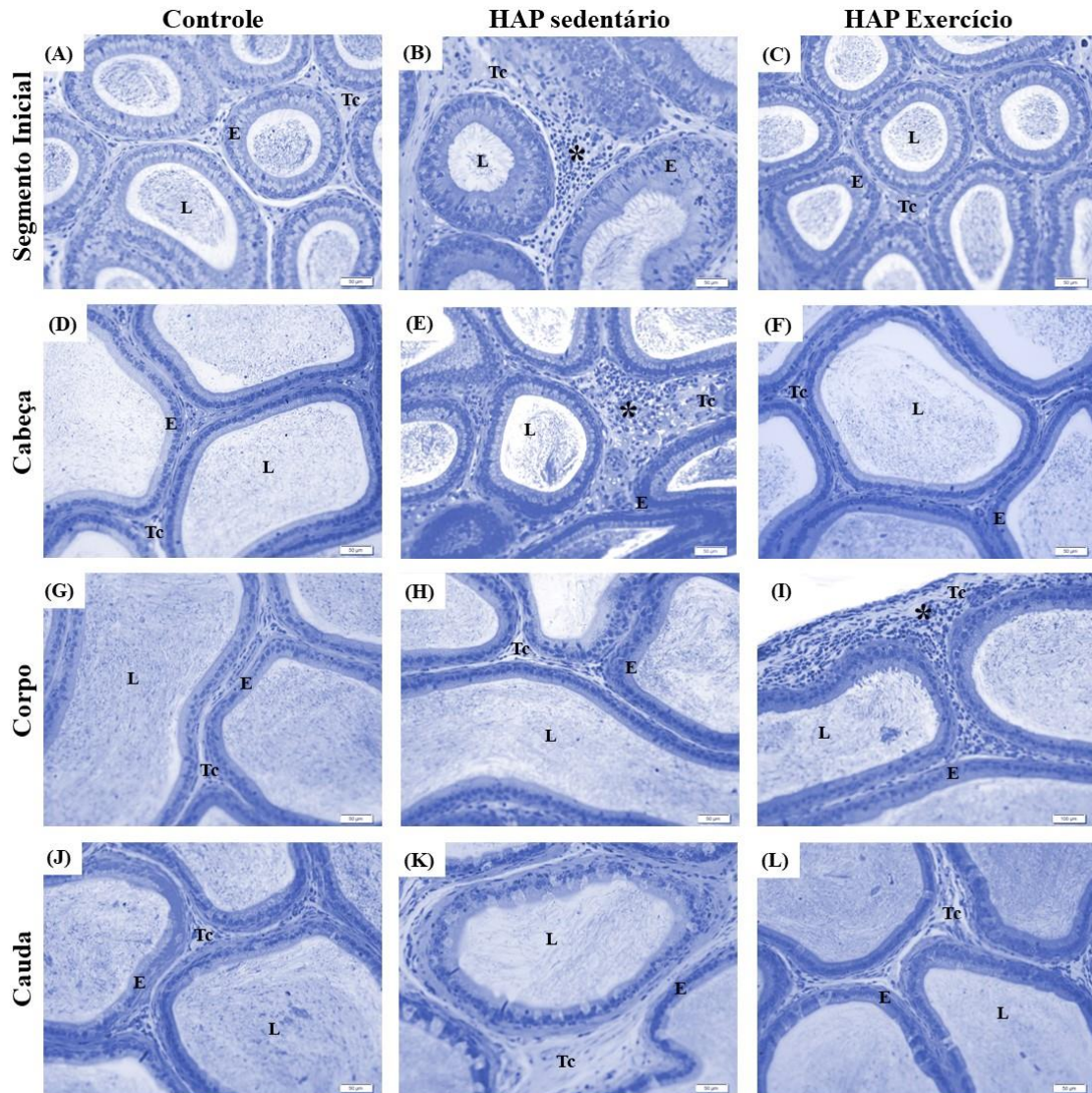


**Figura 3:** Efeitos da hipertensão arterial pulmonar (HAP) e do treinamento físico combinado (TFC) na histopatologia de túbulos seminíferos de ratos Wistar. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre animais dos grupos controle sedentário e HAP sedentário pelo Teste t de *Student*. #Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os animais dos grupos HAP sedentário e HAP treinado (HAP + TFC) pelo Teste t de *Student*. (n = 5 animais/grupo).



**Figura 4:** Fotomicrografias do parênquima testicular de ratos Wistar. Grupo controle sedentário (A, D, G); grupo hipertenso sedentário (B, E, H); grupo hipertenso exercício (C, F, I). Ci, compartimento intertubular; E, epitélio seminífero; L, lúmen; Vs, vaso sanguíneo; CL, célula de Leydig; # células germinativas destacadas no lúmen. Azul de toluidina. Barra de escala: (A-C): 100µm; (D-F): 50 µm; (G-I):20µm. (n = 5 animais/grupo).

Com relação à histopatologia epididimária, em geral, a arquitetura tecidual foi regular, com epitélio, lúmen e interstício sem alterações importantes em todas as regiões do ducto para os animais dos três grupos experimentais (Fig. 5). Entretanto, pontos focais de infiltrados inflamatórios foram localizados no interstício do segmento inicial e da cabeça do epidídimo de animais controle sedentário e HAP sedentários (Fig. 5B e E).



**Figura 5:** Fotomicrografias das quatro regiões do epidídimo de ratos Wistar. A saber, segmento inicial (A-C), cabeça (D-F), corpo (G-I) e cauda (J-L). Grupo controle sedentário (A, D, G, J); grupo hipertenso sedentário (B, E, H, K); grupo hipertenso exercício (C, F, I, L). E, epitélio epididimário; L, lúmen; Tc: tecido conjuntivo; \* pontos focais de infiltrado inflamatório. Azul de toluidina. Barra de escala: 50 µm. (n = 5 animais/grupo).

Não houve alteração nos parâmetros de diâmetros tubular e luminal e % de lúmen entre os animais controle e HAP sedentários ( $p > 0,05$ ; Tabela 2). Animais sedentários com HAP mostraram uma diminuição da altura do epitélio e da porcentagem de compartimento tubular, epitélio seminífero e um aumento na proporção de túnica própria e compartimento intertubular quando comparados com os animais controle sedentário ( $p < 0,05$ ; Tabela 2; Fig.4G e H).

**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 combinado (TFC).

Parâmetros	Controle sedentário	HAP sedentário	HAP + TFC
<i>Morfometria testicular</i>			
Diâmetro tubular ( $\mu\text{m}$ )	334,60 $\pm$ 13,55	327,00 $\pm$ 9,82	346,00 $\pm$ 16,78
Diâmetro luminal ( $\mu\text{m}$ )	114,20 $\pm$ 8,88	115,4 $\pm$ 8,21	116,30 $\pm$ 10,35
Altura do epitélio ( $\mu\text{m}$ )	110,2 $\pm$ 4,19	103,90 $\pm$ 3,36*	114,80 $\pm$ 4,99#
<i>Proporção volumétrica</i>			
Compartimento tubular (%)	88,43 $\pm$ 2,69	84,55 $\pm$ 1,94*	87,87 $\pm$ 2,43#
Epitélio seminífero (%)	66,88 $\pm$ 2,50	62,24 $\pm$ 2,87*	68,91 $\pm$ 2,00#
Túnica própria (%)	4,84 $\pm$ 0,53	6,89 $\pm$ 0,19*	6,12 $\pm$ 0,68
Lúmen (%)	16,71 $\pm$ 1,80	15,88 $\pm$ 2,22	12,83 $\pm$ 1,39#
Compartimento intertubular (%)	11,57 $\pm$ 2,69	15,45 $\pm$ 1,94*	12,13 $\pm$ 2,43#

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 + TFC) pelo Teste t de *Student*. (n = 5 animais/grupo)

Considerando os componentes do intertúbulo, animais sedentários com HAP não apresentaram alterações de proporção e volume de tecido conjuntivo, espaço linfático, macrófagos e células de Leydig comparados com os animais do grupo controle sedentário ( $p > 0,05$ ; Tabela 3). A proporção volumétrica e o volume de vasos sanguíneos entre animais do grupo HAP sedentários e os do grupo controle foram aumentadas ( $p < 0,05$ ; Tabela 3).

