UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

LUCAS GIGLIO COLLI

**Hipertensão arterial sistêmica induz diminuição na
qualidade dos espermatozoides e alterações na
microcirculação testicular em ratos espontaneamente
hipertensos (SHR)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutor em Farmacologia.

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

LUCAS GIGLIO COLLI

**Hipertensão arterial sistêmica induz diminuição na
qualidade dos espermatozoides e alterações na
microcirculação testicular em ratos espontaneamente
hipertensos (SHR)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof (a) Dr (a) Maria Helena Catelli de Carvalho

Versão corrigida.

São Paulo

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Colli, Lucas Giglio

Hipertensão arterial sistêmica induz diminuição na qualidade dos espermatozoides e alterações na microcirculação testicular em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) / Lucas Giglio Colli; orientadora Maria Helena Catelli de Carvalho. -- São Paulo, 2019.

85 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. hipertensão Arterial. 2. espermatozoide. 3. testículo. 4. hipoxia. 5. microcirculação. I. Carvalho, Maria Helena Catelli de, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lucas Giglio Colli

Título da Tese: Hipertensão arterial sistêmica induz diminuição na qualidade dos espermatozoides e alterações na microcirculação testicular em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)

Orientador(a): Maria Helena Catelli de Carvalho

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado *"Função vascular e/ou cardíaca em modelos de doenças cardiovasculares e envelhecimento: Influência da resposta imune inata; dimorfismo sexual e/ou hormônios gonadais femininos e masculinos"*, registrada sob o protocolo nº **134/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **22/11/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Maria Helena Catelli Carvalho**

- Departamento: *Farmacologia*

- Membros da Equipe: *Cinthy Echem de Souza Pereira (Pós-graduando), Lucas Giglio Colli (Pós-graduando), Tiago Januário da Costa (Pós-graduando), Beatriz Pereira da Costa (Iniciação científica), Stephen Fernandes de Paula Rodrigues (Jovem pesquisador), Maristella de Almeida Vitta Landgraf (Jovem pesquisador), Eliana Hiromi Akamine (Credenciado PG)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, relatório final de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled *"Vascular and/or cardiac function in cardiovascular disease and aging models: Influence of the innate immune response; sexual dimorphism and/or female and male gonadal hormones"*, protocol nº **134/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for Scientific Research Purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **11/22/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Maria Helena Catelli Carvalho**

- Team members: *Cinthy Echem de Souza Pereira (Graduate Student), Lucas Giglio Colli (Graduate Student), Tiago Januário da Costa (Graduate Student), Beatriz Pereira da Costa (Undergraduate Student), Stephen Fernandes de Paula Rodrigues (Young Investigator), Maristella de Almeida Vitta Landgraf (Young Investigator), Eliana Hiromi Akamine (Graduate Supervisor)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Rattus norvegicus	Wistar	Macho/male	5, 15, 21, 25, 48 semanas/weeks	360
	Wistar	Fêmea/female	5, 15, 21, 25, 48 semanas/weeks	360
	SEM	Macho/male	5, 15, 21, 25, 48 semanas/weeks	360
	SEM	Fêmea/female	5, 15, 21, 25, 48 semanas/weeks	360

São Paulo, 23 de novembro de 2016.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

I'm not the man they think I am at home. I'm a rocket man.

— *Rocket man* — Sir Elton John

AGRADECIMENTOS

Antes de agradecer qualquer pessoa que aqui será citada, tenho que homenagear todos que deram seu sangue para que hoje eu possa ter os direitos atuais, por mínimos que sejam. Por anos a comunidade LGBTQIA+ viveu marginalizada, em um constante clima de exílio e sem acesso aos direitos básicos. Aliás, até hoje pessoas vivem sem poder se expressar abertamente, sem demonstrar seu carinho, afeto e o seu verdadeiro *eu*. Entretanto, é importante falar que até os anos 60 essa repressão era muito pior (ou menos encoberta). Na noite de 28 de junho de 1969, 50 anos atrás, foi dado início a essa nova fase. Os frequentadores do *Stonewall Inn*, bar LGBTQIA+ de Nova Iorque, responderam as constantes opressões policiais e esse foi um dos gatilhos para o início aos direitos LGBTQIA+ no ocidente. O conflito entre os frequentadores do bar e a polícia não foi pacífico e assumiu proporções jamais imaginadas. Foram dez dias de conflitos intensos. Violência! Sangue! Não frequentadores do bar se juntaram ao público para combater os policiais. *Stonewall* é o marco de quando a comunidade LGBTQIA+ expressou que não queria mais ser violentada, abusada e menosprezada. Foi o início de uma série de mudanças que ainda não foram concluídas. Como contraponto, vemos atualmente uma crescente onda de ódio à comunidade LGBTQIA+ se estruturando. Nessa questão, o Brasil tem seu lado vermelho-sangue. É um dos países que mais mata LGBTQIA+ no mundo. Por isso é importante conhecermos nossa história para que sejamos resistência. Por isso, muito obrigado a todos os LGBTQIA+ que lutaram pela causa!

Cabo-de-guerra, 2019. Óleo sobre painel, Francisco Hurtz. Imagem disponibilizada pelo artista.

Outro ponto importante do meu agradecimento é para todas as mulheres da minha vida. Sempre símbolos de constante força, resiliência e paixão. Em especial a minha mãe Cassia Aparecida Giglio que possui a alma mais pura que conheço, a minha orientadora Maria Helena Catelli de Carvalho que demonstrou o que é ter força e lutar naquilo em que acredito e minha tia Sandra que sempre foi minha confidente.

-Deixo aqui minha homenagem em uma canção-

(...)

This is a woman's world.

This is my world.

This is a woman's world

For this man's girl.

*There ain't a woman in this world,
Not a woman or a little girl,
That can't deliver love
In a man's world.*

*I've born and I've bread.
I've cleaned and I've fed.
And for my healing wits
I've been called a witch.
I've crackled in the fire
And been called a liar.
I've died so many times
I'm only just coming to life.*

(...)

Woman.

Neneh Cherry.

Aos homens – Meu pai, Marco Aurélio Colli que sempre foi meu mais fiel amigo e meu namorado André do Val Guerra que apresentou que o amor, carinho e respeito caminham juntos.

Agradeço ao restante da minha família devido ao constante suporte. Minha identidade não tem preço e com vocês sempre me foi permitido ser quem eu nasci para ser.

À minha família escolhida, meus amigos! Seja da infância, faculdade ou de outro momento da vida. Todos caminharão sempre comigo!

Ao Mauricio Oliveira, Rafael Cabbia e Gabriela Nobrega Lavorini –
Amigos de alma.

Em especial, à Larissa Berloff Belardin. Amiga-irmã que me ajudou
sempre em todos os momentos. Amo-te! Seu DNA está também nessa
tese (e na nossa publicação)!

Aos meus amigos Caio Zocca, Ms. Henrique Moura e Paula Rocha -
sinto que carrego o amor de vocês de outras vidas! O apoio e confiança
de vocês me faz ser uma pessoa sempre melhor!

Aos meus amigos Francisco Hurtz, André Galvão, Allann Seabra e Ian
Duarte que me ensinaram a enxergar o mundo de forma diferente. Meu
amor e respeito a vocês.

Aos meus mais diversos amigos que carrego no meu DNA, tenho o mais
puro carinho por todos.

A gente não faz amigos, reconhece-os. Vinicius de Moraes.

Ao pessoal da Universidade de São Paulo, que dedicaram todo seu
tempo, esforço, amizade e companheirismo para me ajudar a ser um
profissional melhor. Em especial ao Stephen Fernandes e a Cynthia
Echem que compartilharam do conhecimento e tiveram o carinho de me
ajudar na minha trajetória. Agradeço imensamente também a professora
Eliana Hiromi Akamine, Camila Trindade, Mônica Nunes, Maria
Aparecida de Oliveira, Rosangela Eichler, Antônio Garcia, Sônia Leite,
Marta Rodrigues, Sandra Silva, Manoel Rocha, Manoel Messias, Moacir

Brito, Fabiane Fernandes, Ana Rita Araújo, Tiago Januário, Vanessa Oliveira, Simone Sartoretto, Bruno Marques, Andrea Prisco, Renée Oliveira, Carolina Midori, Aline Inada, Beatriz Costa, Paula Barros, Aline Milan, Vanessa Miyoshi, Vanessa Franco e Veronica Rennó. Essa tese é especial porque tem um pouco de todos vocês.

Ao Dr. Ricardo Bertolla e o pessoal do seu laboratório que deu toda a atenção e suporte necessários para que esse projeto pudesse seguir adiante.

À Universidade de São Paulo e agências de fomento CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) (processo número 141302/2014-3 e 308357/2014-0), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) que incentivam pesquisa de qualidade e permite que muitos alunos alcancem seus sonhos.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma participaram no desenvolvimento deste trabalho e estiveram sempre presentes em minha vida. Celebrando cada vitória e me ajudando nas derrotas. Sou extremamente grato, obrigado a todos!

RESUMO

COLLI, L. G. **Hipertensão arterial sistêmica induz diminuição na qualidade dos espermatozoides e alterações na microcirculação testicular em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).** 2019. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A qualidade do sêmen em humanos está diminuindo de forma alarmante nos últimos 50 anos. Esse aspecto é espelho da sociedade e de sua cultura. Esse quadro reflete o panorama global da saúde do homem, corroborado pelas alterações na fertilidade em doenças como câncer e diabetes. Paralelamente a esse declínio, ocorre o aumento de pacientes hipertensos, chegando a atingir 700 milhões de homens em idade reprodutiva. Foi descrito em um pequeno estudo coorte de pacientes hipertensos alteração na morfologia dos espermatozoides e aumento da fragmentação do DNA. Fortalecendo essa relação entre hipertensão e infertilidade masculina, estudos em modelos experimentais com elevados valores pressóricos, como em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) -*Stroke Prone*, demonstraram alterações no testículo, sendo as modificações morfológicas nas arteríolas testiculares um fator comum entre os modelos. É sabido que em outros órgãos alvos da hipertensão, como no caso do coração, rins e cérebro, existem alterações na microcirculação. De fato, na hipertensão as alterações na microcirculação são um dos pontos-chave para os danos causados nesses órgãos e posteriormente falência em suas funções. Até o momento são escassas as análises espermáticas nesses modelos e mesmo em pacientes hipertensos. Entretanto, não é descrito na literatura o mecanismo pelo qual a hipertensão causa danos ao testículo e seu impacto na qualidade do sêmen. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o testículo de SHR e ratos normotensos Wistar por meio de análise histológica e estudar a microcirculação *in vivo* utilizando microscopia intravital. Avaliamos também a expressão de proteínas (*Western blotting*), a qualidade dos espermatozoides, analisando a atividade mitocondrial (ensaio DAB), das espécies reativas de oxigênio (marcação por DHE),

integridade do acrossoma (FITC-PNA) e fragmentação do DNA (ensaio cometa). Foi observado que animais hipertensos apresentaram hipertrofia testicular quando comparados aos normotensos, acompanhado de alterações em sua morfologia, sendo o espessamento da túnica adventícia das arteríolas o fator unificante em todos testículos. Em 60% dos SHR foi encontrado células germinativas imaturas na luz dos túbulos seminíferos e necrose tubular. Visto as alterações estruturais nas arteríolas, foi demonstrado pela análise *in vivo* nesses vasos que ratos hipertensos possuem aumento na frequência de parada de fluxo quando estimulados com norepinefrina e que esses valores diminuem na presença da prazosina, antagonista adrenérgico α_1 . Sendo que esse fenômeno está ligado à troca de fluidos entre circulação e testículos, foi analisado a expressão de proteínas relacionadas a hipóxia. Foi observado que SHR, quando comparados a Wistar, possuíam aumento da expressão proteica de HIF-1 α e VEGF. Quanto a análise dos espermatozoides, foi observado nos SHR a diminuição da atividade mitocondrial, seguida de aumento da atividade de espécies reativas de oxigênio, fragmentação de DNA e porcentagem de espermatozoides com dano ao acrossoma. Além disso, foi observado nesses animais diminuição de aproximadamente 44% da concentração espermática e aumento de espermatozoides teratospermicos. Em conclusão, ratos hipertensos apresentaram dano testicular, possivelmente associado às alterações na microcirculação local. Isso foi acompanhado pela diminuição da qualidade dos espermatozoides tais como aumento da atividade das EROs e aumento da expressão de proteínas induzidas por hipóxia testicular.

Palavras-chave: Órgãos-alvo. Hipóxia. Sêmen. Reprodução masculina. Pressão arterial.

ABSTRACT

COLLI, L. G. **Arterial hypertension leads to decreased sperm quality and alterations in the testicular micirculation in spontantaneously hypertensive rats (SHR)**. 2019. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The semen quality in humans has been alarmingly declining over the last 50 years. This aspect reflects the modern society and its culture. In addition, this might reflect the overall men's health, corroborated by changes in fertility in diseases such as cancer, diabetes and obesity. Parallel to this reproductive decline, there is an increasing in the number of hypertensive patients, reaching approximately 700 million men of reproductive age. It was described in a cohort study with reduced number of hypertensive patients, alteration in sperm morphology and increased DNA fragmentation. Strengthening the relationship between hypertension and male infertility, studies in experimental models with high blood pressure values, such as spontaneously hypertensive rats (SHR)-Stroke Prone, demonstrated alterations in the testis, and morphological changes in testicular arterioles were a unifying factor among the models. It is well known that in hypertensive target organs, such as the heart, kidneys and brain, there are changes in microcirculation as well. In fact, changes in microcirculation are one of the key points for hypertensive damage to these organs and further failure in their functions. So far, semen analyzes are scarce experimental models and even in hypertensive patients. It was observed that SHR have decreased sperm concentration. However, the mechanism by which hypertension causes damage to the testis and its impact on semen quality has not been described in the literature. Thus, the aim of this study was to evaluate the SHR and Wistar normotensive rats testis by histological analysis and to study microcirculation in vivo using intravital microscopy. In addition, we evaluated protein expression (Western blotting), sperm quality by analyzing mitochondrial activity (DAB assay), reactive oxygen species (DHE labeling), acrosome integrity (FITC-PNA) and DNA fragmentation (comet essay). It was observed that hypertensive animals presented testicular hypertrophy when compared to normotensive animals,

accompanied by changes in their morphology, with thickening of the arteriolar adventitia layer, which it was the unifying factor in all testes. In 60% of the SHR, immature germ cells were found in the light of the seminiferous tubules and tubular necrosis. Considering the structural changes in the arterioles, it was demonstrated by in vivo analysis of testicular vasomotion in the arterioles that hypertensive rats have increased frequency of flow stop when stimulated with norepinephrine and that these values were decreased in the presence of Prazosin, α 1-adrenergic antagonist. Since vasomotion is linked to fluid exchange between circulation and testes, the expression of hypoxia-related proteins was analyzed. SHR, when compared to Wistar, had increased protein expression of HIF-1 α and VEGF. Regarding sperm analysis, it was observed that SHR mitochondrial activity was decreased, followed by increased activity of reactive oxygen species (almost 10-fold increase in DHE+ nuclei), DNA fragmentation and percentage of sperm with damaged acrosome. Furthermore, it was observed in these animals approximately 44% decrease in sperm concentration and increased teratospermic sperm. In conclusion, hypertensive rats presented testicular damage, possibly associated with changes in local microcirculation. This was accompanied by decreased sperm quality, evidenced by increased ROS activity and increased protein expression induced by testicular hypoxia.

Keywords: Target Organs. Hypoxia. Semen. Male reproduction. Blood pressure.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	Alpha
β	Beta
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μm^2	Micrometro quadrado
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celcius
%	Porcentagem
ALH	Amplitude do deslocamento lateral da cabeça
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenina trifosfato
BCA	Ácido bicinchonínico
BCF	Frequência de batimento cruzado
BWW	Meio Biggers-Whitten-Whittingham
CASA	Análise espermática assistida por computador
CEUA	Comitê de Ética de Uso e Cuidado de Animais
cm	Centímetros
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DHE	Dihidroetídio
DNA	Ácido desoxirribonucleico

DTT	Ditiotreitol
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HIF-1	Fator induzível por hipóxia
Hz	Hertz
i	Interstício
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
G	Força centrífuga
g	Grama
Kg	Quilograma
LIN	Linearidade
LMPA	Agarose <i>low melting point</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB4	Leucotrieno B4
M	Molar
mA	Microampère
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
Ne	Norepinefrina
nm	Nanômetro

p	Peso
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Solução salina tamponada de fosfato
PE-50	Polietileno heparinizado
pH	Potencial Hidrogeniônico
P.I	Peça intermediária
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PNA	Lecitina de amendoim
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
s	Segundo
SDS PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SHR-SP	Ratos espontaneamente hipertensos propensos ao acidente vascular encefálico
STR	Retilinearidade
Ts	Túbulo seminífero
UA	Unidade arbitrária
USP	Universidade de São Paulo
V	Volts

VAP	Velocidade média
VCL	Velocidade curvilínea
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
Vol	Volume
Vs	Versus
WKY	Wistar Kyoto
WT	Wistar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. O conto da Aia e o nosso: o que temos em comum?	21
1.2. Infertilidade masculina: um problema não reconhecido	26
1.3. Por que estudar hipertensão arterial e qualidade do sêmen?	32
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1. Animais	40
3.2. Aferição da pressão arterial em ratos	40
3.2.1. <i>Pressão arterial caudal</i>	40
3.2.2. <i>Pressão arterial direta</i>	41
3.3. Rotina histológica para análise morfológica e morfométrica do testículo	41
3.4. Microscopia intravital	43
3.4.1. <i>Preparação cirúrgica</i>	43
3.4.2. <i>Análise da vasomotricidade testicular por meio do estudo da frequência de parada de fluxo sanguíneo em arteríolas testiculares</i>	44
3.4.3. <i>Adesão leucocitária em vênulas testiculares</i>	44
3.5. Expressão proteica por Western Blotting	45
3.6. Análise funcional dos espermatozoides	46
3.6.1. <i>Concentração, morfologia e motilidade dos espermatozoides</i>	47
3.6.2. <i>Atividade mitocondrial</i>	48
3.6.3. <i>Integridade do acrossoma</i>	48
3.6.4. <i>Determinação da atividade das espécies reativas de oxigênio intracelular (EROs)</i>	49
3.6.5. <i>Análise da fragmentação de DNA por meio do Ensaio Cometa alcalino</i>	49

3.7. Análise estatística.....	53
4. RESULTADOS.....	54
4.1. Caracterização dos modelos experimentais: massa cardíaca, pressão arterial e frequência cardíaca em SHR e Wistar.....	54
4.2. SHR apresentaram alterações morfológicas e morfométricas na microvasculatura testicular.....	55
4.3. SHR e Wistar não apresentaram diferença quanto a adesão leucocitária em vênulas testiculares.....	58
4.4. Alteração na vasomotricidade testicular via receptores adrenérgicos α_1 e aumento na expressão de proteínas relacionadas à hipóxia em testículos de ratos hipertensos...	59
4.5. Ratos hipertensos apresentaram diminuição da qualidade espermática.....	62
5. DISCUSSÃO.....	65
6. CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

Hipertensão arterial sistêmica induz diminuição na qualidade do sêmen e alterações na microcirculação testicular em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)

1. INTRODUÇÃO

Vários estudos demonstraram diminuição na qualidade do sêmen na espécie humana, também evidenciado pela redução de aproximadamente 52,4% na concentração de espermatozoides no ejaculado em menos de cinquenta anos, construindo a imagem de uma possível crise quanto a fertilidade masculina (LEVINE et al., 2017). Mas será que sabemos as causas e estamos preparados para lidar com esse assunto?

1.1. O conto da Aia e o nosso: o que temos em comum?

Em meio aos recentes contrastes políticos e mudanças globais, no início de 2017 o seriado estadunidense *The Handmaids's Tale* estreou na emissora *Hulu* e trouxe para discussão o tema diminuição na fertilidade e seu impacto na sociedade. A série de televisão foi baseada no romance de Margaret Atwood escrito na era *Reagan* dos Estados Unidos da América (EUA) nos anos 80.

Inicialmente, em um futuro breve e distópico, o seriado retrata uma sociedade que vivencia problemas de infertilidade e baixa taxa de natalidade, na qual é atribuído à diversos aspectos da sociedade moderna, como por exemplo às mudanças no ambiente, doenças, excesso no uso de produtos químicos, radiações e uso de contraceptivos. Em frente a essa nova condição que é inerente a situação biológica de fertilidade, foi instituído a república de *Gilead*,

uma nação que tomou o lugar dos EUA e foi fundada em base totalitária, patriarcal, militarizada e possuía a bíblia como seu alicerce constitucional. Nesse novo território, apenas representantes do sexo masculino imperam e as mulheres têm seus corpos tomados pelo Estado e são designadas a desempenhar papéis específicos que configuram uma figura submissa frente dessa robusta e engessada sociedade patriarcal. O ponto chave do seriado permeia entre as mulheres férteis, denominadas de *Aias*, que são utilizadas com a finalidade de procriação por meio de estupros ritualizados para satisfazer os seus donos, representados por casais heterossexuais incapazes de conceber um filho.

Por mais que seja uma ficção, *The Handmaid's Tale* tangencia pontos do hodierno momento, visto que é ilusório desassociar a figura da fertilidade da influência no comportamento da sociedade. Para isso, é possível ainda citar duas vias: quando a fertilidade impacta na sociedade e quando a fertilidade é impactada pelo comportamento da sociedade.

Dentro de uma ótica biológica, temos um espelho de como as ações humanas no meio ambiente e seu comportamento refletem-se em alteração nos padrões de fertilidade, seja por causa de doenças ou mesmo agressões ambientais (EISENBERG et al., 2014, 2015; JACOBSEN et al., 2000; JENSEN et al., 2009, 2013; MATZUK; LAMB, 2008; MUKHERJEE; RIDGEWAY; LAMB, 2010). Sabe-se que atualmente em um curto período, a qualidade dos espermatozoides diminuiu expressivamente. Em 2017, Levine e colaboradores publicaram uma meta-análise, na qual observou-se que a contagem de espermatozoides nos homens de países ocidentais decresceu em torno de 52,4% entre 1973 e 2011, ou seja, uma queda anual de 1,4% (LEVINE et al., 2017). É importante ressaltar que características do sêmen, como a contagem de espermatozoides, espelham de modo sensível o impacto do ambiente moderno na saúde masculina (WANG; SWERDLOFF, 2014). Esse dado representa que talvez nossa sociedade não esteja tão longe quanto era pensado de uma crise acerca da fertilidade masculina e por isso, o que ela representa em termos da saúde do homem e seu impacto na sociedade, tem que ser avaliado. É válido ressaltar que a infertilidade é uma forma de morbidade reprodutiva também com consequências sociais. Uma crescente literatura etnográfica demonstra que por séculos as mulheres vêm suportando o fardo da infertilidade

do casal, mesmo quando ela não é a fonte (INHORN, 2013). Por exemplo, no Egito, aonde o patriarcado é enraizado e opera em diversas camadas da sociedade, esse sistema impacta em como o casal lida com a questão da infertilidade. Mesmo o homem sendo a causa da não fertilidade do casal, as mulheres são frequentemente colocadas em situações de risco no lugar dele, como por exemplo expostas a estimulação ovariana por medicamentos, por que os representantes do sexo masculino não aceitam tomar a culpa para eles. Indo além, caso não consiga sucesso pelas técnicas de reprodução, os homens geralmente acabam rompendo seu casamento e procurando mulheres mais jovens com a ideia de que isso resolva seus problemas de fertilidade (INHORN, 2003).

Tomando esse exemplo da Índia, fica claro como a questão da infertilidade masculina é por muitas vezes mascarada pela própria sociedade. O homem é responsável por quase metade de todos os casos infertilidade em um casal heterossexual (CATES; FARLEY; ROWE, 1985), embora a fertilidade tenha sido historicamente percebida tanto na imaginação popular quanto na prática médica como sendo em grande parte uma questão feminina. Enquanto as mulheres têm ginecologistas e obstetras, especialistas treinados em reprodução feminina, não há equivalente direto para os homens. Ademais, o que é ainda notável sobre a tecnologia de reprodução assistida, independente do país e cultura que ela é aplicada, é que mesmo quando o problema é referente a indivíduos do sexo masculino, é a mulher que é submetida aos primeiros procedimentos (INHORN, 2003).

No entanto, é extremamente importante ressaltar que a etiologia biológica da infertilidade não é exclusiva do trato reprodutivo feminino e as causas da diminuição da fertilidade nos homens são múltiplas (Figura 1 e 2) (IRVINE, 1998; TOURNAYE; KRAUSZ; OATES, 2017). Quanto ao sêmen, podemos citar algumas, tais quais: (1) baixa contagem de espermatozoides; (2) alterações na motilidade espermática; (3) morfologia anormal do espermatozoide; (4) alta contagem de espermatozoides com dano no acrossoma; (5) contagem aumentada de espermatozoides com baixa integridade do DNA; (6) baixa concentração de mitocôndrias funcionais e estresse oxidativo (7) irregularidades no pH do fluido seminal; (8) baixo volume total do ejaculado. É ainda plausível citar a disfunção erétil e/ou impotência como contribuinte da infertilidade

masculina, na qual a performance sexual masculina afeta o coito de ser finalizado ou mesmo de ser iniciado.

Figura 1. Ilustração representativa de espermatozoide humano e seus três principais segmentos, representados na imagem como (1) cabeça, região que está alocado o acrossoma e o núcleo dessa célula, (2) peça intermediária (P.I), aonde uma grande quantidade de mitocôndrias está presente e (3) flagelo, componente responsável pela motilidade do espermatozoide.

Figura 2. Alterações nos espermatozoides pode resultar em infertilidade. A causa da infertilidade masculina pode ser decorrente de alterações na função erétil, líquido seminal e/ou espermatozoides. Dentre as alterações presentes no gameta masculino, destacam-se como as principais a sua (1) baixa concentração, (2) motilidade alterada, (3) dano ao acrossoma (organela contendo enzimas essenciais à penetração do espermatozoide no oócito), (4) morfologia anormal, (5) baixa integridade do DNA e (6) alteração na atividade mitocondrial e aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem resultar em danos a proteínas e membranas.

Causas da infertilidade masculina

Embora algumas dessas alterações associadas a baixa fertilidade masculina sejam facilmente detectados por técnicas relativamente simples, a maioria das causas da infertilidade masculina permanece desconhecida (IRVINE, 1998). Além disso, por mais que avanços tecnológicos no campo de terapia reprodutiva tenham sido alcançados, diversos tratamentos para tentar melhorar a fertilidade masculina, abrangendo fármacos hormonais, para

disfunção erétil, correção cirúrgica e métodos de reprodução assistida, muitas vezes são ineficazes e de alto custo, restringindo o tratamento para uma diminuta parcela da população (DEVROEY et al., 1998; KAMISCHKE; NIESCHLAG, 1998). Nesse contexto, para grande parte dos integrantes do sexo masculino, é plausível dizer que a infertilidade tende a ser igualada a permanente incapacidade de conceber um descendente (INHORN, 2003), visto a complexidade de descobrir a gênese da infertilidade e os tratamentos que se tornaram elitizados e ineficazes (DEVROEY et al., 1998; KAMISCHKE; NIESCHLAG, 1998).

Até aqui, essa reflexão foi conduzida para situar brevemente que a fertilidade apresenta um componente sociocultural importante e que não apenas as mulheres, mas também os homens, contribuem para a infertilidade do casal, sendo esse último negligenciado por séculos. A cultura do patriarcado pode ter impactado na maneira como os homens cuidam de sua saúde. Curiosamente, na literatura biomédica também é refletida essa questão. O número de estudos na área de reprodução masculina, ao contrário da maioria das outras áreas das ciências biomédicas, encontra-se defasado quando comparados a saúde reprodutiva das mulheres o que pode ter deixado a questão da queda da fertilidade masculina em segundo plano até o momento (BEERY; ZUCKER, 2011).

1.2. Infertilidade masculina: um problema não reconhecido

Não é de hoje que a ideia da alteração nos padrões de fertilidade masculina vem sendo moldada. Essa concepção emergiu dos estudos prospectivos publicados no início dos anos 80, quando foi demonstrado a deterioração da qualidade do sêmen no decorrer dos anos (MENKVELD et al., 1986; MURATURE et al., 1987; OSSER; LIEDHOLM; RANSTAM, 1984). Em 1992, Carlsen e colaboradores publicaram uma meta-análise que continha 61 artigos referentes ao período de 1938 a 1991, no qual 14,947 homens sem histórico anterior de infertilidade foram avaliados em relação à concentração de espermatozoides e volume seminal. Foi demonstrado que entre 1940 a 1990 a concentração de espermatozoides caiu de 113 para $66 \times 10^6/\text{mL}$. Paralelamente, o volume seminal também reduziu de 3,40 para 2,75 mL nesse mesmo período.

Porém, esse estudo foi alvo de críticas em relação a ausência de controle de algumas variáveis que não haviam sido levadas em consideração, tais como: (1) a aderência aos dias de abstinência sexual antes da coleta do sêmen, (2) o método de coleta de sêmen, (3) a variabilidade nas técnicas analíticas e (4) a seleção do banco de dados para sua análise. Apenas 32 artigos analisados (~53% do total) continham informações sobre a duração da abstinência sexual (OLSEN et al., 1995). Em 2000, uma reanálise do artigo de Carlsen e colaboradores (1992) foi realizada (SWAN; ELKIN; FENSTER, 2000) utilizando melhor o controle das variáveis. Curiosamente, foi verificado maior declínio na concentração de espermatozoides por ano em relação a publicação inicial. Nos EUA a queda foi de 1,5% ao ano e na Europa/Austrália de 3% ao ano, valores maiores do que os encontrados em relação ao valor médio de 1% proposto por Carlsen e colaboradores (1992).