**Tabela 3:** Parâmetros histomorfométricos e estereológicos - Proporção volumétrica e volume de componentes do intertúbulo testicular de ratos Wistar saudáveis (controle sedentário) ou com hipertensão arterial pulmonar (HAP) induzida por monocrotalina, submetidos ou não ao treinamento físico combinado (TFC).

Parâmetros	Controle sedentário	HAP sedentário	HAP + TFC
<i>Proporção volumétrica</i>			
Tecido conjuntivo (%)	0,44 $\pm$ 0,18	0,64 $\pm$ 0,20	0,36 $\pm$ 0,17#

Espaço linfático (%)	3,90 ± 0,80	6,09 ± 2,08	3,78 ± 0,89
Vaso sanguíneo (%)	0,722 ± 0,20	1,49 ± 0,25*	1,67 ± 0,79
Macrófagos (%)	0,06 ± 0,03	0,06 ± 0,08	0,01 ± 0,02
Célula de Leydig (%)	6,40 ± 2,32	7,17 ± 0,57	6,30 ± 1,00
<i>Volume</i>			
Tecido conjuntivo(mL)	0,007 ± 0,003	0,012 ± 0,004	0,007 ± 0,003
Espaço linfático (mL)	0,068 ± 0,017	0,120 ± 0,050	0,071 ± 0,021
Vaso sanguíneos (mL)	0,012 ± 0,002	0,028 ± 0,007*	0,032 ± 0,019
Macrófagos (mL)	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,002	0,0002 ± 0,0004
Células de Leydig (mL)	0,110 ± 0,037	0,135 ± 0,018	0,117 ± 0,025

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 os animais dos grupos HAP sedentário e HAP treinado (HAP + TFC) pelo Teste t de *Student*. (n = 5 animais/grupo)

Animais sedentários com HAP quando comparados aos animais controle não apresentaram alterações significativas nas análises morfométricas da célula de Leydig ( $p > 0,05$ ; Tabela 4).

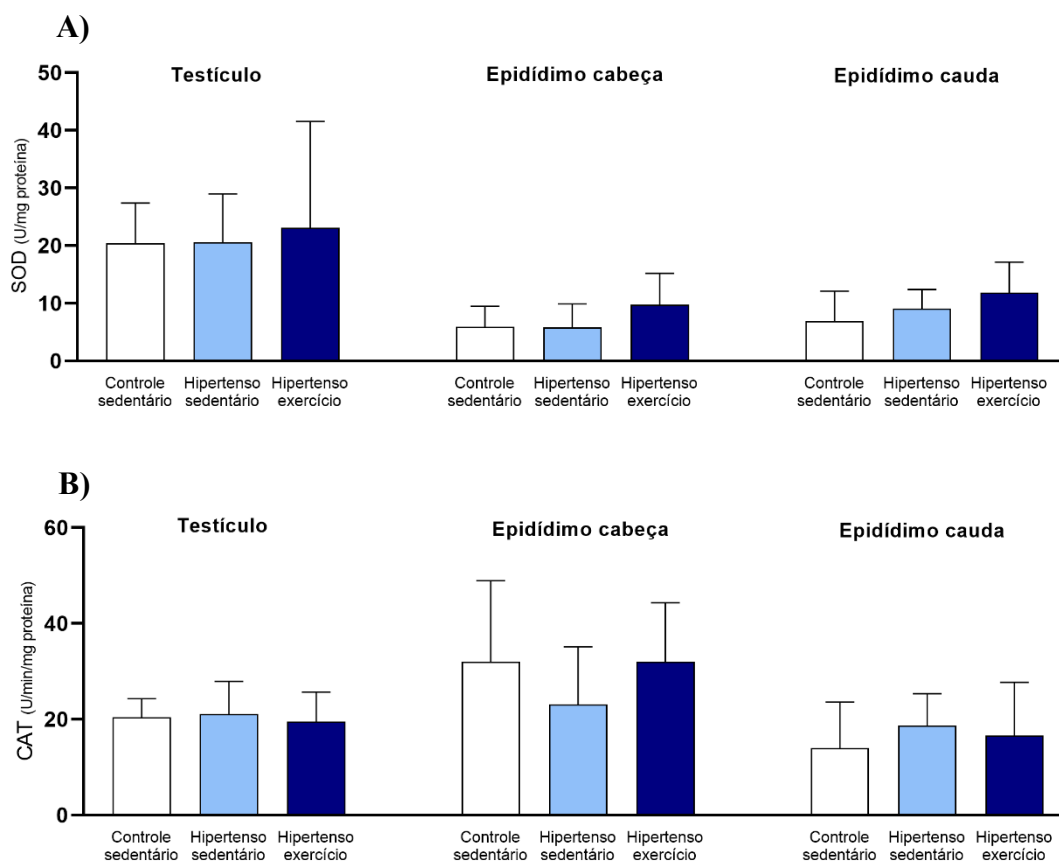
**Tabela 4:** Parâmetros estereológicos das células de Leydig de ratos Wistar saudáveis (controle sedentário) ou com hipertensão arterial pulmonar (HAP) induzida por monocrotalina, submetidos ou não ao treinamento físico combinado (TFC).

Parâmetros	Controle sedentário	HAP sedentário	HAP + TFC
<i>Estereologia das células de Leydig</i>			
Diâmetro nuclear ( $\mu\text{m}$ )	6,76 ± 0,29	6,74 ± 0,19	6,78 ± 0,06
Porcentagem nuclear (%)	0,85 ± 0,34	1,05 ± 0,27	0,90 ± 0,12
Porcentagem citoplasmática (%)	5,55 ± 1,99	6,12 ± 0,52	5,39 ± 0,99
Volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )	162,10 ± 19,79	160,50 ± 13,75	163,30 ± 4,49
Volume citoplasmático ( $\mu\text{m}^3$ )	1079 ± 194,00	997,70 ± 296,60	987,40 ± 240,30
Volume celular ( $\mu\text{m}^3$ )	1242 ± 210,80	1158 ± 300,80	1151 ± 239,70

Número de células/testículo ( $\times 10^6$ )       $87,94 \pm 27,59$        $124,60 \pm 45,64$        $102,10 \pm 6,62$

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*. (n = 5 animais/grupo)

As atividades das enzimas SOD e CAT testiculares e epididimárias não tiveram alterações em animais sedentários hipertensos comparados aos animais controle sedentários ( $p > 0,05$ ; Fig. 6A e B). Houve redução na atividade da GST no testículo de animais do grupo HAP sedentário comparados aos animais do grupo controle sedentário ( $p < 0,05$ ; Fig. 6C). Por outro lado, a atividade de GST no epidídimo, nas regiões da cabeça e cauda, não alterou entre os animais ( $p > 0,05$ ; Fig. 6C). As concentrações de óxido nítrico e os valores de MDA e da capacidade antioxidante total (FRAP) testicular e epididimária não alteraram entre os animais dos grupos experimentais ( $p > 0,05$ ; Fig. 7A, B e C).