Ao longo dos anos resultados semelhantes foram reproduzidos em outros estudos feitos em vários países (SENGUPTA et al., 2018). Na França, Auger e colaboradores (1995) analisaram no período de aproximadamente 20 anos (1973 até 1992) o sêmen de 1351 homens saudáveis e férteis. Os principais resultados foram que a concentração espermática diminuiu de 89 para 60 milhões/mL (redução de 2,1%/ano), a porcentagem de espermatozoides moveis caiu 0,6% ao ano e a porcentagem de espermatozoides com morfologia normal caiu 0.5% ao ano. Na Escócia, Irvine e colaboradores (1996) observaram diminuição significativa na concentração espermática, número total de espermatozoide no ejaculado e de espermatozoides moveis em doadores nascidos entre 1970 e 1974 comparados com homens nascidos antes de 1959. Resultados similares também foram reportados em outros países como China, Israel, Itália e Brasil (ALMAGOR et al., 2003; BILOTTA; GUGLIELMO; STEFFÈ, 1999; BORGES et al., 2015; ZHANG; WANG; WANG, 1999).

Apesar dessa gama de estudos demonstrando o declínio na qualidade do sêmen em várias décadas e em diversos países, muitos deles são passíveis de críticas, o que tornou controverso esse assunto. As principais referem-se as limitações técnicas e de delineamento do projeto, aonde muitas vezes os estudos não apresentaram e/ou padronizaram o tempo de abstinência sexual para a realização da coleta do sêmen. Além disso em alguns deles o sêmen era provindo de clínicas de fertilidade, aonde não era verificado se os doadores

tinham problemas de fertilidade. Outro ponto importante foi que muitos estudos analisaram apenas a contagem de espermatozoides, sendo que outro importante fator associado a probabilidade de gravidez é independente da concentração espermática é a proporção de espermatozoides com morfologia normal no ejaculado (MERZENICH; ZEEB; BLETTNER, 2010; OLSEN et al., 1995).

Contudo, com a recente publicação de Levine e colaboradores (2017) existem dados substanciais de que a queda na concentração espermática esteja de fato acontecendo de forma rápida e progressiva. Essa foi a primeira revisão sistemática e com análise de meta-regressão das tendências temporais na contagem de espermatozoides que analisa também dados mais recentes. Foi observado que entre 1973 e 2011, a concentração espermática em homens férteis dos países ocidentais caiu de 99 para 47 milhões/mL e a contagem total de espermatozoides foi de 338 para 138 milhões (Figura 3C).

Tendo esses dados expostos, foi então discutida novamente a questão quanto a potencial crise envolvendo a fertilidade masculina (MERZENICH; ZEEB; BLETTNER, 2010). Porém, referir-se a isso como uma *crise* tornou-se alvo de debate. É sabido que a contagem de espermatozoides está intimamente ligada ao potencial reprodutivo masculino (Figura 3). Até certo ponto as chances de engravidar aumentam à medida que a contagem de espermatozoides do parceiro aumenta. A probabilidade de concepção ascende exponencialmente com o aumento da concentração de espermatozoides até o valor aproximado de 40 milhões de espermatozoides/mL (BONDE et al., 1998). Homens com diagnóstico de azoospermia ou com baixa contagem de espermatozoides (>15 milhões de espermatozoides/mL) possuem menor probabilidade de se tornarem pais biológicos do que homens com maiores concentrações de espermatozoides no ejaculado, principalmente se não procurarem a assistência de tecnologias de reprodução como, por exemplo, a injeção intracitoplasmática de espermatozoides coletados diretamente do epidídimo ou testículo. Porém, sabendo que em 2011 a concentração espermática de homens férteis era de aproximadamente 47 milhões/mL (LEVINE et al., 2017), temos que o atual valor ainda está ligeiramente acima da faixa limítrofe para que a probabilidade de gravidez não inicie a declinar exponencialmente e por isso a discussão acerca da palavra crise continua em pauta.

Conquanto, relacionar a potencial crise referente a qualidade do sêmen apenas ao aspecto de fertilidade é uma visão simplória e diminuta. É importante analisar as causas que estão propiciando esse fenômeno e o que isso reflete. Temos que a diminuição da qualidade do sêmen antevê maior mortalidade e morbidade (EISENBERG et al., 2014), relacionando-se também paralelamente ao conceito de saúde masculina. Em um estudo coorte com aproximadamente 4712 homens dinamarqueses acompanhados por quase 33 anos, foi observado a relação dose-resposta entre bons aspectos do sêmen e subsequente redução na mortalidade. Nesse estudo, foi observado que a mortalidade diminuía à medida que a porcentagem de espermatozoides com morfologia normal e móveis aumentava. A mortalidade também diminuiu conforme a concentração de espermatozoides aumentava até um limiar de 40 milhões/mL. Outro achado foi a associação entre concentração espermática abaixo de 15 milhões/mL e doenças cardiovasculares, quando comparados com homens que possuíam concentração acima de 40 milhões/mL (LATIF et al., 2017). Sendo assim, é dito que a qualidade do sêmen é um importante biomarcador da saúde global do homem e a fertilidade masculina tornou-se uma questão de saúde pública que necessita de atenção e vai além apenas do potencial reprodutivo.

Figura 3. Contagem espermática e fertilidade. No lado esquerdo foram ilustrados dois importantes fatores (A e B) determinantes da concentração espermática em um homem. No lado direito foi mostrado as alterações temporais na concentração de espermatozoides de homens ocidentais entre 1973 e 2011 (C) e a relação entre esse fator e fertilidade (D).

Os dados foram adaptados das seguintes referências: A (NEAVES et al., 1984), 1984), B (CARLSEN et al., 2004), C (LEVINE et al., 2017) e D (BONDE et al., 1998). [concentração]: concentração de espermatozoides; %: porcentagem.

De fato, alterações em diversos aspectos relacionados à qualidade dos espermatozoides foram associadas a influências ambientais e ao estilo de vida. De um lado, podemos citar como contribuintes para a alteração na qualidade do sêmen as alterações ambientais e as mudanças no estilo de vida da sociedade que incluem poluição (LAO et al., 2018), aumento no uso de pesticidas (CHIU et al., 2016), o efeito do calor (ZHANG et al., 2015), ação de desreguladores

endócrinos (BLOOM et al., 2015), uso de dispositivos wireless (YILDIRIM et al., 2015), abuso de anabolizantes (JANNATIFAR et al., 2015), tabagismo (SHARMA et al., 2016), estresse (NORDKAP et al., 2016), dieta (JENSEN et al., 2013) e consequentemente obesidade (SERMONDADE et al., 2013). Porém, não é plausível dizer que somente esses fatores abranjam todos os casos de baixa qualidade seminal em humanos. Se o declínio devido aos fatores ambientais é factível, pode-se pensar que isso esteja afetando outros animais além dos humanos. Entretanto, pelo menos para grupos de animais de criação analisados entre 1932 e 1995, essa diminuição não foi observada (SETCHELL, 1997). Sendo assim, é possível pensar que se a queda em humanos realmente estiver acontecendo, deve estar relacionado então a algo específico para esta espécie ou a somatória de fatores aquém da questão ambiental.

Paralelamente a isso, temos também que homens com baixa contagem de espermatozoides são mais propensos a terem concomitantemente outras doenças, como câncer ou diabetes por exemplo. Em 2014, Eisenberg e colaboradores observaram a relação entre algumas comorbidades médicas e aumento na taxa de anormalidades no sêmen. O que chamou a atenção foi de que nesse estudo as doenças do sistema circulatório, em especial a hipertensão arterial sistêmica, estavam relacionadas a alta taxa de anormalidades nos espermatozoides (EISENBERG et al., 2014). A relação entre hipertensão arterial e reprodução é pouco estudado até o momento. Em um dos raros estudos, (MUCIACCIA et al., 2012) já havia demonstrado em uma pequena coorte de pacientes hipertensos alterações na morfologia e integridade do DNA nos espermatozoides desses homens. Porém, o estudo, além de pequeno, não separava indivíduos que estavam recebendo tratamento farmacológico para hipertensão arterial (HA). Isso dificultou a real conclusão, visto que vários fármacos anti-hipertensivos afetam a qualidade do sêmen, o que aumenta ainda mais a complexidade de se estudar o efeito da hipertensão na reprodução masculina.

Atualmente, aproximadamente 700 milhões de homens em idade reprodutiva são hipertensos e a prevalência de hipertensão em crianças e adolescentes vem aumentando. Isso, aliado ao fato de a população estar envelhecendo pode resultar em maior chance de tornar o número de homens

com valores pressóricos elevados muito maior (MILLS et al., 2016) e ser um dos possíveis contribuintes para a diminuição da qualidade do sêmen.

1.3. Por que estudar hipertensão arterial e qualidade do sêmen?

A hipertensão arterial é uma doença crônica com elevada incidência no mundo, usualmente assintomática e com diagnóstico tardio em muitos casos. Popularmente conhecida como pressão alta, é uma doença definida pelos valores elevados e sustentados de pressão arterial (PA), tendo como referência valores de pressão arterial sistólica (PAS) ≥ 140 mmHg e/ou diastólica (PAD) ≥ 90 mmHg (BENJAMIN et al., 2017; CHOCKALINGAM; CAMPBELL; FODOR, 2006; MILLS et al., 2016). A definição e as categorias de hipertensão têm evoluído ao longo dos anos, mas existe um consenso que leituras persistentes de pressão arterial de 140/90 mmHg ou mais devem ser submetidas a tratamentos com alvo terapêutico usual de pelo menos 130/80 mmHg ou menos (WHELTON et al., 2018). Entretanto, em 2018 as diretrizes da Sociedade Europeia de Cardiologia/Sociedade Europeia de Hipertensão definiram os valores de pressão arterial em: *ótimo* - PAS menor que 120mmHg e PAD menor que 80mmHg; *normal* - PAS 120 a 129mmHg e/ou PAD 80 a 84mmHg; *normal elevado* - PAS de 130 a 139 mmHg e/ou PAD de 85 a 89 mmHg; *hipertensão grau 1* - PAS 140 a 159 mmHg e/ou PAD 90 a 99 mmHg; *hipertensão grau 2* - PAS 160 a 179mmHg e/ou PAD 100 a 109mmHg; *hipertensão grau 3* - PAS maior ou igual a 180mmHg e/ou PAD maior ou igual a 110mmHg (WILLIAMS et al., 2019). Curiosamente, nas sociedades pré-industriais, os valores pressóricos eram valores médios que pouco variavam com a idade e tinham uma média de 115/75 mmHg, valor que pode representar níveis normais e/ou ideal de pressão arterial para a espécie humana (PAGE; DAMON; MOELLERING, 1974).

Sabe-se que mais de um bilhão de adultos em todo o mundo são hipertensos, sendo aproximadamente 31% da população adulta portadora dessa doença (CHOCKALINGAM; CAMPBELL; FODOR, 2006; MILLS et al., 2016). Porém, a hipertensão arterial não é uma doença exclusiva dessa faixa etária. Estima-se que 4% das crianças e adolescentes brasileiros sejam hipertensos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A alta prevalência da doença é consistente em todos os estratos socioeconômicos e de renda, e a prevalência aumenta com a idade, representando até 60% da população acima de 60 anos de idade (LAW; FROST; WALD, 1991). A manifestação da doença de maneira não controlada aumentou aproximadamente 400 milhões entre 1980 e 2008, devido principalmente ao crescimento populacional e ao envelhecimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Além disso, a velocidade de mudança na prevalência da hipertensão entre o período de 2000 a 2010 foi muito mais rápida do que nas demais transições epidemiológicas (MILLS et al., 2016).

Cerca de 90-95% dos pacientes hipertensos têm hipertensão essencial (ou primária) altamente heterogênea com etiologia multifatorial de relação gene-ambiente. Um histórico familiar positivo é uma ocorrência frequente em pacientes com hipertensão, com a heritabilidade estimada entre 35% e 50% na maioria dos estudos (FAGARD et al., 1995; LUFT, 2001). Estudos de associação genômica ampla, no qual é analisado as variações na sequência do DNA em todo o genoma, identificaram aproximadamente 120 loci associados à regulação da pressão sanguínea (EHRET et al., 2016; LIU et al., 2016; SURENDRAN et al., 2016). Os outros casos em que a hipertensão é consequência de uma causa identificável, são denominados como secundária, exemplificado na doença parenquimatosa renal, estenose da artéria renal, aldosteronismo primário, feocromocitoma e síndrome de Cushing (BENJAMIN et al., 2017).

A pressão arterial é determinada pela somatória de vários aspectos do sistema cardiovascular, que inclui o volume sanguíneo e o débito cardíaco, bem como o equilíbrio do tônus arterial, que é afetado pelo volume intravascular e pelos sistemas neuro-humorais. A manutenção dos níveis pressóricos em uma faixa fisiológica envolve a interação complexa entre vários elementos de um sistema neurohumoral integrado que inclui o sistema renina-angiotensina-aldosterona, os peptídeos natriuréticos e do endotélio, o sistema nervoso simpático e sistema imunológico. O incorreto funcionamento ou interrupção de pelo menos um dos fatores envolvidos no controle da pressão arterial, em qualquer componente deste sistema neuro-humoral integrado, pode levar ao aumento da pressão arterial, ao longo do tempo, resultando em danos a órgãos-alvo (por exemplo, hipertrofia ventricular esquerda e doença renal crônica) (BOLÍVAR, 2013).

O tratamento para a hipertensão pode ser dividido em manejo não farmacológico e farmacoterapia anti-hipertensiva. No primeiro caso, é aconselhado utilizar de estratégias acerca do estilo de vida, no qual é válido para todos os pacientes com hipertensão. As intervenções mais eficazes são as mesmas utilizadas para a prevenção da hipertensão. Abordagens dietéticas direcionadas, por exemplo, podem reduzir a pressão arterial sistólica em indivíduos com hipertensão. Nessa parte, podemos incluir a redução a ingestão de sódio, aumento na ingestão de potássio, consumo moderado de álcool, atividades físicas e perda de massa corpórea. Quanto a terapia farmacológica, tipicamente o tratamento anti-hipertensivo começa com a primeira linha de medicamentos anti-hipertensivos, seja como monoterapia ou em combinação. A primeira linha inclui inibidores da enzima conversora de angiotensina, bloqueadores dos receptores de angiotensina II, bloqueadores dos canais de cálcio dihidropiridínicos e diuréticos tiazídicos. Os bloqueadores de receptores adrenérgicos β também são indicados em pacientes com insuficiência cardíaca com fração de ejeção do ventrículo esquerdo reduzida ou pós-infarto do miocárdio, e algumas diretrizes recomendam bloqueadores beta-adrenérgicos como medicamentos anti-hipertensivos de primeira linha (JAMES et al., 2014).