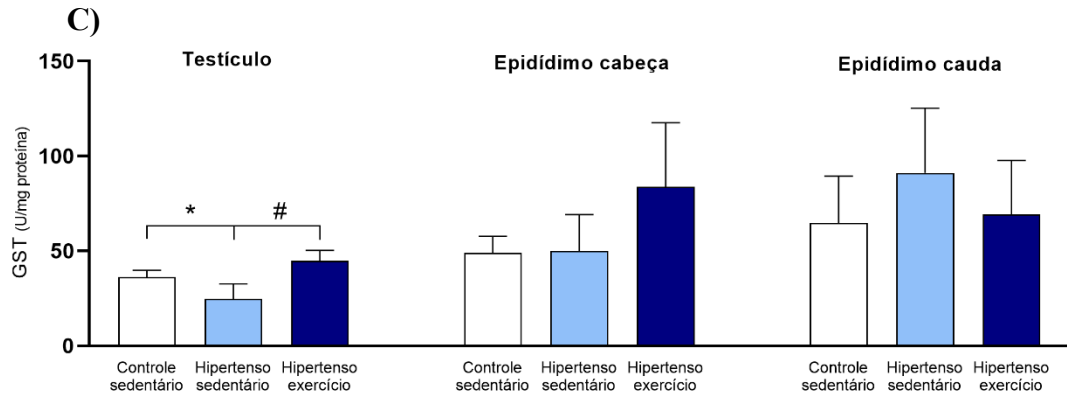
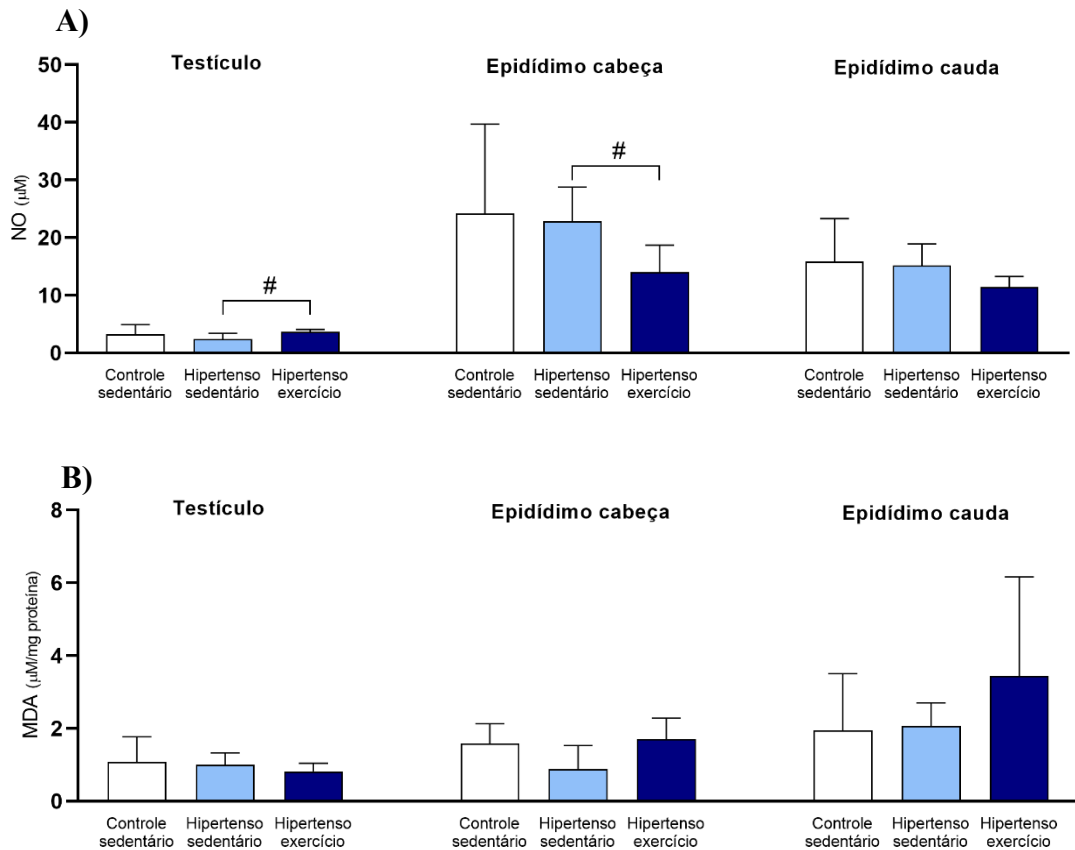


Figura 6: Efeitos da hipertensão arterial pulmonar (HAP) e do treinamento físico combinado sobre atividade de enzimas antioxidantes em testículos e epidídimos (cabeça e cauda) de ratos Wistar. Valores expressos em média  $\pm$  D.P.M. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre animais dos grupos 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 + TFC) pelo Teste t de Student. ( $n = 5$  animais/grupo). SOD = superóxido dismutase; CAT = catalase; GST = glutationa S-transferase.



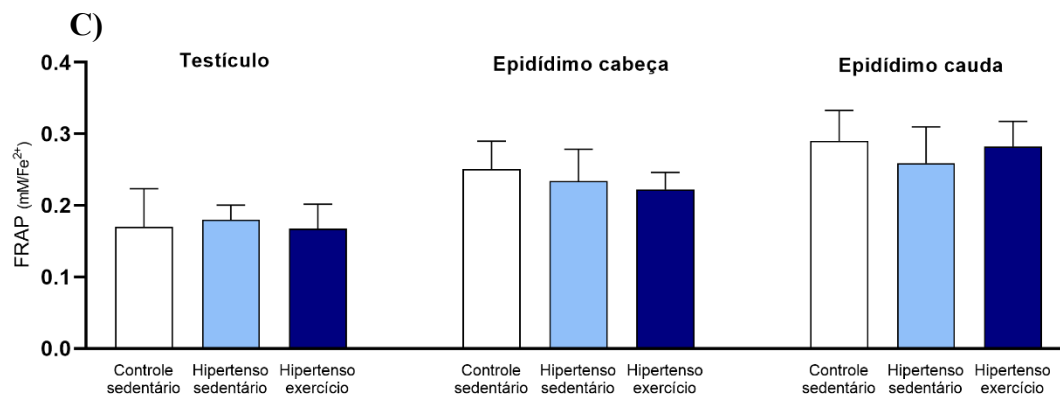


Figura 7: Efeitos da hipertensão arterial pulmonar (HAP) e do treinamento físico combinado sobre produtos do estresse oxidativo e capacidade antioxidante total em testículos e epidídimos (cabeça e cauda) de ratos Wistar. Valores expressos em média  $\pm$  D.P.M. #Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os animais dos grupos HAP sedentário e HAP treinado (HAP + TFC) pelo Teste t de Student. ( $n = 5$  animais/grupo). NO = óxido nítrico; MDA = malondialdeído; FRAP = capacidade antioxidante total.

A motilidade espermática total foi menor em ratos hipertensos que em animais controle ( $p < 0,05$ ; Tabela 5). Nas análises de morfologia espermática não houve diferença significativa, sendo que a porcentagem de espermatozoides normais e anormais (patologias na cabeça, peça intermediária e cauda) foi semelhante entre os animais do grupo controle sedentário e hipertenso sedentário ( $p > 0,05$ , Tabela 5).

O número de espermátides maduras no testículo e por grama de testículo, a produção espermática diária, o número de espermatozoides da cabeça/corpo e da cauda do epidídimo e por grama do epidídimo foram reduzidos nos animais doentes sedentários em comparação com os animais controle sedentários ( $p < 0,05$ , Tabela 5). Já o tempo de trânsito dos espermatozoides nas regiões da cabeça/corpo e da cauda não teve alterações significativas entre os animais dos grupos experimentais ( $p > 0,05$ , Tabela 5).

**Tabela 5:** Parâmetros espermáticos (morfologia e motilidade) e contagem espermática de ratos Wistar saudáveis (controle sedentário) ou com hipertensão arterial pulmonar (HAP) induzida por monocrotalina, submetidos ou não ao treinamento físico combinado (TFC).

Parâmetros	Controle sedentário	HAP sedentário	HAP + TFC
<i>Parâmetros espermáticos</i>			
Motilidade espermática (%)	81,40 ± 4,72	74,00 ± 4,18*	74,69 ± 5,08
Morfologia normal (%)	98,40 ± 0,82	98,20 ± 0,76	99,13 ± 0,75
Morfologia anormal (%)	1,60 ± 0,82	1,80 ± 0,76	0,88 ± 0,75
<i>Contagem espermática</i>			
Número de espermátides (x10 <sup>6</sup> /testículo)	172,00 ± 20,55	105,90 ± 20,18*	131,80 ± 29,84
Número de espermátides (x10 <sup>6</sup> /g testículo)	134,00 ± 13,19	90,11 ± 23,15*	96,21 ± 14,83
Produção espermática diária (x10 <sup>6</sup> /testículo/dia)	28,20 ± 3,37	17,35 ± 3,31*	21,61 ± 4,89
Número de espermatozoides da cabeça/corpo do epidídimo (x10 <sup>6</sup> /órgão)	85,48 ± 9,02	50,99 ± 9,95*	83,59 ± 20,05#
Número de espermatozoides da cabeça/corpo do epidídimo (x10 <sup>6</sup> /g órgão)	402,30 ± 47,08	287,80 ± 36,61*	417,00 ± 93,21#
Tempo de trânsito de espermatozoides na cabeça/corpo do epidídimo (dias)	3,05 ± 0,33	3,07 ± 1,03	3,87 ± 0,30
Número de espermatozoides do epidídimo da cauda (x10 <sup>6</sup> /órgão)	120,40 ± 22,21	74,28 ± 14,65*	124,40 ± 38,78#
Número de espermatozoides do epidídimo da cauda (órgão x10 <sup>6</sup> /g)	926,50 ± 47,98	622,50 ± 64,98*	792,50 ± 109,60#
Tempo de trânsito de espermatozoides na cauda do epidídimo (dias)	4,33 ± 0,98	4,54 ± 1,76	5,12 ± 1,30

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 os animais dos grupos HAP sedentário e HAP treinado (HAP + TFC) pelo Teste t de *Student*. (n = 5 animais/grupo)

#### 4.4.3 Efeitos do TFC sobre parâmetros testiculares e epididimários de ratos hipertensos

Não houve alteração significativa dos parâmetros biométricos corporais, testiculares, epididimários e concentração de testosterona sérica quando comparados os animais dos grupos hipertenso sedentário e hipertenso exercício ( $p > 0,05$ ; Tabela 1).

Foi mostrado que o TFC aumentou a proporção de túbulos seminíferos normais e diminuiu a proporção dos túbulos seminíferos anormais nos animais hipertensos exercício quando comparados com os do grupo hipertenso que não praticaram o TFC ( $p < 0,05$ ; Figuras 3A e B; 4C e F)

Como relatado para os animais sedentários e HAP sedentários, em geral, não também não houve alterações muito importantes na arquitetura epididimária dos animais exercício sedentário (Fig. 5C, F, I e L). Pontos focais de infiltrados inflamatórios foram localizados no interstício do segmento inicial tanto de animais HAP sedentários quanto nos HAP exercício. Somente nestes animais HAP exercício, foram encontrados infiltrados inflamatórios no corpo (Fig. 5I).

Não houve alteração nos parâmetros de diâmetros tubular e luminal, % túnica própria entre os animais dos grupos hipertenso sedentário e hipertenso exercício ( $p > 0,05$ ; Tabela 2). Animais com HAP submetidos ao TFC apresentaram aumento da altura do epitélio, da proporção de compartimento tubular e epitélio seminífero, com uma redução na proporção de lúmen e compartimento intertubular quando comparados aos animais sedentários com HAP ( $p < 0,05$ ; Tabela 2; Fig. 4H e I).

Considerando os componentes do intertúbulo, a proporção de tecido conjuntivo reduziu entre os animais com HAP que praticaram o TFC comparados aos animais sedentários com a doença ( $p < 0,05$ ; Tabela 3). Por outro lado, para os demais parâmetros de proporção e volume de espaço linfático, vaso sanguíneo, macrófagos e células de Leydig e de volume de tecido

conjuntivo não foram encontradas alterações para os animais controle sedentários e HAP sedentário ( $p > 0,05$ ; Tabela 3; Fig. 4H e I).

Por fim, animais do grupo hipertenso exercício quando comparados aos animais sedentários com HAP não apresentaram alterações significativas nas análises morfométricas da célula de Leydig ( $p > 0,05$ ; Tabela 4).

As atividades das enzimas SOD e CAT testiculares e epididimárias não tiveram alterações em animais hipertensos exercício comparados com os animais sedentários hipertensos ( $p > 0,05$ ; Fig 6A e B). A prática do TFC pelos animais com HAP aumentou a atividade de GST em relação aos animais do grupo HAP sedentário ( $p < 0,05$ ; Figura 6C). Por outro lado, a atividade de GST no epidídimo, nas regiões da cabeça e cauda, não alterou entre os animais dos dois grupos experimentais ( $p > 0,05$ ; Fig. 6C). As concentrações de óxido nítrico testicular e da cabeça do epidídimo alteraram entre os animais hipertensos sedentários com relação aos animais HAP exercício ( $p < 0,05$ ; Figura 7A). Não houve mudanças na concentração de NO na cauda do epidídimo entre os animais dos grupos experimentais ( $p > 0,05$ ; Fig. 7A). Os valores de MDA e da capacidade antioxidante total (FRAP), testicular e epididimária, não apresentaram alterações entre os animais dos grupos experimentais ( $p > 0,05$ ; Fig. 7B e C).

Não houve alteração da motilidade espermática entre os animais doentes sedentários e os do grupo HAP + exercício ( $p > 0,05$ , Tabela 5). Nas análises de morfologia espermática normal e anormal não houve diferença significativa entre os animais dos grupos hipertensos sedentário e exercício ( $p > 0,05$ , Tabela 5).

O número de espermátides maduras no testículo e por grama de testículo e a produção espermática diária não tiveram mudança significativa nos animais doentes sedentários em comparação com os animais HAP exercício ( $p > 0,05$ , Tabela 5). O número de espermatozoides da cabeça/corpo e cauda do epidídimo e por grama do epidídimo aumentaram nos animais que praticaram o TFC e eram hipertensos quando comparados com os animais hipertensos

sedentários. O tempo de trânsito dos espermatozoides nas regiões da cabeça/corpo e da cauda não teve alterações significativas entre os animais dos grupos experimentais ( $p > 0,05$ , Tabela 5).

#### **4.5 Discussão**

Neste trabalho, os resultados mostraram que HAP é capaz de alterar parâmetros testiculares e epididimários, como redução da testosterona sérica e desorganização da histoarquitetura testicular, com diminuição da produção espermática. Também foi observado que a prática do TFC, durante um curto período de tempo, foi importante para a histoarquitetura testicular, mas sem alterações importantes nos epidídimos. A HAP é uma doença grave e que ainda não tem cura (Nogueira-Ferreira et al., 2018). Entre as possíveis estratégias terapêuticas para a HAP estão as farmacológicas e o treinamento físico (Nickel et al., 2020). Alguns estudos recentes mostraram que a prática de treinamento físico é benéfica em parâmetros relacionados aos sistemas cardiopulmonar e muscular (Benjamin et al., 2018; Schmidt et al., 2020; Leite, 2022) e nos testículos de modelos murinos (Guimarães-Ervilha et al., 2023). Porém, os estudos são escassos quando se correlaciona a prática de exercícios a doenças relacionadas com o sistema reprodutor masculino.

A utilização da injeção intraperitoneal de monocrotalina induziu a HAP e promoveu o aparecimento de sintomas cardíacos que foram verificados pelo ecocardiograma, um método de diagnóstico e de prognóstico muito usado em pacientes com esta condição clínica (Ferrara et al., 2019). Animais com HAP submetidos ao TFC apresentaram melhoras nos parâmetros cardíacos, o que corrobora com outros trabalhos que avaliaram a HAP, com o modelo de indução por MCT, e benefícios da prática de exercício físico em aspectos cardiopulmonares de ratos com a doença (Leite, 2022; Portes, 2020; Soares et al., 2019).