A hipertensão arterial se não for controlada pode levar a uma série de complicações. É plausível citar algumas como a doença arterial coronariana, infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico, insuficiência renal, doença arterial periférica, fibrilação atrial, aneurisma de aorta e até mesmo a morte (LEWINGTON et al., 2002; RAPSOMANIKI et al., 2014). As complicações são devidas aos danos sistêmicos que a hipertensão causa. O aumento da pressão arterial induz a constante lesão dos órgãos-alvo por aumento de carga hemodinâmica. Além dessa elevada carga de pressão, uma multiplicidade de fatores contribuintes e independentes da carga pressórica em si foram identificados, afetando a severidade do dano aos órgãos-alvo. Importantes fatores que podem ser influenciados incluem o sistema nervoso simpático e o sistema renina-angiotensina, assim como os fatores metabólicos e inflamatórios (SCHMIEDER, 2005, 2010; SCHMIEDER et al., 1996)

A hipertensão arterial pode induzir a várias complicações devido às alterações macro e microestruturais e funcionais dos órgãos. É sabido que a pressão sanguínea é o produto da resistência periférica total e do débito

cardíaco. Na hipertensão arterial existe o aumento da resistência vascular periférica sendo a microcirculação, com enfoque nas artérias terminais e as arteríolas, o sítio mais importante na geração dessa resistência (LEVY et al., 2001; MILLS et al., 2016). A microcirculação inclui arteríolas, capilares e vênulas com menos de 150 μ M de diâmetro. Também são englobados nessa definição vasos arteriais que respondem ao aumento de pressão por meio de uma redução miogênica no diâmetro da luz, mesmo se tiverem mais do que 150 μ M. Quando estabelecido o processo hipertensivo, são observadas alterações morfofisiológicas nos vasos sanguíneos da microcirculação que acarretam o aumento da resistência ao fluxo sanguíneo, levando a manutenção da hipertensão arterial (LEVY et al., 2001).

Dentre as principais alterações temos a hipertrofia, hiperplasia e remodelamento da túnica média, formada de músculo liso, rarefação de arteríolas e capilares e alteração nos mecanismos que regulam o tônus vascular, por exemplo, aumento da atividade e sensibilidade simpática em arteríolas, resultando em vasoconstrição ativa (FEIHL et al., 2006; FEIHL; LIAUDET; WAEBER, 2009; PRIES; SECOMB, 2014). Além disso, é observado também na microcirculação o aumento da expressão de moléculas de adesão nos vasos sanguíneos e aumento na concentração de citocinas pró-inflamatórias, sendo a hipertensão atualmente associada a uma inflamação crônica de baixa intensidade (GHANEM; MOVAHED, 2007; PAULETTO; RATTAZZI, 2006).

Em relação ao efeito da hipertensão na reprodução pouco é sabido. Quanto a modificações em órgãos reprodutivos, alterações na microcirculação testicular foram observadas em modelos experimentais de hipertensão arterial. A maioria dos estudos nessa área foram realizados em ratos espontaneamente hipertensos propensos ao acidente vascular encefálico (SHR-SP), que possui hipertensão arterial severa, e alguns raros em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), o modelo experimental mais utilizado para se estudar a fisiopatologia da hipertensão arterial e suas complicações.

Foi demonstrada alta incidência de modificações vasculares nos testículos (75%), cérebro (86%) e rins (87%) de SHR-SP com até 71 semanas de idade (SUZUKI, T., 1979). De fato, estudos nessa linhagem com hipertensão arterial mais severa demonstraram haver alterações vasculares em arteríolas testiculares. Nesses vasos sanguíneos as principais observações foram

espessamento da íntima, necrose fibrinóide e hialinose arteriolar (AKAGASHI et al., 1996; SAITO et al., 1995). Também foi demonstrado que existe hipertrofia testicular quando comparados a ratos normotensos Wistar Kyoto (WKY) (BELANGER et al., 2003). Suzuki (1979) demonstrou aumento na proporção massa testicular/massa corpórea em SHR-SP com aproximadamente 21 semanas de idade e após esse período essa razão diminuiu até o ponto em que esse valor ficou abaixo da proporção encontrada nos WKY.

Akagashi e colaboradores (1996) demonstraram que com o envelhecimento dos SHR-SP houve aumento na quantidade de arteríolas testiculares com tais alterações (11 semanas: 4,4%; 23 semanas: 36,4%), ocorrência não observada em seu controle normotenso WKY (11 semanas: 3,4%; 23 semanas: 4,7%). Ao mesmo tempo em que a incidência dessas alterações aumentou expressivamente com o envelhecimento, a concentração testicular de transferrina -carreador glicoprotéico de ferro, amplamente secretado pelas células de Sertoli, que serve como indicador funcional desse tipo celular diminuiu nesses mesmos ratos. Não obstante essas alterações vasculares no testículo de SHR-SP já aparecerem a partir da 15ª semana de vida, alterações na espermatogênese ficaram mais evidentes nesses animais apenas com 23 semanas de idade. Nesse período é observado atrofia de aproximadamente 62% dos túbulos seminíferos e hipoespermatogênese nos mesmos. Tais modificações são menos severas em SHR. Bechara e colaboradores (2015) demonstraram em SHR de 28 semanas de idade aumento da densidade vascular, redução na espessura do epitélio germinativo e na concentração de espermatozoides coletados da cauda do epidídimo.

Interessantemente, Pinilla e colaboradores (1992) demonstraram que fêmeas SHR acasaladas com machos de mesma linhagem possuem diminuição na porcentagem de prenhez bem-sucedida (69% vs 86% em WKY) e diminuição na quantidade de recém-nascidos por fêmea prenhe. Por outro lado, quando as SHR foram acasaladas com machos Wistar ou WKY, a porcentagem de prenhez aumentou em até 95%. Corroborando com estes dados, quando fêmeas Wistar ou WKY foram acasaladas com machos SHR, elas mostraram diminuição na porcentagem de prenhez. Isso demonstra que o sexo masculino parece ser decisivo na fertilidade da linhagem de SHR.

Porém, mesmo com os dados apresentados acima, a literatura acerca de hipertensão, ou mesmo doenças cardiovasculares em geral e fertilidade masculina é escassa. Alguns estudos em modelos animais de hipertensão arterial foram desenvolvidos e demonstraram alterações histológicas focando basicamente em analisar a morfologia testicular desses animais e quase nenhum dado relacionado a característica dos espermatozoides foi descrita. Isso dificulta uma possível relação entre os achados clínicos nos espermatozoides de pacientes hipertensos e as alterações histológicas no testículo de modelos experimentais de hipertensão arterial. Além disso, por mais que as alterações da hipertensão arterial a diversos órgãos alvo como coração, rins e encéfalo estão sendo constantemente caracterizadas, poucos estudaram os mecanismos e seu efeito em órgãos reprodutivos masculino.

2. OBJETIVOS

Visto que a(s) I) hipertensão arterial pode induzir alterações morfofisiológicas de vários órgãos e consequentemente modificações nas suas funções, II) alterações morfológicas na microcirculação testicular foram observadas em modelos experimentais de hipertensão arterial e III) foram relatadas em estudos observacionais algumas alterações na qualidade dos espermatozoides de pacientes hipertensos. Esse estudo tem como objetivos *avaliar o efeito da hipertensão arterial no testículo e na qualidade dos espermatozoides em ratos adultos espontaneamente hipertensos e controles normotensos Wistar e elucidar o (s) provável(is) mecanismo(s) de ação associado(s) a esse efeito.*

Para isso, os objetivos específicos foram avaliar:

- As características hemodinâmicas tais quais pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca. Também avaliar a vasomotricidade testicular *in vivo* por meio da verificação do fluxo da microcirculação arteriolar testicular de machos SHR e Wistar de 24-26 semanas de idade.
- A morfologia e morfometria testicular por meio de análise histológica testicular de machos SHR e Wistar de 24-26 semanas de idade.
- A adesão leucocitária *in vivo* em vênulas testiculares de machos SHR e Wistar de 24-26 semanas de idade.
- A expressão de proteínas de interesse por meio da técnica de *Western Blotting* no testículo de machos SHR e Wistar de 24-26 semanas de idade.
- A qualidade dos espermatozoides tais quais morfologia, motilidade, integridade do acrossoma, atividade das espécies reativas de oxigênio (EROs), atividade mitocondrial, fragmentação de DNA e concentração espermática dos espermatozoides retirados da cauda do epidídimo de machos SHR e Wistar de 24-26 semanas de idade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e controles normotensos Wistar do sexo masculino com 10 semanas de idade foram obtidos da colônia de animais livre de patógenos do Biotério de produção de ratos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) e alojados até 24-26ª semana de idade no Biotério do Departamento de Farmacologia (unidade I) em ciclo claro-escuro 12:12 horas em ambiente com umidade e temperatura controlada (22 ± 2 ° C) com acesso livre à água de torneira e alimento. O protocolo experimental seguiu as regras do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso e Cuidado de Animais da Universidade de São Paulo (Número de registro 134/2016, CEUA-ICB / USP).

3.2. Aferição da pressão arterial em ratos

3.2.1. Pressão arterial caudal

A pressão arterial caudal de todos os animais utilizados no projeto de ambas as linhagens (SHR e Wistar) foram determinadas por meio do método indireto de pletismografia de cauda (pneumatic transducer, Power Lab 4/S, AD Instruments Pty Ltd) após os ratos de 10 semanas de idade serem alojados no Biotério do Departamento de Farmacologia. A pressão arterial dos ratos foi aferida em duas ocasiões – 1) após período de adaptação de no mínimo duas semanas de estadia no Biotério do Departamento de Farmacologia; 2) antes dos procedimentos experimentais. Para tal, os ratos inicialmente foram aquecidos a uma temperatura média de 40 °C durante cinco minutos e colocados em cilindro de contenção com abertura para a cauda e focinho. Posteriormente um oclisor e um sensor de pulso foram colocados na porção proximal da cauda dos ratos e acoplados ao esfigmomanômetro conectado ao sistema de transdução de sinal PowerLab/4S (ADInstruments, Nova Gales do Sul, Austrália). A pressão arterial

foi definida como o momento em que um pulso definitivo poderia ser detectado. Os resultados foram calculados como a média de três a cinco medidas consecutivas e expressas em milímetros de mercúrio (mmHg). Foi tomado cuidado ao selecionar o tamanho adequado de manguito para cada animal e o experimento foi conduzido em uma sala isolada e silenciosa. Foram selecionados como animais hipertensos aqueles SHR que apresentaram pressão arterial caudal ≥ 140 mmHg e como normotenso os Wistar que apresentaram valores pressóricos ≤ 125 mmHg e em todos os experimentos realizados, foram utilizados SHR e Wistar machos com 24-26 semanas de idade.

3.2.2. Pressão arterial direta

Os ratos SHR e Wistar foram anestesiados com mistura de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) (Agener União, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil, e Ceva Santé Animale, Paulínia, São Paulo, Brasil, respectivamente) administrada por via intraperitoneal e em seguida um cateter de polietileno heparinizado (PE-50) foi inserido na artéria carótida direita dos animais. Após o período de recuperação de 24 horas, a pressão arterial sistólica, a pressão arterial diastólica e a frequência cardíaca foram aferidas em animais conscientes por meio de um transdutor de pressão (Deltran DT-100; Utah Medical Products, Estados Unidos) e registradas usando software para aquisição de dados (Quad Bridge Amp/PowerLab 4/30; AD Instruments, Melbourne, VIC, Austrália). O experimento foi conduzido em sala isolada e silenciosa. A pressão arterial média (PAM) foi calculada por meio da fórmula: $PAM = 1/3 \text{ da PAS} + 2/3 \text{ da PAD}$.

3.3. Rotina histológica para análise morfológica e morfométrica do testículo

A massa corpórea dos animais foi avaliada individualmente e em seguida os ratos foram induzidos à morte por meio de dose excessiva do anestésico tiopental sódico (50 mg/kg) por via intraperitoneal. Os testículos e o coração foram removidos rapidamente e as massas relativas obtidas [g%]; massa do órgão dividida pela massa corpórea $\times 100$]. Em seguida, os testículos foram

imersos em fixador de Davidson modificado (30% de solução 37–40% de formaldeído, 15% etanol, 5% ácido acético glacial e 50% água destilada) (LATENDRESSE., 2002). Após algumas horas do processo de fixação, realizou-se uma incisão transversal na parede testicular, resultando no rompimento da túnica albugínea que permitiu a penetração profunda do agente fixador no parênquima gonadal. Em seguida, o material foi desidratado em soluções crescentes de álcool etílico, diafanizado em xilol, incluído em Paraplast (Oxford-Labware, USA) e as secções de 5 µm de espessura foram coradas por meio da técnica de hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram montadas com lamínulas, utilizando-se como meio de adesão o Entelan (Merk, Germany). As secções histológicas foram analisadas em microscópio óptico Zeiss Primo Star, com diferentes objetivas.

Na análise morfológica dos testículos foram considerados os seguintes parâmetros: aparência da túnica albugínea, tecido intersticial e estrutura tubular seminífera; linhagem e morfologia das células germinativas e células de Sertoli; presença ou ausência de gametas na luz tubular; morfologia das células de Leydig. Para o estudo morfométrico (Figura 4), 20 secções transversais dos túbulos seminíferos de cada testículo foram escolhidas aleatoriamente para a medida da área tubular, altura do epitélio germinativo, área luminal e diâmetro tubular. As pranchas histológicas foram preparadas através da captação das imagens realizadas em microscópio óptico Zeiss modelo Scope A1-Axio, com sistema de captura composto por câmera de vídeo acoplada ao sistema digitalizador de imagens Axio Vision versão 4.7.2.

Figura 4. *Figura representativa da análise morfológica e morfométrica do testículo.* Para a avaliação da morfologia testicular, foram considerados o interstício (representado em roxo) e os túbulos seminíferos (representado em azul). Para a avaliação morfométrica, foram considerados apenas os túbulos seminíferos, aonde foram mensurados a altura do epitélio germinativo, área e diâmetro tubular e o diâmetro da luz (representado pelos valores dentro dos túbulos). Interstício – i; túbulo seminífero – ts.

3.4. Microscopia intravital

3.4.1. Preparação cirúrgica

Os ratos SHR e Wistar foram anestesiados com mistura de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) (Agener União, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil, e Ceva Santé Animale, Paulínia, São Paulo, Brasil, respectivamente) administradas por via intraperitoneal. Para a observação dos vasos sanguíneos foi inserido na veia femoral um tubo de poliéster (PE/3, Scientific Commodities, Lake Havasu City, Arizona, EUA) para administração de isotiocianato de fluoresceína (FITC)-dextrana (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Posteriormente, os ratos foram colocados em uma placa especial com temperatura estabilizada à 37 °C. O testículo esquerdo foi exteriorizado e mantido úmido com solução Ringer-Locke (mmol/L) de: 154,0 NaCl, 5,6 KCl, 2,0 CaCl₂, 2H₂O, 6,0 NaHCO₃, 5,0 glicose, 0,1 ácido ascórbico, com pH 7,4 e

aquecida à 37°C. Uma película de plástico transparente foi disposta sobre o tecido para evitar a secagem durante o tempo de estabilização da preparação que foi mantido por 10 minutos. Uma câmera foi acoplada em um microscópio trinocular para facilitar a observação das imagens ampliadas (400x) na tela do computador e posteriormente gravadas. As medições do diâmetro do vaso sanguíneo foram realizadas com software Leica IM50 *image manager* (Heerbrugg, Suíça). Os vasos sanguíneos selecionados para estudo foram arteríolas com diâmetros de 20 a 30 μm . As características da microcirculação permaneceram basicamente estáveis ao longo do experimento.

3.4.2. Análise da vasomotricidade testicular por meio do estudo da frequência de parada de fluxo sanguíneo em arteríolas testiculares

Para avaliar a vasomotricidade testicular, foi mensurada a parada de fluxo sanguíneo completa em arteríolas testiculares num período de um minuto a qual foi expressa em frequência - ciclos por minuto. Nesse estudo a parada completa do fluxo sanguíneo foi considerada tanto na condição basal quanto após estímulos com vasoconstritores, tais como $1,4 \times 10^{-7}$ M de norepinefrina ou $1,4 \times 10^{-9}$ M de angiotensina II, aplicada topicamente no tecido (volume final de 30 microlitros). Em um grupo de ratos foi aplicado também 3×10^{-7} M de prazosina, um antagonista do receptor α_1 -adrenérgico ou solução salina aplicados topicamente um minuto após a instilação de norepinefrina e a frequência foi contabilizada após a aplicação de prazosina.

3.4.3. Adesão leucocitária em vênulas testiculares

Foram quantificados leucócitos aderidos às vênulas pós-capilares (20-40 μm de diâmetro) testiculares e mesentéricas de Wistar e SHR em condições basais ou após 10 minutos de estímulo com lipopolissacarídeo (LPS) (750 $\mu\text{g/mL}$) ou leucotrieno B₄ (LTB₄) (10^{-9} M). A preparação do testículo foi semelhante à descrita para o estudo da parada de fluxo sanguíneo. Para utilização da preparação do leito mesentérico venular, realizou-se uma incisão longitudinal de 3 cm na pele e músculo na porção ventro-lateral direita do

abdômen dos ratos. Em seguida, o mesentério foi exposto e colocado em placa aquecida à 37 °C. O agente fluorescente marcador de leucócitos (rodamina-6G 0,02%, Sigma-Aldrich) foi administrado por via endovenosa, previamente cateterizada. Foram consideradas aderidas as células que permaneceram por mais de 30 segundos fixas à parede vascular. Os resultados de aderência celular foram expressos como número de células por milímetro quadrado de superfície de vênula, calculado a partir do diâmetro e do comprimento venular, assumindo a geometria cilíndrica do vaso sanguíneo.

3.5. Expressão proteica por Western Blotting

Foram avaliadas a expressão proteica de proteínas-alvo relacionadas a hipóxia, tais quais o fator induzível por hipóxia 1 α (HIF-1 α) e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) providas do testículo de SHR e Wistar machos de 24-26 semanas de idade. Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg/intraperitoneal, Thiopentax®, Cristália, São Paulo, Brasil) e rapidamente uma incisão de aproximadamente dois centímetros foi realizada na bolsa escrotal dos animais, os testículos exteriorizados, removidos, dissecados e congelados instantaneamente em nitrogênio líquido. Sequencialmente, o órgão foi pulverizado em gral e pistilo de porcelana, homogeneizado e incubado por 30 minutos em 50 μ l de tampão de lise gelado contendo 10% de RIPA Lysis Buffer [10 x (0.5M Tris-HCl, pH 7.4, 1.5M NaCl, 2.5% deoxycholic acid, 10% NP-40, 10mM EDTA) 20-188, Merk Millipore, Massachusetts, Estados Unidos], 90% de água destilada, 1 mM de PMSF, 10 mM de ortovanadato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de pirofosfato de sódio e 0,2% de inibidor de protease (P8340, Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos).

Os extratos teciduais foram centrifugados a 12000 G mantidos a 4 °C por 30 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e utilizado para quantificação do conteúdo proteico total, utilizando o método de BCA (ácido bicinconínico, #23227 Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Posteriormente, as amostras foram tratadas com tampão de Laemmli (1:1, #1610737, Bio-Rad, São Paulo, Brasil) contendo ditiotreitol, 350 mM (DTT) e aquecidas a 99 °C em

termobloco por cinco minutos. Foram utilizados 70 µg de proteína de cada amostra para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE 10% ou 15%) em aparelho para minigel (BioRad, Hercules, EUA) a 100 volts. Em cada gel foi aplicado também um marcador com peso molecular com valores estabelecidos. As proteínas foram então transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,45 µm e o carregamento foi avaliado por coloração com Ponceau. As membranas foram então bloqueadas com solução de bloqueio (albumina de soro bovino a 3% em tampão TTBS-Tris, pH 7,6, contendo 20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl e Tween 20 a 0,1%) durante 2 horas na temperatura ambiente, seguido de incubação com anticorpos primários específicos em solução de bloqueio Anti-HIF-1α 1: 1000, (# 3716, Cell Signaling Technology] ou de anti-VEGF1: 500 (# 05-1117, Millipore)] durante 16 horas a 4 °C sob agitação constante. As membranas foram então lavadas com solução tampão (TBS-T) por três vezes (10 minutos cada) em temperatura ambiente e depois incubadas com anticorpos secundários apropriados de coelho {[Rabbit (1:2000, 111-035-144) e de camundongo [Mouse (1: 2000, 115-035-166)] Jackson ImmunoResearch} durante 2 horas à temperatura ambiente. As membranas foram reveladas com quimioluminescência (Pierce® ECL Western Blot Substrato, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) em um sistema de imagem molecular Carestream (Gel Logic 2200 PRO, Carestream Health, Nova York, EUA) e quantificadas por densitometria utilizando do programa ImageJ Launcher (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Estados Unidos). A normalização das amostras foi realizada utilizando-se o *ponceau* e os valores foram então expressos em unidade arbitrária (UA).

3.6. Análise funcional dos espermatozoides

Imediatamente após a indução de morte dos animais pela administração de dose excessiva do anestésico tiopental sódico (50 mg/kg), via intraperitoneal, os epidídimos foram removidos. Em seguida, foi realizada incisão na porção caudal de ambos os epidídimos os quais foram imersos em 2 mL de meio Biggers-Whitten-Whittingham (BWW) pré-aquecido e mantido à 37° C durante 5 minutos. Essa incisão permitiu que os espermatozoides fluíssem para esse meio.

Posteriormente, os espermatozoides foram utilizados para avaliar a atividade mitocondrial e das espécies reativas de oxigênio, integridade do acrossoma e do DNA, bem como sua morfologia, aspectos relacionados a motilidade e concentração (Figura 5).

3.6.1. Concentração, morfologia e motilidade dos espermatozoides

Para avaliação da concentração espermática, as amostras (espermatozoides diluídos em BWW) foram diluídas 1:20 (vol/vol) em água e 10 μL foram adicionados a cada lado da câmara de Neubauer. Os 25 quadrados centrais foram usados para contagem de espermatozoides, e o número total de espermatozoides contados foi multiplicado por 10×10^4 para calcular a altura da câmara, transformar em concentração por mL e explicar a diluição inicial. Se a diferença entre cada lado fosse superior a 5%, o procedimento era repetido, a fim de garantir a precisão.

Para análise da morfologia dos espermatozoides, foram preparados esfregaços e corados com hematoxilina-eosina. A análise foi realizada em microscopia de luz utilizando-se várias objetivas. Os espermatozoides foram classificados como normal (normotipo) ou anormal (teratospermia). Em pelo menos 10 campos diferentes, o total de 100 espermatozoides de cada animal foi examinado aleatoriamente.

As características relacionadas a motilidade foram avaliadas usando o sistema CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) (Sistema CASA; IVOS, v. 12, Hamilton Thorn Research, EUA). As configurações utilizadas foram as recomendadas pelo fabricante, sendo de 30 quadros com uma taxa de quadros de 60 quadros/segundo. Cada lâmina padrão (Leja, Holanda) foi pré-aquecida a 37°C ; 3 μL de amostra foram colocadas na lâmina. Foram selecionados para análise, na câmara de contagem, no mínimo cinco campos sendo que mil espermatozoides foram avaliados por amostra. As variáveis relacionadas à motilidade foram: velocidade média (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento cruzado (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

3.6.2. Atividade mitocondrial

A atividade mitocondrial foi avaliada pela coloração da peça intermediária dos espermatozoides, por meio do método baseado na oxidação, polimerização e deposição de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pelo citocromo c-oxidase em mitocôndrias ativas.

Primeiramente, a amostra foi diluída em uma solução de DAB 1 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato (PBS - 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄), em uma proporção de 1:1 a 1:5 (vol/vol) amostra/DAB, dependendo da concentração de espermatozoides da amostra e incubada em banho-maria a 37 °C no escuro, com o tubo aberto, durante 40 minutos. Dois esfregaços de 15 µL foram preparados em lâminas para microscópio. Após a secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram então fixadas em 10% de formaldeído (vol/vol) pelo período de 10 minutos em temperatura ambiente e deixado novamente para secar em temperatura ambiente.

As lâminas foram analisadas em microscópio Olympus BX-51 equipado com contraste de fase (Olympus, Japão). O total de 200 células por animal foi contado numa magnificação de 1.000x. As células foram classificadas como Classe I (100% da peça intermediária marcada – todas as mitocôndrias estavam ativas), Classe II (mais de 50% da parte intermediária marcada), Classe III (menos de 50% da parte intermediária marcada) ou Classe IV (Sem marcação da peça intermediária – mitocôndrias completamente inativas).

3.6.3. Integridade do acrossoma

A integridade do acrossoma do espermatozoide foi avaliada por meio da marcação com lecitina de amendoim (PNA) conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC - Sigma Aldrich) que se liga exclusivamente à membrana acrossomal externa. Dois esfregaços de 15 µL por amostra foram feitos em lâminas de microscópio, os quais foram deixados secar a temperatura ambiente, fixados em metanol durante 15 minutos e deixados para secar a temperatura ambiente. As lâminas foram então coradas com 60 mg/mL de FITC-PNA em PBS

durante 30 minutos no escuro e posteriormente lavadas com água Milli-Q para remover o *background*.

Para avaliação da integridade do acrossoma, duzentos espermatozoides por amostra foram analisados utilizando microscópio de epifluorescência OlympusBX-51 com filtros apropriados em magnificação de 1.000 x. Os espermatozoides foram classificados em acrossoma danificado ou acrossoma intacto.

3.6.4. *Determinação da atividade das espécies reativas de oxigênio intracelular (EROs)*

Para avaliar a atividade das espécies reativas de oxigênio intracelular, os espermatozoides foram incubados com dihidroetídio (DHE-D11347 - Life Technologies, EUA), sonda sensível ao ânion superóxido e amplamente utilizada. Este reagente é oxidado pelas espécies reativas de oxigênio em brometo de etídio, no qual é excitado a 518 nm e emite um comprimento de onda de 605 nm, produzindo uma fluorescência vermelha ao se ligar ao DNA da célula.

Foram incubados 10 µL de amostra de sêmen com 2 µM de DHE e 16,23 µM de Hoechst 33342 (H33342 - Sigma, St. Louis), ambos diluídos em PBS, na proporção de 1:1 (vol/vol) de amostra/DHE no escuro e a temperatura ambiente durante 15 minutos. Então, foi realizado um esfregaço das amostras coradas em lâminas de microscopia e 200 espermatozoides foram avaliados usando microscópio de epifluorescência Olympus BX51 (Olympus, Japão) equipado com filtro para DHE (518 nm-606 nm) e Hoescht (350 nm-461 nm), com uma magnificação de 1.000x. A porcentagem de espermatozoides positivos (corados com DHE) foi calculada para cada amostra.

3.6.5. *Análise da fragmentação de DNA por meio do Ensaio Cometa alcalino*

A fragmentação do DNA nuclear dos espermatozoides foi avaliada por eletroforese em gel de célula única, também denominado de Ensaio Cometa. Para isso, duas lâminas por amostra foram preparadas previamente com 1000 µL de agarose normal *melting point* (NMPA, GE Healthcare, Amersham Place, Reino Unido) 1% (p:vol) em TBE 0,1 M Tris (GE Healthcare, Amersham Place,

Reino Unido); 0,083 M ácido bórico; 0,001 M Na₂-EDTA (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, França). Em cada lâmina, foram adicionados 100 µL de uma alíquota de sêmen fresco diluído em agarose *low melting point* (LMPA, Life Technologies, Califórnia, EUA) 0,75% (p:vol) em TBE para uma concentração final de espermatozoides de 1x10⁶/mL de LMPA. As lâminas foram cobertas por lamínulas (Precision Glass Line, China) e mantidas a 4 °C para solidificar. Após dez minutos as lamínulas foram removidas e 300 µL de LMPA foram adicionados. Então, as lâminas foram cobertas por lamínulas novamente e mantidas por mais dez minutos a 4 °C.

Após a remoção das lamínulas, as lâminas foram cobertas com 1 mL de solução de lise gelada [100 mM Na₂-EDTA; 10 mM Tris; 2,5 M NaCl; 2% (vol:vol) Triton X-100; 4 mM ditioneitol – DTT (GE Healthcare, Amersham Place, Reino Unido); pH=11,0] e mantidas por uma hora a 4 °C. Após 1 hora as lâminas foram lavadas duas vezes com água Milli-Q, com intervalos de 5 minutos entre as lavagens. Após esse procedimento, as lâminas foram cobertas com 1 mL de solução de lise com proteinase K [100 mM Na₂-EDTA; 10 mM Tris; 2,5 M NaCl; 2% (vol:vol) Triton X-100; 4 mM ditioneitol – DTT (GE Healthcare, Amersham Place, Reino Unido); 10 µg/mL proteinase K; pH=11,0] em estufa a 50 °C por 2 horas e 30 minutos. Esse procedimento foi repetido a cada 30 minutos até estar completo com 2 horas e 30 minutos. As lâminas foram lavadas com água Milli-Q (2 x 5 minutos) e, em seguida, imersas em solução alcalina de eletroforese [300 mM NaOH (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, França); 1 mM Na₂-EDTA; pH>13,0], por vinte minutos.

A eletroforese foi realizada por vinte minutos a 1,5 V/cm e a uma intensidade de corrente máxima de 270 mA. Em seguida, as lâminas são lavadas com TBE (2 x 3 minutos) e fixadas (3 x 2 minutos) em etanol 100% (LabSynth, São Paulo, Brasil). Posteriormente, as lâminas foram coradas com solução de SYBR® Green (SYBR® Green II RNA gel stain, 10.000 vezes em DMSO) diluído 1:10.000 (vol:vol) em TBE por quarenta minutos. As lâminas então foram lavadas com TBE para remoção do *background*.

O total de 100 espermatozoides por animal foi observado no microscópio de epifluorescência Olympus BX-51 (Olympus, Japão), com filtro de excitação de 490 nm e emissão de 520 nm, em magnificação de 400 vezes (imersão) e divididas em classes de acordo com o grau de dano ao DNA observado pela

intensidade dos sinais fluorescentes da cauda e da cabeça dos espermatozoides:

Classe I – alta integridade do DNA dos espermatozoides (sem migração de DNA);

Classe II – baixa fragmentação de DNA dos espermatozoides (pouca migração de DNA);

Classe III – fragmentação de DNA dos espermatozoides aumentada (intenso sinal fluorescente na cauda do cometa e um núcleo observável);

Classe IV – alta fragmentação do DNA dos espermatozoides (uma intensa fluorescência na cauda dos espermatozoides e sem núcleo evidente).