No presente estudo, verificou-se que animais hipertensos, induzidos com MCT, e sedentários apresentaram menor peso corporal final e menor ganho de peso ao final do experimento, em comparação a animais controle sedentários. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos que usaram o mesmo modelo de indução por monocrotalina ( $60 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Ahmed et al., 2019; Colombo et al., 2013). De fato, parâmetros biométricos são indicadores importantes do estado geral de saúde de animais (EPA, 1996). O peso absoluto do epidídimo também reduziu nos animais hipertensos sedentários, o que pode ser um indicativo de distúrbio neste órgão (Sellers et al., 2007).

As concentrações de testosterona sérica reduziram nos animais HAP sedentários. Este pode ser um dos prováveis motivos de comprometimento do peso do epidídimo, já que as concentrações de andrógenos, como a testosterona, são essenciais para o desenvolvimento e manutenção da estrutura e função de órgãos reprodutivos como testículos e epidídimos (Sharma, 2007; Hamzeh & Robaire, 2009). Adicionado a isso, a redução na contagem espermática, favorece a diminuição do peso deste órgão. Entretanto, o peso do testículo não alterou, o que difere do estudo pioneiro que avaliou a HAP, induzida por duas doses de MCT ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ ), nos órgãos do sistema reprodutor masculino e efeitos da prática do treinamento físico resistido (Guimarães-Ervilha, 2021). Parte da testosterona produzida pelas células de Leydig fica restrita ao testículo e outra parte é distribuída pelo corpo pela corrente sanguínea (Amory & Bremner, 2003). Apesar de ainda não ter uma correlação precisa entre as concentrações de testosterona plasmática e de testosterona intratesticular (Patel et al., 2019), sabe-se que esta última apresenta concentração aproximadamente 100 vezes maiores que a circulante (Oduwole et al., 2021). Portanto, testosterona intratesticular desempenha um papel imprescindível na manutenção da gônada (Coviello et al., 2005; Page, 2011) e, por isso, mesmo com diminuição da testosterona sérica e, apesar de não termos feita sua quantificação neste

trabalho, a testosterona intratesticular pode ser uma das razões de manutenção do peso dos testículos.

A HAP reduziu a porcentagem de túbulos seminíferos com morfologia normal e aumentou a descamação do epitélio seminífero e/ou presença de restos celulares e células germinativas no lúmen dos túbulos. Problemas na adesão celular podem ser um dos fatores que justificam tais achados, assim como foi relatado por Guimarães-Ervilha (2021). De alguma maneira, a célula de Sertoli pode ter sofrido influência da doença, talvez pela redução da testosterona necessária para a sua função normal (Sharma, 2007). A diminuição da concentração deste andrógeno pode influenciar a formação da barreira da célula de Sertoli e comprometer as junções com as células germinativas, que podem ser prematuramente destacadas e irem para o lúmen dos túbulos seminíferos (O'Donnell et al., 2000; Walker; Cheng, 2005).

Com relação à histopatologia epididimária, os pontos focais de infiltrados inflamatórios encontrados podem ser devido a relação da hipertensão com a inflamação (McLaughlin et al., 2015; Oparil et al., 2018; Thenappan et al., 2018). De fato, a inflamação parece mediar a patogênese da hipertensão, com aumento da permeabilidade dos vasos pela liberação de potentes mediadores como citocinas (interleucinas, fatores de crescimento) e EROs ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ) (Griendling et al., 2021; Oparil et al., 2018). Epidídimos são mais suscetíveis a inflamação e eventos imunes do que testículos (Hedger, 2011) e, com isso, processos inflamatórios são causa importante de prejuízos na infertilidade masculina (Dutta et al., 2021).

Neste estudo, proporções da porção funcional dos testículos reduziram em animais hipertensos, sendo que a proporção volumétrica de túbulos seminíferos em mamíferos é um indicador da eficiência na produção espermática (França & Godinho, 2003). Adicionado a isso, a redução da altura do epitélio pode também indicar prejuízos importantes no túbulo seminífero. Esta mensuração é uma forma mais efetiva de avaliação da produção espermática, uma vez que

o epitélio é um elemento dinâmico no túbulo seminífero, que sofre variações de acordo com o ciclo seminífero (Wing & Christensen, 1982). Portanto, coletivamente estes achados podem sugerir que a produção espermática foi comprometida, o que de fato ocorreu quando avaliamos os parâmetros de contagem espermática. Em contrapartida, a porção do parênquima testicular correspondente ao espaço intertubular, teve um aumento compensatório em animais HAP sedentários. Tal fato vai de encontro, por exemplo, com o aumento da proporção volumétrica e volume de vasos sanguíneos no intertúbulo testicular. Considerando a natureza da HAP, parece plausível que este aumento dos parâmetros vasculares ocorreu devido ao remodelamento dos vasos sanguíneos, uma das alterações histopatológicas observadas nesta doença (Humbert et al., 2019; Tuder et al., 2007).

A HAP não foi capaz de promover mudanças na morfometria de células de Leydig, possivelmente devido ao tempo de experimento. As células de Leydig, podem sofrer perturbações externas e internas, especialmente devido ao estresse oxidativo, o que poderia comprometer suas funções (Wang et al., 2017). De fato, apesar do estresse oxidativo ser um importante mecanismo na patofisiologia da HAP (Hansen et al., 2016; Nickel et al., 2020), neste estudo não foi constatado este desequilíbrio. Curiosamente, apenas a atividade de GST foi reduzida pela HAP, possivelmente devido a redução do substrato GSH, que pode ser superutilizado em processos de detoxificação. Esses efeitos foram observados em testículos e epidídimos de animais com hipertensão arterial sistêmica induzida por N(G)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Akinyemi et al., 2015). Desta forma, os mecanismos pelos quais a doença modula a atividade desta enzima precisam ser estudados.

A motilidade dos espermatozoides dos animais hipertensos sedentários encontrou-se reduzida. Este resultado é condizente com a redução de testosterona, uma vez que para manter sua função normal, durante o armazenamento na cauda do epidídimo, os espermatozoides dependem de concentrações adequadas de testosterona circulante (Sharma & Agarwal, 2011).

A produção diária e o número de espermátides testiculares foram reduzidas nos animais HAP sedentários, o que provavelmente está relacionado com mudanças na histologia testicular relatadas anteriormente. Esses dois parâmetros são importantes indicadores do potencial de fertilidade masculina, pois espermátides são células da linhagem germinativa que estão no processo final da espermatogênese, estando diretamente relacionadas à produção diária espermática (Fernandez et al., 2008). Como houve redução da produção diária de espermatozoides, era esperado que a quantidade desses gametas encontrados no epidídimo (cabeça, corpo e cauda) fosse diminuída, o que aconteceu. O tempo que os espermatozoides levam para passar pelos processos de maturação no epidídimo é chamado de tempo de trânsito (Fernandez et al., 2008). Em ratos, esse trajeto leva cerca de oito dias (Robb et al., 1978; Robaire et al., 2006). Portanto, a manutenção do tempo de trânsito dos espermatozoides, provavelmente contribuiu para o percentual satisfatório de espermatozoides com morfologia normal.

O TFC empregado não foi capaz de prevenir a redução do peso corporal característica deste modelo de HAP, provavelmente pelo curto tempo de experimento. Porém, alguns dos parâmetros afetados pela HAP foram reestabelecidos, como aumento da altura do epitélio seminífero e da proporção de compartimento tubular e epitélio seminífero, com uma redução na proporção de compartimento intertubular. A proporção de tecido conjuntivo foi reduzida nos animais hipertensos que praticaram TFC, o que vai de encontro com a redução na proporção do intertúbulo, já que este tecido é um dos componentes do intertúbulo testicular (Sharma & Agarwal, 2011). De fato, o exercício físico parece exercer um papel importante para melhoria dos componentes intertubulares (Guimarães-Ervilha et al., 2023), especialmente por minimizar respostas inflamatórias e proliferativas relacionadas à hipertensão (Agarwal et al., 2009; Benjamin et al., 2018).

O TFC também se mostrou importante para reverter a contagem reduzida de espermatozoides nas regiões da cabeça, corpo e cauda do epidídimo. Esses achados no

epidídimo corroboram com a reconstituição da arquitetura e estrutura dos túbulos seminíferos, de forma que os espermatozoides puderam ser produzidos normalmente. Resultados semelhantes foram encontrados por Guimarães-Ervilha et al., (2023), cujo trabalho empregou o treinamento resistido.

A prática de treinamento físico está associada a um aumento na produção de óxido nítrico (NO) (Arena et al., 2015; Otsuki et al., 2019), o que encontramos nos testículos dos animais HAP exercício. Durante o treinamento físico, há aumento na tensão de cisalhamento que atua aumentando a expressão da enzima NO sintase, que produz NO endógeno (Arena et al., 2015). No epidídimo, apesar de não observarmos alterações nas atividades das enzimas antioxidantes e marcadores oxidativos, os níveis de óxido nítrico foram reduzidos na região da cabeça do epidídimo em animais do grupo hipertenso exercício. Estudos demonstram que ao longo do ducto epididimário, as NO sintases estão presentes principalmente na região da cabeça (Kolasa et al., 2009; Scala & Maruccio, 2012). Neste contexto, embora o papel do NO epididimário sobre a maturação dos espermatozoides não esteja totalmente elucidado, sabe-se que em concentrações mais altas, a aquisição da motilidade e a viabilidade são prejudicadas. Por outro lado, o NO (em concentrações endógenas) parece ser necessário para a motilidade e viabilidade adequada do espermatozoide (Chaturvedi & Kumar, 2007; Scala & Maruccio, 2012; Zini et al., 1996). Desta forma, o exercício pode ter proporcionado uma redução importante para a manutenção espermática, de forma que os espermatozoides adquiram sua maturidade funcional nos segmentos proximais antes de serem armazenados em um estado quiescente na cauda do epidídimo (Zou et al., 2018).

O TFC se mostrou uma estratégia terapêutica importante para testículos, mas com pouca eficiência nos epidídimos. Para além do sistema reprodutor, em que dados da literatura ainda são inexistentes, TFC tem sido benéfico para melhorar outros parâmetros afetados pela HAP (Mainguy et al., 2010; Maiorana et al., 2000). O TFC como treinamento muscular inspiratório

aeróbico e de resistência, durante 8 semanas, se mostrou seguro e induziu melhorias na força muscular e no consumo máximo de oxigênio de pacientes com HAP (González-Saiz et al., 2017). Em outro estudo, durante 15 semanas de treinamento, os pacientes tiveram melhorias na força muscular respiratória e na capacidade de exercício (Kabitz et al., 2014). Em modelo murino, com indução de MCT ( $60 \text{ mg kg}^{-1}$ ), o TFC melhorou parâmetros pulmonares e cardíacos, e foi importante na prevenção de aspectos disfuncionais da doença (Leite, 2022).

#### 4.6. Conclusão

Os resultados mostraram que HAP afetou parâmetros reprodutivos testiculares, comprometendo a produção de espermatozoides. Animais hipertensos tiveram redução no peso e ganho de peso corporal e na concentração de testosterona sérica. Diminuição do percentual de túbulos seminíferos normais e de parâmetros morfométricos, como proporção de compartimento tubular e epitélio seminífero, expressam o prejuízo à produção espermática diária. O TFC promoveu alterações significativas na morfometria testicular e na contagem espermática no epidídimo. Mas na modalidade e tempo empregados, não se mostrou uma alternativa terapêutica eficaz para minimizar e/ou proteger os impactos da doença nos epidídimos. Portanto, é essencial que outros estudos sejam feitos para compreender os mecanismos de atuação da HAP nos órgãos do sistema reprodutor masculino. Além disso, outras alternativas terapêuticas devem ser testadas a fim de mitigar os efeitos da doença.

#### 4.7. Referências bibliográficas

- Aebi, H. (1984). Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 105(C).  
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Agarwal, D., Haque, M., Sriramula, S., Mariappan, N., Pariaut, R., & Francis, J. (2009). Role of proinflammatory cytokines and redox homeostasis in exercise-induced delayed

- progression of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 54(6), 1393-1400. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.135459>
- Ahmed, L. A., Al Arqam, Z. O., Zaki, H. F., & Agha, A. M. (2014). Role of oxidative stress, inflammation, nitric oxide and transforming growth factor-beta in the protective effect of diosgenin in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *European journal of pharmacology*, 740, 379-387. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.026>
- Akinyemi, A. J., Adedara, I. A., Thome, G. R., Morsch, V. M., Rovani, M. T., Mujica, L. K. S., ... & Schetinger, M. R. C. (2015). Dietary supplementation of ginger and turmeric improves reproductive function in hypertensive male rats. *Toxicology Reports*, 2, 1357-1366. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.10.001>
- Amann, R. P. (1970). The male rabbit. IV. Quantitative testicular histology and comparisons between daily sperm production as determined histologically and daily sperm output. *Fertility and Sterility*, 21(9). [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)37743-3](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)37743-3)
- Amory, J. K., & Bremner, W. J. (2003). Regulation of testicular function in men: implications for male hormonal contraceptive development. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 85(2-5), 357-361. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00205-X](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00205-X)
- Arena, R., Cahalin, L. P., Borghi-Silva, A., & Myers, J. (2015). The effect of exercise training on the pulmonary arterial system in patients with pulmonary hypertension. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 57(5). <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2014.03.008>
- Benjamin, N., Marra, A. M., Eichstaedt, C., & Grünig, E. (2018). Exercise training and rehabilitation in pulmonary hypertension. *Heart Failure Clinics*, 14(3), 425-430. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2018.03.008>
- 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(1). <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2). <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52(C). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- Charan, J., & Biswas, T. (2013). How to calculate sample size for different study designs in medical research? *Indian Journal of Psychological Medicine*, 35(2). <https://doi.org/10.4103/0253-7176.116232>
- Chaturvedi, C. M., & Kumar, P. (2007). Nitric oxide modulates gonadal and adrenal function in Japanese quail *Coturnix coturnix japonica*. *General and comparative endocrinology*, 151(3), 285-299. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.01.024>
- Colli, L. G., Belardin, L. B., Echem, C., Akamine, E. H., Antoniassi, M. P., Andretta, R. R., Mathias, L. S., Rodrigues, S. F. de P., Bertolla, R. P., & de Carvalho, M. H. C. (2019). Systemic arterial hypertension leads to decreased semen quality and alterations in the testicular microcirculation in rats. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47157-w>
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998). *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2 ed. Belo Horizonte.
- Colombo, R., Siqueira, R., Becker, C. U., Fernandes, T. G., Pires, K. M., Valença, S. S., ... & Belló-Klein, A. (2013). Effects of exercise on monocrotaline-induced changes in right heart function and pulmonary artery remodeling in rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 91(1), 38-44. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0261>
- CONCEA. (2013). *Diretrizes da prática da eutanásia do CONCEA*. Brasília. Disponível em: [https://www.unip.br/pesquisa/assets/download/comite\\_etica\\_animais/diretrizes-da-pratica-de-eutanasia-do-concea.pdf](https://www.unip.br/pesquisa/assets/download/comite_etica_animais/diretrizes-da-pratica-de-eutanasia-do-concea.pdf). Acesso em: 21 dez. 2022.