Figura 5. Fotomicrografias representativas da classificação (A) da atividade mitocondrial em espermatozoides (baseado na oxidação, polimerização e deposição de 3,3'-diaminobenzidina pelo citocromo c-oxidase mitocondrial: classe I - 100% de atividade mitocondrial; classe II - mais de 50%; classe III - menor que 50%; classe IV - ausência de atividade mitocondrial. (B) Imagens representativas mostram a integridade do acrossomo, classificado em intacto ou danificado, avaliado por marcação com lecitina de amendoim (PNA) conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC-PNA) que se liga exclusivamente à membrana acrossomal externa. (C) Fotomicrografias representativas de espermatozoides com integridade de DNA alta (grau I) e inferior ou baixa (grau II). A fragmentação do DNA nuclear do esperma foi avaliada por eletroforese em gel de célula única modificada (ensaio cometa). Na estrutura do cometa, a cabeça, refere-se à parte nucleóide do DNA não danificada (representado na imagem como os segmentos mais condensados e intensos) e à cauda à linha de DNA danificada. (D) Imagens representativas que mostram núcleos de espermatozoides dihidroetidio-negativo (azul) e positivo (vermelho). O DHE é oxidado por espécies reativas de oxigênio em brometo de etídio que se liga ao DNA, emitindo fluorescência vermelha.

3.7. Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o software Graph Pad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de distribuição de Kolmogorov-Smirnov e para homogeneidade de variância foi utilizado o teste de Levene. As variáveis distribuídas na normalidade e homocedásticas foram comparadas utilizando teste de t de Student não pareado ou ANOVA 1 via, enquanto as variáveis sem distribuição normal foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. Os resultados foram apresentados como “média $\pm$ desvio padrão”. A significância estatística foi estabelecida com um erro alfa máximo de 5%. Para cada experimento, foram utilizados 4-7 animais por grupo.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização dos modelos experimentais: massa cardíaca, pressão arterial e frequência cardíaca em SHR e Wistar

A hipertensão arterial foi definida por valores de referência. Portanto foram adotados os valores da pressão arterial sistólica iguais ou maiores que 140 mmHg e aos da pressão arterial diastólica iguais ou maiores que 90 mmHg. Nesse estudo, a pressão arterial sistólica ($209,4 \pm 2,33$ e $126,1 \pm 3,06$, mmHg, respectivamente, $p < 0,0001$, $n=5$) e a diastólica ($165,9 \pm 3,65$ e $9,2 \pm 1,59$, mmHg, SHR e WT, respectivamente, $p < 0,0001$, $n=5$) foram significativamente maiores nos SHR quando comparadas as dos Wistar, resultando em maior pressão arterial média ($180,3 \pm 2,88$ e $105,5 \pm 1,83$, mmHg, SHR e WT, respectivamente, $p < 0,0001$, $n=5$) (Figura 6A). A frequência cardíaca aferida em animais conscientes também foi maior em SHR ($339,8 \pm 4,34$, bpm) do que em Wistar ($306,7 \pm 11,64$, bpm, $p < 0.001$, $n=5$) (Figura 6C). Ratos hipertensos de 24-26 semanas de idade apresentaram maior valor de massa cardíaca do que o do controle normotenso ($0,35 \pm 0,005$ e $0,25 \pm 0,2$, %, SHR e WT, respectivamente, $p = 0,005$) (Figura 6B).

Figura 6. Caracterização cardiovascular do modelo animal. (A) Pressão arterial sistólica, diastólica e média, (B) massa cardíaca relativa e (C) frequência cardíaca. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; teste t-student para comparação entre os grupos; * $p < 0,05$, diferença significativa em relação aos ratos normotensos Wistar; Ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

4.2. SHR apresentaram alterações morfológicas e morfométricas na microvasculatura testicular

SHR apresentaram maior massa testicular quando comparados ao do controle Wistar ($0,98 \pm 0,07$ e $0,83 \pm 0,05$ %, respectivamente, $p=0,01$, $n= 4-5$) (Figura 7E). Além disso, alterações na morfologia testicular de todos os animais hipertensos foram observadas tanto no interstício quanto nos túbulos seminíferos (Figura 7C e D). Entretanto, o grau dessas modificações variou entre esses animais. No grupo hipertenso, todos os animais ($n=5$) apresentaram aumento substancial na túnica adventícia das arteríolas testiculares (Figura 7C), independentemente de seu diâmetro. Esse resultado não foi encontrado em

nenhum rato normotenso avaliado. Foi observado que 60% dos SHR tiveram alterações no epitélio germinativo tais como necrose tubular e/ou espermatogênese interrompida com células germinativas imaturas no lúmen seminífero (Figura 7D). Foi demonstrado por meio da análise morfométrica (Tabela - 1) que os parâmetros descritos a seguir foram menores nos animais hipertensos SHR quando comparados ao dos controles normotensos. Assim a altura do epitélio germinativo ($76,43 \pm 10,98$ e $80,62 \pm 5,81$, μm , SHR e WT, respectivamente, $p < 0,0001$), a área (67070 ± 12600 e 70960 ± 10236 , μm^2 , SHR e WT, respectivamente, $p = 0,001$) e o diâmetro tubular ($295,9 \pm 32,00$ e $305,3 \pm 24,55$, μm , SHR e WT, respectivamente, $p = 0,0006$) foram menores nos animais hipertensos. Entretanto, em relação a área da luz tubular não foram encontradas diferenças entre os grupos (13730 ± 5890 e 14160 ± 4752 , μm^2 , SHR e WT, respectivamente, $p = 0,404$).

Figura 7. Alterações morfológicas nos testículos de SHR. Tecido testicular corado com hematoxilina e eosina de ratos com 26 semanas de idade normotensos (A e B; ratos Wistar) e hipertensos (C e D; SHR). Todos os testículos dos SHR avaliados possuíam alterações vasculares nas arteríolas, apresentado como aumento da túnica adventícia (cabeças de setas) (C). Cada rato do grupo hipertenso demonstrou diferentes estágios de dano testicular. Foi observado em sessenta por cento dos SHR células imaturas (asterisco) no lúmen tubular (D). Ratos hipertensos apresentaram também aumento da massa testicular quando comparados aos dos ratos normotensos (E). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão; teste t-student para comparação entre os grupos; * $p < 0,05$, diferença significativa em relação aos ratos Wistar; Ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

Tabela 1 - Análise da morfometria testicular em ratos normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR).

	Wistar (n=5)	SHR (n=5)	p
Diâmetro tubular (μm)	305,3 $\pm$ 24,55	295,9 $\pm$ 32,00*	0,0006
Área tubular (μm^2)	67070 $\pm$ 12600	70960 $\pm$ 10236*	0,0010
Área luminal (μm^2)	14160 $\pm$ 4752	13730 $\pm$ 5890	0,4040
Espessura do epitélio (μm)	80,62 $\pm$ 5,81	76,43 $\pm$ 10,98*	<0,0001

Dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão; n=5

SHR: ratos espontaneamente hipertensos

* - diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre os grupos SHR e Wistar.

4.3. SHR e Wistar não apresentaram diferença quanto a adesão leucocitária em vênulas testiculares

Em condição basal e na presença do estímulo inflamatório com LTB₄, nenhuma diferença na adesão de leucócitos em vênulas testiculares de SHR e Wistar foi encontrada (Figura 8). O mesmo fenômeno foi observado com o estímulo LPS. Entretanto, quando o agente inflamatório LPS foi administrado no leito vênular mesentérico observamos aumento dessa resposta em ambos os grupos, indicando uma resposta leito-específica.

Figura 8. O histograma representa a quantidade de leucócitos aderidos a vênulas testiculares em condição basal ou após estímulo inflamatório com LPS (750 µg/mL) e LTB4 (10^{-9} M) após 10 minutos de contato com a preparação. Os valores obtidos no leito mesentérico estimulados com LPS (750 µg/mL) estão representados pelas linhas tracejadas roxa (SHR) e azul (WT). Observar o aumento da resposta ao LPS no leito mesentérico dos SHR em relação aos dos WT, fenômeno não observado no leito vênular dos testículos. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. ANOVA 1 via, $p < 0,05$, $n = 5$.

4.4. Alteração na vasomotricidade testicular via receptores adrenérgicos $\alpha 1$ e aumento na expressão de proteínas relacionadas à hipóxia em testículos de ratos hipertensos

Após a demonstração por análise histopatológica que houve alterações morfológicas nas arteríolas testiculares dos SHR, foi realizado o estudo da microcirculação testicular, desenvolvido *in vivo* e *in situ*, utilizando microscopia intravital (Figura 9A, B e C). Nenhuma mudança foi observada na frequência de paradas de fluxo na circulação arteriolar entre os grupos no início do estudo ($7,33 \pm 0,51$ e $6,66 \pm 2,06$, ciclos/min, SHR e Wistar, respectivamente, $p > 0,05$, $n = 6$). No entanto, quando estimulados com vasoconstritores, a norepinefrina ($8,5 \pm 0,54$ e $6,42 \pm 0,97$, ciclos/min, SHR e Wistar respectivamente, $p < 0,01$), mas não

angiotensina II ($p > 0,05$), aumentou a frequência de paradas de fluxo apenas em animais hipertensos. A aplicação tópica da prazosina, antagonista do receptor α_1 -adrenérgico, foi capaz de diminuir ($p = 0,01$) a frequência de paradas de fluxo nesses animais hipertensos estimulados com norepinefrina ($8,5 \pm 0,54$ e $4,75 \pm 0,95$, ciclos/min, SHR Ne e SHR prazosina respectivamente, $p < 0,01$). Visto que essa alteração fisiológica poderia levar a alterações na distribuição de oxigênio para o testículo, a expressão de HIF-1 α e VEGF (marcadores de hipóxia) foram avaliadas por Western blotting (Figura 9D). Ratos normotensos apresentaram expressão constitutiva da proteína HIF-1 α e VEGF, enquanto ratos hipertensos apresentaram expressão proteica aumentada de HIF-1 α e VEGF quando comparados a dos ratos Wistar ($p < 0,05$, $n = 5$).

Figura 9. Alterações no fluxo sanguíneo de arteríolas testiculares de SHR e expressão proteica de HIF-1 α e VEGF (marcadores de hipóxia). (A) Fotomicrografia representativa da técnica de microscopia intravital mostrando a redução/parada de fluxo nas arteríolas testiculares de ratos (direita). (B) A frequência das variações rítmicas do fluxo arteriolar não estava alterada nos SHR em condição basal ou quando estimulada topicamente com o vasoconstritor angiotensina II (Ang II). Porém, a estimulação com norepinefrina (NE) aumentou a frequência em que o fluxo sanguíneo foi interrompido apenas no grupo hipertenso, e (C) aplicação tópica de prazosina, antagonista do receptor adrenérgico α_1 , foi capaz de diminuir essa frequência. É importante ressaltar que apenas ratos hipertensos responderam ao estímulo com noradrenalina e prazosina. (D) Imagens representativas de imunoblotting para HIF-1 α e VEGF e as suas respectivas membranas coradas com Ponceau (topo). Aumento da expressão proteica de HIF-1 α e VEGF em testículos de SHR (parte inferior).

Concentrações: NE: $1,4 \times 10^{-7}$ M; Ang II: $1,4 \times 10^{-9}$ M; Prazosina: 3×10^{-7} M. Volume: 30 μ L. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. ANOVA 1 via ou teste t; * p < 0,05 vs Wistar; # vs Wistar NE; + vs SHR NE; n = 4-7. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR), fator induzido por hipóxia-1 α (HIF-1 α) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

4.5. Ratos hipertensos apresentaram diminuição da qualidade espermática

A concentração espermática diminuiu em torno de 44% em SHR quando comparados a dos ratos Wistar ($19,42 \pm 6,66$ e $10,75 \pm 5,699$, $\times 10^6/\text{mL}$, respectivamente, $p < 0,05$, $n = 6$) e os SHR apresentaram maior porcentagem de espermatozoides com morfologia anormal em comparação com a dos ratos Wistar ($3,5 \pm 1,64$ e $1,5 \pm 1,04$, %, respectivamente, $p < 0,05$, $n = 6$) (Figura 10E e F). Não foram encontradas diferenças entre os SHR e Wistar quanto à análise das variáveis relacionadas a motilidade espermática ($P > 0,05$) (Tabela - 2).

Os animais SHR apresentaram diminuição na porcentagem de espermatozoides com alta atividade mitocondrial (classe I) ($87 \pm 2,87$ e $95,6 \pm 2,60$, %, SHR e Wistar respectivamente, $p < 0,001$, $n = 5$) e maior porcentagem de espermatozoides com maior parte das mitocôndrias inativas (classe III) e com apenas inativas (classe IV), quando comparadas a ratos Wistar (Figura 10A).

Além disso, ratos hipertensos apresentaram maior atividade das espécies reativas de oxigênio, evidenciado por aumento de quase 10 vezes de núcleos positivos marcados com DHE ($5,8 \pm 3,19$ e $0,5 \pm 0,86$, %, SHR e WT, respectivamente, $p < 0,01$, $n = 5$) (Figura 10B).

Da mesma forma, o número de espermatozoides com acrossomas danificados estava aumentado nos SHR em comparação com os dos ratos Wistar ($2 \pm 0,35$ e $0,90 \pm 0,22\%$, respectivamente, $p < 0,001$, $n = 5$) (Figura 10D). Por fim, os SHR apresentaram diminuição da porcentagem de espermatozoides com alta integridade de DNA (Classe I) e aumento de espermatozoides com fragmentação inicial do DNA (Classe II) ($10,4 \pm 8,38$ e $1,4 \pm 1,14$, %, SHR e Wistar respectivamente, $p < 0,05$, $n = 5$) (Figura 10C).

Tabela 2 - Valores médios das variáveis relacionadas à motilidade analisadas por meio da análise espermática realizada por computador (CASA) dos espermatozoides pertencentes ao grupo normotenso (Wistar) e hipertenso (SHR).

	Wistar (n=5)	SHR (n=5)	p
VAP ($\mu\text{m/s}$)	91,42 $\pm$ 3,37	83,41 $\pm$ 20,70	0,417
VCL ($\mu\text{m/s}$)	166,20 $\pm$ 8,54	152 $\pm$ 33,51	0,387
ALH (μm)	6,06 $\pm$ 0,73	3,93 $\pm$ 2,64	0,121
BCF (Hz)	20,04 $\pm$ 1,17	19,22 $\pm$ 8,09	0,827
STR (%)	57,7 $\pm$ 1,14	45,3 $\pm$ 14,25	0,08
LIN (%)	33,68 $\pm$ 1,08	26,48 $\pm$ 8,72	0,104

Valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão; n=5

CASA = análise espermática realizada por computador ; SHR: ratos espontaneamente hipertensos; velocidade média (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento cruzado (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

* - diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre os grupos SHR e Wistar.

Figura 10. *Teste funcional dos espermatozoides.* Foi demonstrado que a qualidade dos espermatozoides dos animais hipertensos SHR foi pior do que os dos ratos normotensos Wistar, evidenciada por (A) diminuição da porcentagem de atividade mitocondrial (aumento de espermatozoides classe III e IV), (B) aumento das espécies reativas de oxigênio intracelular (núcleos DHE+), (C) diminuição da integridade do DNA espermático (aumento de espermatozoides classe II), (D) aumento de espermatozoides com o acrossoma danificado (marcados com FITC-PNA), (E) aumento da porcentagem de espermatozoides teratospermicos e (F) diminuição da concentração de espermatozoides.

Teste t-student para comparação entre os grupos: * $p < 0,05$, diferença significativa em relação aos ratos Wistar; $n = 5-6$. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo, (i) foi estabelecido o testículo como novo órgão alvo no qual a hipertensão arterial exerce seus efeitos prejudiciais, (ii) demonstrado um dos possíveis mecanismos vasculares associado e (iii) foi documentada as detalhadas alterações no espermatozoide de ratos hipertensos. Até onde é sabido, este foi o primeiro relato descrevendo o mecanismo pelo qual a hipertensão arterial afeta os testículos e aspectos importantes dos espermatozoides, tais como fragmentação do DNA, integridade do acrossoma, atividade mitocondrial e das espécies e reativas de oxigênio.

É expressiva a redução da qualidade do sêmen em apenas algumas décadas e isso tem se tornado um grande problema de saúde pública. Recentemente tem sido sugerido que a qualidade do sêmen seja um biomarcador da saúde geral do homem. Atualmente, 1,2 bilhão de homens são hipertensos em todo o mundo e está estabelecido que a hipertensão arterial induz a uma variedade de pronunciadas alterações em órgãos como cérebro, coração, rins e olhos, o que prejudica drasticamente sua função regular ao longo do tempo (FEIHL et al., 2006; FEIHL; LIAUDET; WAEBER, 2009).

Nesse estudo, foi utilizado o SHR como modelo experimental de hipertensão arterial. Os SHR têm sido utilizados em muitas publicações relacionadas à hipertensão arterial, sendo o modelo mais estudado para tal (para uma revisão, ver PINTO; PAUL; GANTEN, 1998). O modelo surgiu do cruzamento de ratos com hipertensão espontânea. No SHR, a pressão arterial começa a se elevar a partir da 5ª semana de vida, atingindo o platô de pressão na décima segunda semana, sendo que os machos apresentam valores pressóricos superiores aos das fêmeas (MULVANY; HANSEN; AALKJAER, 1978; OKAMOTO et al., 1986). No presente estudo, foram utilizados ratos com 24-26 semanas de idade e todos os SHR avaliados eram hipertensos. Sendo assim, os ratos hipertensos utilizados ficaram expostos a carga pressórica por aproximadamente doze semanas após ter atingido o platô da pressão arterial. Os SHR apresentaram aumento da pressão arterial sistólica e diastólica, bem como aumento da frequência cardíaca (em repouso) quando comparados com os ratos normotensos Wistar. Como a pressão arterial é o produto da resistência periférica total e do débito cardíaco, tem sido descrito que os SHR apresentam

alterações nos vasos de condutância e resistência de vários leitos vasculares na idade utilizada neste estudo (DUAN et al., 2015; GÓMEZ-ROSO et al., 2009; INTENGAN et al., 1999; MULVANY et al., 1996; ROCHA et al., 2010). Além do mais, os SHR também apresentam hipertrofia de órgãos como coração e rins (BELANGER et al., 2003).

No presente estudo, foi demonstrado que ratos hipertensos SHR possuem hipertrofia cardíaca e hipertrofia testicular, o qual está de acordo com outros estudos na literatura (BECHARA et al., 2015; SUZUKI, T., 1979). Suzuki (1979) demonstrou também aumento da relação massa testicular:corporal em SHR-SP com aproximadamente 21 semanas de idade. Curiosamente, também foi observado que à medida que os animais envelheciam essa proporção referente à massa testicular diminuía ao ponto de os valores apresentarem-se inferiores aos dos ratos normotensos Wistar-Kyoto, sugerindo que o dano hipertensivo aos testículos poderia continuar ou até mesmo aumentar com o envelhecimento. Uma vez que os efeitos prejudiciais da hipertensão à órgãos-alvo são relacionados a variável temporal, como os efeitos a médio e longo prazo, seria imperativo mais estudos que investigassem os efeitos durante o envelhecimento. Além da hipertrofia testicular, os SHR nesse estudo apresentaram alterações na arquitetura testicular. A maioria dos testículos de animais hipertensos no presente estudo dispunham de regiões com células germinativas imaturas no lúmen tubular, bem como necrose tubular. Corroborando com os dados morfológicos, foi demonstrado pelo estudo morfométrico diminuição da área e diâmetro tubular, como também na espessura do epitélio germinativo nos animais hipertensos.

A redução no diâmetro total do túbulo seminífero pode ocorrer como resultado da depleção de células germinativas e/ou como resultado da redução da secreção do fluido dos túbulos seminíferos. De fato, foi observada uma diminuição da espessura do epitélio seminífero. Essa perda de células germinativas e a diminuição do fluído possuem efeito significativo na massa dos testículos. Porém, no presente estudo foi encontrado aumento na massa testicular, o que pode ser então um indicativo de desequilíbrio na mecânica das trocas de fluidos entre a circulação e o interstício mediado pela vasculatura. O fator unificador em todos os ratos hipertensos foram as alterações arteriolares, especialmente o aumento da túnica adventícia nesse tipo de vaso sanguíneo.

Uma alta incidência de alterações vasculares nos testículos, cérebro e rins, mas não nos ovários, foi demonstrada em SHR-SP com até 71 semanas de idade (SUZUKI, T., 1979). Isso poderia sugerir que a hipertensão pode afetar mais agressivamente a microcirculação nos órgãos reprodutivos masculinos do que nos órgãos reprodutivos femininos. Estudos nesse modelo experimental de acidente vascular encefálico (SHR-SP), que apresentam também hipertensão arterial severa, demonstraram alterações morfológicas vasculares nas arteríolas testiculares. Nestes vasos sanguíneos modificados, as principais observações foram espessamento da íntima, necrose fibrinóide e hialinose arteriolar (AKAGASHI et al., 1996; SAITO et al., 1995).

Sabe-se que a exposição crônica à hipóxia desencadeia alterações nos vasos e conseqüentemente o remodelamento vascular. As alterações estruturais mais precoces e mais influenciadas após a exposição a hipóxia são encontradas na camada adventícia da parede do vaso (DAS et al., 2000; PANZHINSKIY et al., 2012). Corroborando com os achados morfológicos, no presente estudo também foi observado pela primeira vez o aumento da expressão de proteínas relacionada à hipóxia (HIF-1 α e VEGF) nos testículos de animais hipertensos. É importante ressaltar que os testículos de mamíferos já funcionam em um ambiente com baixo nível de oxigênio. Este fato é corroborado principalmente por três razões: 1) a pressão parcial de oxigênio é baixa; 2) a capacidade de aumentar o fluxo sanguíneo nos testículos também é baixa, porque a microvasculatura testicular é regulada localmente e apresenta vasomotricidade, um fenômeno que é independente do batimento cardíaco; 3) o consumo de oxigênio testicular é alto devido às demandas da espermatogênese (LYSIAK et al., 2009; SETCHELL; WAITES, 1964).

O fator induzível por hipóxia 1 (HIF-1) é um fator de transcrição heterodimérico, ubiquamente expresso que desempenha um papel na homeostase do oxigênio e medeia as respostas adaptativas à hipóxia em todas as células nucleadas (LYSIAK et al., 2009; REY; SEMENZA, 2010). O HIF-1 apresenta uma subunidade denominada HIF-1 α , regulada pelo O₂, e outra subunidade HIF-1 β , que é constitutivamente expressa. Em um ambiente com baixos níveis de oxigênio, a presença de HIF-1 α no citoplasma aumenta, então ele é translocado para o núcleo e o HIF-1 α dimeriza com HIF-1 β e estimula a transcrição de vários genes como VEGF, eritropoietina, fosfoglicerato quinase 1

e heme oxigenase-1 (REY; SEMENZA, 2010; WANG et al., 1995). O HIF-1 α é constitutivamente expresso nos testículos de ratos e torna-se aumentado em períodos de isquemia testicular (POWELL et al., 2002). Da mesma forma, no presente estudo, observou-se que mesmo animais normotensos têm expressão de HIF-1 α , o que era esperado já que os testículos funcionam em um ambiente de baixo oxigênio. Mais do que isso, também observamos níveis aumentados de VEGF em animais hipertensos.

Tem sido sugerido que pelos níveis aumentados de HIF-1 α em SHR, os testículos dos animais hipertensos apresentem menor concentração de oxigênio do que os normotensos. É sabido também que um dos principais papéis da microcirculação é garantir a oferta adequada de oxigênio para atender às demandas de oxigênio para o órgão (ELLIS; JAGGER; SHARPE, 2005). Desta forma, os testículos apresentam características microvasculares únicas, como a vasomotricidade testicular (DAMBER et al., 1982, 1986).

A vasomotricidade testicular pode ser definida como contração e dilatação de forma rítmica e espontânea das arteríolas que alteram o fluxo sanguíneo. É um importante fenômeno nesse órgão, aonde propicia a função adequada do testículo, atuando na troca de fluidos transvasculares e na formação de líquido intersticial (COLLIN; ZUPP; SETCHELL, 2000; DAMBER et al., 1982, 1986). É modulado por hormônios e alterado em diversas situações, como varicocele e exposição ao tabagismo. Curiosamente, no presente estudo, foi demonstrado diminuição do fluxo sanguíneo, evidenciado pelo aumento do número de paradas de fluxo nas arteríolas do testículo após estimulação com norepinefrina. Além disso, foi demonstrado somente nos animais hipertensos a recuperação do fluxo sanguíneo após antagonismo dos receptores α_1 adrenérgicos com prazosina. Em outro estudo, Dumber e colaboradores (1986) observaram diminuição do fluxo sanguíneo testicular com altas doses de norepinefrina e epinefrina quando administradas na artéria caudal de ratos. Sabe-se que muitas condições de estresse podem levar ao aumento das catecolaminas plasmáticas (NILSSON; HEDING; HÖKFELT, 1975) e que essas moléculas modulam a função endócrina testicular (DAMBER; JANSON, 1978; STOJKOV et al., 2012). Além disso, ratos adultos submetidos a hipóxia moderada apresentaram alteração da vasomotricidade testicular e redução do fluxo sanguíneo nos testículos (KOSKINEN; COLLIN; BERGH, 2000).

Tanto em pacientes hipertensos quando em modelos animais de hipertensão arterial foi observada inflamação crônica de baixa intensidade na vasculatura (GHANEM; MOVAHED, 2007; PAULETTO; RATTAZZI, 2006). O endotélio vascular desempenha um papel importante no controle do tráfego de leucócitos para o interstício tecidual. O extravasamento de leucócitos, que é essencial para a resposta inflamatória, envolve a captura de leucócitos da circulação para o endotélio, seguido pelo rolamento dos leucócitos, forte adesão deles às células endoteliais e subsequente transmigração através do endotélio vascular. Se alguma dessas etapas não acontecer, o fenômeno de migração não ocorre (WALZOG; GAEHTGENS, 2000). Este processo de múltiplos passos é considerado um fator chave na patogênese da lesão tecidual.

No presente estudo, não observamos aumento da adesão de leucócitos nas vênulas testiculares, nem quando aplicados estímulos inflamatórios como LPS ou LTB₄. É importante lembrar que fisiologicamente o microambiente testicular é imunossupressor para proteger as células germinativas do ataque imunológico. Porém, em processos inflamatórios intensos, a tolerância é interrompida e as células imunológicas e seus mediadores respondem aos antígenos próprios das células germinativas imunogênicas, induzindo danos ao epitélio germinativo (FIJAK; BHUSHAN; MEINHARDT, 2011; ZHAO et al., 2014). Pelo fato de que na hipertensão arterial, apesar de crônica, a inflamação é de baixa intensidade, isso pode não ter sido o suficiente para causar lesões no epitélio germinativo observados nos SHR nesse estudo.

Muitos autores têm associado a saúde masculina geral à qualidade do sêmen em vários estudos coortes (EISENBERG et al., 2014; JACOBSEN et al., 2000; JENSEN et al., 2009; WALSH et al., 2010). Isso foi ainda apoiado pelo fato de que a maioria dos testículos de animais hipertensos em nosso estudo apresentou alterações morfológicas. Além disso, alterações histopatológicas nos vasos sanguíneos também foram encontradas em testículos de homens inférteis e/ou com varicocele (ANDRES; TRAINER; LAPENAS, 1981; JEZEK et al., 1996). No presente estudo a maioria dos animais hipertensos apresentaram alterações morfológicas, portanto, é plausível levantar a hipótese de que as doenças cardiovasculares sejam outro fator-chave em relação às alterações na fertilidade masculina, que é um possível elo para a infertilidade masculina idiopática.

É importante ressaltar que em várias situações em que há alterações na morfologia testicular, também há alteração na qualidade espermática (COLLI, L. G., SANTOS, M. C., TAMBOR, J., CAMARGO, I. C. C., 2016; TÜRK et al., 2007), tais como diminuição da concentração de espermatozoides e morfologia anormal (KARBALAY-DOUST et al., 2007). É familiar que a redução do fluxo sanguíneo possa desempenhar um papel importante na patogênese da infertilidade masculina (BERGH; COLLIN; LISSBRANT, 2001). De fato, juntamente com as modificações na microcirculação testicular, também foi observado alterações marcantes em aspectos importantes do espermatozoide em ratos hipertensos. Estudos em humanos relacionaram a hipertensão arterial a aspectos alterados no espermatozoide também. Em um pequeno estudo de coorte publicado em 2012, foi demonstrado que homens hipertensos apresentavam níveis aumentados de clusterina, uma glicoproteína heterodimérica associada à morfologia espermática anormal (MUCIACCIA et al., 2012). Em 2015, outro estudo maior observou que homens com doença hipertensiva apresentavam taxas maiores de anormalidades espermáticas (EISENBERG et al., 2015). No entanto, em nenhum desses estudos foi mostrado outros aspectos, como a integridade do acrossoma, a atividade mitocondrial e de espécies reativas de oxigênio, ou estabeleceu um possível mecanismo.