- 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), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11886-019-1235-4>
- Coste, F., Guibert, C., Magat, J., Abell, E., Vaillant, F., Dubois, M., ... & Freund-Michel, V. (2017). Chronic hypoxia aggravates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: a rodent relevant model to the human severe form of the disease. *Respiratory research*, *18*(1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0533-x>
- Coviello, A. D., Matsumoto, A. M., Bremner, W. J., Herbst, K. L., Amory, J. K., Anawalt, B. D., ... & Jarow, J. P. (2005). Low-dose human chorionic gonadotropin maintains intratesticular testosterone in normal men with testosterone-induced gonadotropin suppression. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *90*(5), 2595-2602. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0802>
- 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. da. (2020). *Pfaffia glomerata* hydroalcoholic extract stimulates penile tissue in adult Swiss mice. *Journal of Ethnopharmacology*, *261*. <https://doi.org/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*. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.12.047>
- Dieterich, S., Bieligk, 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). <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.1.33>

- Dutta, S., Sengupta, P., Slama, P., & Roychoudhury, S. (2021). Oxidative stress, testicular inflammatory pathways, and male reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 10043. <https://doi.org/10.3390/ijms221810043>
- Environmental Protection Agency U. S. (EPA) (1996). *Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment*. [https://www.epa.gov/sites/default/files/2014-11/documents/guidelines\\_repro\\_toxicity.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2014-11/documents/guidelines_repro_toxicity.pdf)
- Fernandez, C. D. B., Porto, E. M., Arena, A. C., & Kempinas, W. D. G. (2008). Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. *International journal of andrology*, 31(4), 427-437. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00788.x>
- Ferrara, F., Zhou, X., Gargani, L., Wierzbowska-Drabik, K., Vriza, O., Fadel, B. M., ... & Bossone, E. (2019). Echocardiography in pulmonary arterial hypertension. *Current Cardiology Reports*, 21(4), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11886-019-1109-9>
- Filler, R. (1993). Methods for Evaluation of Rat Epididymal Sperm Morphology. *Male Reproductive Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-461207-5.50025-0>
- França, L. R., & Godinho, C. L. (2003). Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biology of Reproduction*, 68(5), 1554-1561. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010652>
- 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. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00212.2011>
- González-Saiz, L., Fiuza-Luces, C., Sanchis-Gomar, F., Santos-Lozano, A., Quezada-Loaiza, C. A., Flox-Camacho, A., Munguía-Izquierdo, D., Ara, I., Santalla, A., Morán, M., Sanz-Ayan, P., Escibano-Subías, P., & Lucia, A. (2017). Benefits of skeletal-muscle exercise

- training in pulmonary arterial hypertension: The WHOLEi+12 trial. *International journal of cardiology*, 231, 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.12.026>
- Guimarães-Ervilha, L. O. (2021). *O efeito da hipertensão arterial pulmonar induzida sobre parâmetros testiculares de ratos Wistar submetidos ao treinamento físico resistido*. 90 f. [Dissertação Mestrado em Educação Física, Universidade Federal de Viçosa].
- Guimarães-Ervilha, L. O., Soares, L. L., Bento, I. D. S. P., Carvalho, R. P. R., Lima, T. I., Dias, F. C. R., ... & Machado-Neves, M. (2023). Effect of Induced Pulmonary Arterial Hypertension on Testicular Parameters of Wistar Rats Subjected to Resistance Exercise Training. *Microscopy and Microanalysis*, ozac037. <https://doi.org/10.1093/micmic/ozac037>
- Guo, D., Li, S., Behr, B., & Eisenberg, M. L. (2017). Hypertension and Male Fertility. *The World Journal of Men's Health*, 35(2). <https://doi.org/10.5534/wjmh.2017.35.2.59>
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- Hamzeh, M., & Robaire, B. (2009). Effect of testosterone on epithelial cell proliferation in the regressed rat epididymis. *Journal of andrology*, 30(2), 200-212. <https://doi.org/10.2164/jandrol.108.006171>
- Hansen, T., Galougahi, K. K., Celermajer, D., Rasko, N., Tang, O., Bubb, K. J., & Figtree, G. (2016). Oxidative and nitrosative signalling in pulmonary arterial hypertension—Implications for development of novel therapies. *Pharmacology & Therapeutics*, 165, 50-62. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.05.005>
- Harrison, D. G., Coffman, T. M., & Wilcox, C. S. (2021). Pathophysiology of Hypertension: The Mosaic Theory and Beyond. *Circulation research*, 128(7), 847–863. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318082>

- Hassoun P. M. (2021). Pulmonary Arterial Hypertension. *The New England journal of medicine*, 385(25), 2361–2376. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2000348>
- Hedger, M. P. (2011). Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. *Journal of andrology*, 32(6), 625-640. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.012989>
- Heinrich, A., & DeFalco, T. (2020). Essential roles of interstitial cells in testicular development and function. *Andrology*, 8(4), 903-914. <https://doi.org/10.1111/andr.12703>
- Hood, R. D., & Hood, R. D. (2005). *Developmental and reproductive toxicology: a practical approach*. CRC press.
- Hornberger, T. A., & Farrar, R. P. (2004). Physiological Hypertrophy of the FHL Muscle Following 8 Weeks of Progressive Resistance Exercise in the Rat. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 29(1). <https://doi.org/10.1139/h04-002>
- Humbert, M., Guignabert, C., Bonnet, S., Dorfmueller, P., Klinger, J. R., Nicolls, M. R., ... & Rabinovitch, M. (2019). Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives. *European Respiratory Journal*, 53(1). <https://doi.org/10.1183/13993003.01887-2018>
- Kabitz, H. J., Bremer, H. C., Schwoerer, A., Sonntag, F., Walterspacher, S., Walker, D. J., Ehlken, N., Staehler, G., Windisch, W., & Grünig, E. (2014). The combination of exercise and respiratory training improves respiratory muscle function in pulmonary hypertension. *Lung*, 192(2), 321–328. <https://doi.org/10.1007/s00408-013-9542-9>
- Kempinas, W. de G., & Klinefelter, G. R. (2014). Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis*, 4(2), e979114. <https://doi.org/10.4161/21565562.2014.979114>
- Kolasa, A., Marchlewicz, M., Kurzawa, R., Głabowski, W., Trybek, G., Wenda-Różewicka, L., & Wiszniewska, B. (2009). The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the

- testis and epididymis of rats with a dihydrotestosterone (DHT) deficiency. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 14(3), 511-527. <https://doi.org/10.2478/s11658-009-0019-z>
- Leite, G. A. A., Figueiredo, T. M., Sanabria, M., Dias, A. F. M. G., Silva, P. V. e., Martins Junior, A. da C., Barbosa Junior, F., & Kempinas, W. D. G. (2017). Ascorbic acid supplementation partially prevents the delayed reproductive development in juvenile male rats exposed to rosuvastatin since prepuberty. *Reproductive Toxicology*, 73. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.07.006>
- Leite, L. B. (2022). *Efeitos do treinamento físico combinado sobre a morfologia e a função cardiopulmonar em ratos com hipertensão arterial pulmonar*. 75 f. [Dissertação Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa]
- Mainguy, V., Maltais, F., Saey, D., Gagnon, P., Martel, S., Simon, M., & Provencher, S. (2010). Peripheral muscle dysfunction in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Thorax*, 65(2), 113-117. doi: 10.1136/thx.2009.134379
- Maiorana, A., O'Driscoll, G., Dembo, L., Cheetham, C., Goodman, C., Taylor, R., & Green, D. (2000). Effect of aerobic and resistance exercise training on vascular function in heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 279(4), H1999-H2005. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.4.H1999>
- McLaughlin, V. V., Shah, S. J., Souza, R., & Humbert, M. (2015). Management of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 65(18), 1976-1997. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2015.03.540>
- Mereles, D., Ehlken, N., Kreuzer, S., Ghofrani, S., Hoeper, M. M., Halank, M., ... & Grünig, E. (2006). Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Circulation*, 114(14), 1482-1489. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.618397>

- Meyer, F. J., Lossnitzer, D., Kristen, A. V., Schoene, A. M., Kübler, W., Katus, H. A., & Borst, M. M. (2005). Respiratory muscle dysfunction in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal*, *25*(1), 125-130. <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00095804>
- Morakinyo, A. O., Achema, P. U., & Adegoke, O. A. (2010). Effect of *Zingiber officinale* (Ginger) on sodium arsenite-induced reproductive toxicity in male rats. *African Journal of Biomedical Research*, *13*(1), 39-45.
- Natali, A. J., Fowler, E. D., Calaghan, S. C., & White, E. (2015). Voluntary exercise delays heart failure onset in rats with pulmonary artery hypertension. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *309*(3). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00262.2015>
- Niebauer, J., & Cooke, J. P. (1996). Cardiovascular effects of exercise: role of endothelial shear stress. *Journal of the American College of Cardiology*, *28*(7), 1652-1660.
- Nogueira-Ferreira, R., Moreira-Gonçalves, D., Santos, M., Trindade, F., Ferreira, R., & Henriques-Coelho, T. (2018). Mechanisms underlying the impact of exercise training in pulmonary arterial hypertension. *Respiratory Medicine* *134*, 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2017.11.022>
- Nickel, N. P., Yuan, K., Dorfmueller, P., Provencher, S., Lai, Y. C., Bonnet, S., ... & de Jesus Perez, V. A. (2020). Beyond the lungs: systemic manifestations of pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *201*(2), 148-157. <https://doi.org/10.1164/rccm.201903-0656CI>
- O'Donnell, L., Stanton, P. G., Bartles, J. R., & Robertson, D. M. (2000). Sertoli cell ectoplasmic specializations in the seminiferous epithelium of the testosterone-suppressed adult rat. *Biology of reproduction*, *63*(1), 99-108. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.1.99>

- Oduwole, O. O., Huhtaniemi, I. T., & Misrahi, M. (2021). The Roles of Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone and Testosterone in Spermatogenesis and Folliculogenesis Revisited. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12735. <https://doi.org/10.3390/ijms222312735>
- 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, 1204. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01204>
- Page, S. T. (2011). Physiologic role and regulation of intratesticular sex steroids. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 18(3), 217-223. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e328345d50e>
- Portes, A. M. O. (2020). *Efeitos do treinamento resistido prévio sobre a força muscular e a morfologia e função cardiopulmonar em ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina*. 88 f. [Dissertação Mestrado em Educação Física, Universidade Federal de Viçosa] <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/28061>
- Robb, G. W., Amann, R. P., & Killian, G. J. (1978). Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 54(1). <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0540103>
- Robaire, B., Hinton, B. T., & Orgebin-Crist, M. C. (2006). The epididymis. In Knobil and Neill's physiology of reproduction (pp. 1071-1148). Academic Press.
- Scala, G., & Maruccio, L. (2012). Nitric oxide (NO) expression during annual reproductive activity in buffalo epididymis: A histochemical and immunocytochemical study. *Theriogenology*, 78(1), 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.01.017>
- Sahn, D. J., DeMaria, A., Kisslo, J., & Weyman, A. (1978). Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: Results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*, 58(6). <https://doi.org/10.1161/01.CIR.58.6.1072>

- Sale, D. G., Jacobs, I., Macdougall, J. D., & Garner, S. (1990). Comparison of two regimens of concurrent strength and endurance training. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 22(3). <https://doi.org/10.1249/00005768-199006000-00012>
- Sanches, I. C., Conti, F. F., Sartori, M., Irigoyen, M. C., & de Angelis, K. (2014). Standardization of resistance exercise training: Effects in diabetic ovariectomized rats. *International Journal of Sports Medicine*, 35(4). <https://doi.org/10.1055/s-0033-1351254>
- Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Wilkins, M. R., & Grimminger, F. (2011). Mechanisms of disease: Pulmonary arterial hypertension. *Nature Reviews Cardiology* (Vol. 8, Issue 8). <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2011.87>
- Schmidt, C., Bovolini, J. A., Gonçalves, N., Vasques-Nóvoa, F., do Amparo Andrade, M., Santos, M., ... & Moreira-Gonçalves, D. (2020). Exercise preconditioning prevents left ventricular dysfunction and remodeling in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Porto Biomedical Journal*, 5(5). <https://doi.org/10.1097/j.pbj.0000000000000081>
- Sellers, R. S., Mortan, D., Michael, B., Roome, N., Johnson, J. K., Yano, B. L., ... & Schafer, K. (2007). Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. *Toxicologic pathology*, 35(5), 751-755. <https://doi.org/10.1080/01926230701595300>.
- Sharma, R. K., & Agarwal, A. (2011). Spermatogenesis: an overview. *Sperm chromatin*, 19-44. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6857-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6857-9_2)
- Simonneau, G., Robbins, I. M., Beghetti, M., Channick, R. N., Delcroix, M., Denton, C. P., ... & Souza, R. (2009). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American college of cardiology*, 54(1\_Supplement\_S), S43-S54. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.04.012>

- Soares, L. L., Drummond, F. R., Rezende, L. M. T., Lopes Dantas Costa, A. J., Leal, T. F., Fidelis, M. R., Neves, M. M., Primola-Gomes, T. N., Carneiro-Junior, M. A., Carlo Reis, E. C., & Natali, A. J. (2019). Voluntary running counteracts right ventricular adverse remodeling and myocyte contraction impairment in pulmonary arterial hypertension model. *Life Sciences*, 238. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116974>
- 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. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00217.2009>
- 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). <https://doi.org/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*, 360. <https://doi.org/10.1136/bmj.j5492>
- Trueblood, N. A., Inscore, P. R., Brenner, D., Lugassy, D., Apstein, C. S., Sawyer, D. B., & Colucci, W. S. (2005). Biphasic temporal pattern in exercise capacity after myocardial infarction in the rat: relationship to left ventricular remodeling. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 288(1), H244-H249. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00042.2004>
- 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*, 851(1-2), 51-70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.054>

- Tuder, R. M., Marecki, J. C., Richter, A., Fijalkowska, I., & Flores, S. (2007). Pathology of pulmonary hypertension. *Clinics in chest medicine*, 28(1), 23-42. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2006.11.010>
- Walker, W. H., & Cheng, J. (2005). FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*, 130(1), 15-28. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00358>
- Wang, Y., Chen, F., Ye, L., Zirkin, B., & Chen, H. (2017). Steroidogenesis in Leydig cells: effects of aging and environmental factors. *Reproduction*, 154(4), R111-R122. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0064>
- Wing, T. Y., & Christensen, A. K. (1982). Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *American Journal of Anatomy*, 165(1), 13-25. <https://doi.org/10.1002/aja.1001650103>
- Zimmer, A., Teixeira, R. B., Bonetto, J. H. P., Siqueira, R., Carraro, C. C., Donatti, L. M., Hickmann, A., Litvin, I. E., Godoy, A. E. G., Araujo, A. S., Colombo, R., & 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). <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2937-1>
- Zini, A., O'Bryan, M. K., Magid, M. S., & Schlegel, P. N. (1996). Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biology of reproduction*, 55(5), 935-941. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.5.935>
- Zhou, W., De Iuliis, G. N., Dun, M. D., & Nixon, B. (2018). Characteristics of the epididymal luminal environment responsible for sperm maturation and storage. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 59. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00059>

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados desta dissertação indicam que a hipertensão, nos quadros clínicos de hipertensão arterial sistêmica e hipertensão arterial pulmonar, afeta parâmetros reprodutivos em ratos machos. A maior parte dos danos foi constatada nos testículos, com comprometimento da produção de testosterona e de parâmetros morfométricos que, conseqüentemente, levam a produção espermática deficiente. Desta forma, mais estudos devem ser feitos para compreender melhor os mecanismos da hipertensão nos testículos e epidídimos de modelos animais experimentais. Acionado a isso, estratégias terapêuticas devem ter consideradas como mitigadoras dos danos causados pela hipertensão. Para isso, faz-se importante a utilização, por exemplo, de diferentes modalidades e intensidades de treinamento físico, de forma a verificar quais são mais eficientes para tratamento dos indivíduos hipertensos.