A íntima relação das espécies reativas de oxigênio com hipertensão arterial ou com infertilidade masculina tem sido demonstrada por várias décadas. No entanto, esta foi a primeira vez que foi demonstrado que a hipertensão pode influenciar a atividade das EROs nos espermatozoides. No presente estudo, os espermatozoides de ratos hipertensos apresentaram aumento notável na atividade das EROs. Apesar do papel fisiológico das EROs, níveis aumentados podem danificar estruturas celulares, incluindo lipídeos e membranas, e levar a alterações em proteínas e ácidos nucleicos que poderiam alterar sua função correspondente. De fato, também foi observado que, além das EROs, os ratos hipertensos apresentaram maior fragmentação do DNA e número de espermatozoides com o acrossoma danificado. Já foi demonstrado que a redução do fluxo sanguíneo testicular induziu aumento na fragmentação do DNA em algumas células germinativas, como espermatogônias e espermatócitos primários (BERGH; COLLIN; LISSBRANT, 2001) e danos no DNA dos espermatozoides podem ocorrer em qualquer etapa da espermatogênese

(ERENPREISS et al., 2006; OZMEN et al., 2007). Em outra situação com alterações vasculares, foi demonstrado que pacientes com varicocele tinham redução do fluxo sanguíneo arterial testicular e aumento na fragmentação do DNA espermático (BLUMER et al., 2008; TARHAN et al., 2003). No presente estudo, foi demonstrado aumento no número de espermatozoides com acrossoma danificado em animais hipertensos. O acrossoma é composto por membranas e proteínas, tornando-o sensível a altas concentrações de EROs e ao estresse oxidativo (GRIVEAU et al., 1995; SABETI et al., 2016).

Outro ponto de convergência entre hipertensão e infertilidade masculina diz respeito às mitocôndrias disfuncionais. Sabe-se que essa organela participa de várias funções celulares, como produção de ATP, biossíntese de hormônios esteroides, homeostase de cálcio, participação na apoptose e geração de espécies reativas de oxigênio. Por um lado, há evidências crescentes de que a hipertensão arterial está associada ao aumento da produção de EROs mitocondriais e isso está associado à disfunção vascular (DIKALOV; NAZAREWICZ, 2013; DOUGHAN; HARRISON; DIKALOV, 2008). Paralelamente, também é sugerido que as mitocôndrias disfuncionais nos espermatozoides poderiam produzir moléculas oxidantes que podem contribuir para a infertilidade masculina (CASSINA et al., 2015). No presente estudo, foi observado aumento na porcentagem de espermatozoides com maioria das mitocôndrias inativas ou apenas com mitocôndrias inativas. Resultados semelhantes também foram observados em homens portadores de varicocele (BLUMER et al., 2008). De fato, foi proposto que a mitocôndria poderia ser um biomarcador de saúde do espermatozoide e fertilidade (MORAES; MEYERS, 2018). Essas mitocôndrias disfuncionais nos espermatozoides estão relacionadas à produção de EROs, especialmente devido à diminuição da permeabilidade seletiva da membrana, permitindo assim o efluxo de compostos pró-oxidantes presentes nas mitocôndrias (SABETI et al., 2016; SANOCKA; KURPISZ, 2004). Isso pode explicar o aumento da atividade das EROs encontrado no presente estudo.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, ratos hipertensos apresentaram dano testicular, possivelmente associado as alterações na microcirculação local. Isso foi acompanhado pela diminuição da qualidade dos espermatozoides, aumento da atividade das EROs e aumento da expressão de proteínas induzidas por hipóxia testicular. Foi demonstrado nesse estudo uma relação entre vários aspectos já conhecidos que estão alterados tanto na hipertensão quanto na diminuição da fertilidade masculina, especialmente em relação à modificação na atividade mitocondrial e das EROs. É importante enfatizar que este estudo ascende o testículo como outro importante órgão alvo da hipertensão arterial. Mais do que isso, também fortalece a ligação entre a hipertensão arterial e as alterações na fertilidade masculina - fornecendo embasamento científico para estudos contemporâneos que associam saúde geral masculina e fertilidade.

REFERÊNCIAS*

AKAGASHI, K. et al. Hypertensive changes in intratesticular arteries impair spermatogenesis of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Journal of Andrology**, v. 17, n. 4, p. 367–374, ago. 1996.

ALMAGOR, M. et al. Changes in semen quality in Jerusalem between 1990 and 2000: a cross-sectional and longitudinal study. **Archives of Andrology**, v. 49, n. 2, p. 139–144, abr. 2003.

ANDRES, T. L.; TRAINER, T. D.; LAPENAS, D. J. Small vessel alterations in the testes of infertile men with varicocele. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 76, n. 4, p. 378–384, out. 1981.

AUGER, J. et al. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 5, p. 281–285, 2 fev. 1995.

BECHARA, G. R. et al. Testicular Morphology and Spermatozoid Parameters in Spontaneously Hypertensive Rats Treated with Enalapril. **The Journal of Urology**, v. 194, n. 5, p. 1498–1503, nov. 2015.

BEERY, A. K.; ZUCKER, I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 565–572, jan. 2011.

BELANGER, M. P. et al. Effect of hypertension on reproductive organ weights in various strains of rats. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 39–41, nov. 2003.

BENJAMIN, E. J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 135, n. 10, p. e146–e603, 07 2017.

BERGH, A.; COLLIN, O.; LISSBRANT, E. Effects of acute graded reductions in testicular blood flow on testicular morphology in the adult rat. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 1, p. 13–20, jan. 2001.

BILOTTA, P.; GUGLIELMO, R.; STEFFÈ, M. [Analysis of decline in seminal fluid in the Italian population during the past 15 years]. **Minerva Ginecologica**, v. 51, n. 6, p. 223–231, jun. 1999.

BLOOM, M. S. et al. Associations between urinary phthalate concentrations and semen quality parameters in a general population. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 30, n. 11, p. 2645–2657, nov. 2015.

BLUMER, C. G. et al. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 5, p. 1716–1722, nov. 2008.

BOLÍVAR, J. J. Essential hypertension: an approach to its etiology and neurogenic pathophysiology. **International Journal of Hypertension**, v. 2013, p. 547809, 2013.

BONDE, J. P. et al. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. **Lancet (London, England)**, v. 352, n. 9135, p. 1172–1177, 10 out. 1998.

BORGES, E. et al. Decline in semen quality among infertile men in Brazil during the past 10 years. **International Braz J Urol: Official Journal of the Brazilian Society of Urology**, v. 41, n. 4, p. 757–763, ago. 2015.

CARLSEN, E. et al. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 305, n. 6854, p. 609–613, 12 set. 1992.

CARLSEN, E. et al. Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. **Fertility and Sterility**, v. 82, n. 2, p. 358–366, ago. 2004.

CASSINA, A. et al. Defective Human Sperm Cells Are Associated with Mitochondrial Dysfunction and Oxidant Production. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 5, p. 119, nov. 2015.

CATES, W.; FARLEY, T. M.; ROWE, P. J. Worldwide patterns of infertility: is Africa different? **Lancet (London, England)**, v. 2, n. 8455, p. 596–598, 14 set. 1985.

CHIU, Y.-H. et al. Intake of Fruits and Vegetables with Low-to-Moderate Pesticide Residues Is Positively Associated with Semen-Quality Parameters among Young Healthy Men. **The Journal of Nutrition**, v. 146, n. 5, p. 1084–1092, 2016.

CHOCKALINGAM, A.; CAMPBELL, N. R.; FODOR, J. G. Worldwide epidemic of hypertension. **The Canadian Journal of Cardiology**, v. 22, n. 7, p. 553–555, 15 maio 2006.

COLLI, L. G., SANTOS, M. C., TAMBOR, J., CAMARGO, I. C. C. The administration of hydroethanolic extract of *Cordia ecalyculata* Vell. at different doses promotes reproductive toxicity in adult male rats. 8. v. 4, n. 93, 2016.

COLLIN, O.; ZUPP, J. L.; SETCHELL, B. P. Testicular vasomotion in different mammals. **Asian Journal of Andrology**, v. 2, n. 4, p. 297–300, dez. 2000.

DAMBER, J. E. et al. Testicular blood flow measured with a laser Doppler flowmeter: acute effects of catecholamines. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 115, n. 2, p. 209–215, jun. 1982.

DAMBER, J. E. et al. Testicular microcirculation in the rat studied by videophotometric capillaroscopy, fluorescence microscopy and laser Doppler flowmetry. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 126, n. 3, p. 371–376, mar. 1986.

DAMBER, J. E.; JANSON, P. O. The effects of LH, adrenaline and noradrenaline on testicular blood flow and plasma testosterone concentrations in anaesthetized rats. **Acta Endocrinologica**, v. 88, n. 2, p. 390–396, jun. 1978.

DAS, M. et al. Chronic hypoxia induces exaggerated growth responses in pulmonary artery adventitial fibroblasts: potential contribution of specific protein kinase c isozymes. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 22, n. 1, p. 15–25, jan. 2000.

DEVROEY, P. et al. Do we treat the male or his gamete? **Human Reproduction**, v. 13, n. suppl 1, p. 178–185, 1 abr. 1998.

DIKALOV, S. I.; NAZAREWICZ, R. R. Angiotensin II-induced production of mitochondrial reactive oxygen species: potential mechanisms and relevance for cardiovascular disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 10, p. 1085–1094, 1 out. 2013.

DOUGHAN, A. K.; HARRISON, D. G.; DIKALOV, S. I. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. **Circulation Research**, v. 102, n. 4, p. 488–496, 29 fev. 2008.

DUAN, J. et al. **Aortic Remodelling Is Improved by 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside Involving the Smad3 Pathway in Spontaneously Hypertensive Rats.** Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/789027/>>. Acesso em: 11 set. 2019.

EHRET, G. B. et al. The genetics of blood pressure regulation and its target organs from association studies in 342,415 individuals. **Nature Genetics**, v. 48, n. 10, p. 1171–1184, 2016.

EISENBERG, M. L. et al. Semen quality, infertility and mortality in the USA. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 29, n. 7, p. 1567–1574, jul. 2014.

EISENBERG, M. L. et al. Relationship between semen production and medical comorbidity. **Fertility and Sterility**, v. 103, n. 1, p. 66–71, jan. 2015.

ELLIS, C. G.; JAGGER, J.; SHARPE, M. The microcirculation as a functional system. **Critical Care (London, England)**, v. 9 Suppl 4, p. S3-8, 2005.

ERENPREISS, J. et al. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. **Asian Journal of Andrology**, v. 8, n. 1, p. 11–29, jan. 2006.

FAGARD, R. et al. Heritability of conventional and ambulatory blood pressures. A study in twins. **Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)**, v. 26, n. 6 Pt 1, p. 919–924, dez. 1995.

FEIHL, F. et al. Hypertension: a disease of the microcirculation? **Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)**, v. 48, n. 6, p. 1012–1017, dez. 2006.

FEIHL, F.; LIAUDET, L.; WAEBER, B. The macrocirculation and microcirculation of hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 11, n. 3, p. 182–189, jun. 2009.

FIJAK, M.; BHUSHAN, S.; MEINHARDT, A. Immunoprivileged sites: the testis. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 677, p. 459–470, 2011.

GHANEM, F. A.; MOVAHED, A. Inflammation in high blood pressure: a clinician perspective. **Journal of the American Society of Hypertension: JASH**, v. 1, n. 2, p. 113–119, abr. 2007.

GÓMEZ-ROSO, M. et al. Cardiovascular changes in spontaneously hypertensive rats are improved by chronic treatment with zofenopril. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 8, p. 1911–1921, dez. 2009.

GRIVEAU, J. F. et al. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, n. 1, p. 17–26, jan. 1995.

Hipertensão arterial sistêmica para o Sistema Único de Saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. [s.l: s.n.]. **Homepage > NCD-RisC.** Disponível em: <<http://ncdrisc.org/>>. Acesso em: 11 set. 2019.

INHORN, M. C. “The Worms Are Weak”: Male Infertility and Patriarchal Paradoxes in Egypt. **Men and Masculinities**, v. 5, n. 3, p. 236-256, 1 jan. 2003

INHORN, M. C. Why Me? Male Infertility and Responsibility in the Middle East. **Men and Masculinities**, v. 16, n. 1, p. 49–70, 1 abr. 2013.

INTENGAN, H. D. et al. Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats : effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. **Circulation**, v. 100, n. 22, p. 2267–2275, 30 nov. 1999.

IRVINE, D. S. Epidemiology and aetiology of male infertility. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 13 Suppl 1, p. 33–44, abr. 1998.

IRVINE, S. et al. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 312, n. 7029, p. 467–471, 24 fev. 1996.

JACOBSEN, R. et al. Risk of testicular cancer in men with abnormal semen characteristics: cohort study. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 321, n. 7264, p. 789–792, 30 set. 2000.

JAMES, P. A. et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). **JAMA**, v. 311, n. 5, p. 507–520, 5 fev. 2014.

JANNATIFAR, R. et al. Effect of supraphysiological dose of Nandrolone Decanoate on the testis and testosterone concentration in mature and immature male rats: A time course study. **International Journal of Reproductive Biomedicine (Yazd, Iran)**, v. 13, n. 12, p. 779–786, dez. 2015.

JENSEN, T. K. et al. Good semen quality and life expectancy: a cohort study of 43,277 men. **American Journal of Epidemiology**, v. 170, n. 5, p. 559–565, 1 set. 2009.

JENSEN, T. K. et al. High dietary intake of saturated fat is associated with reduced semen quality among 701 young Danish men from the general population. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 97, n. 2, p. 411–418, fev. 2013.

JEZEK, D. et al. Structure of small blood vessels in the testes of infertile men. **International Journal of Andrology**, v. 19, n. 5, p. 299–306, out. 1996.

KAMISCHKE, A.; NIESCHLAG, E. Conventional treatments of male infertility in the age of evidence-based andrology. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 13 Suppl 1, p. 62–75, abr. 1998.

KARBALAY-DOUST, S. et al. The reversibility of sperm quality after discontinuing nandrolone decanoate in adult male rats. **Asian Journal of Andrology**, v. 9, n. 2, p. 235–239, mar. 2007.

KOSKINEN, L. O.; COLLIN, O.; BERGH, A. Cigarette smoke and hypoxia induce acute changes in the testicular and cerebral microcirculation. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 105, n. 3, p. 215–226, 2000.

LAO, X. Q. et al. Exposure to ambient fine particulate matter and semen quality in Taiwan. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 75, n. 2, p. 148–154, 2018.

LATIF, T. et al. Semen Quality as a Predictor of Subsequent Morbidity: A Danish Cohort Study of 4,712 Men With Long-Term Follow-up. **American Journal of Epidemiology**, v. 186, n. 8, p. 910–917, 15 out. 2017.

LAW, M. R.; FROST, C. D.; WALD, N. J. By how much does dietary salt reduction lower blood pressure? I--Analysis of observational data among populations. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 302, n. 6780, p. 811–815, 6 abr. 1991.

LEVINE, H. et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. **Human Reproduction Update**, v. 23, n. 6, p. 646–659, 01 2017.

LEVY, B. I. et al. Microcirculation in hypertension: a new target for treatment? **Circulation**, v. 104, n. 6, p. 735–740, 7 ago. 2001.

LEWINGTON, S. et al. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. **Lancet (London, England)**, v. 360, n. 9349, p. 1903–1913, 14 dez. 2002.

LIU, C. et al. Meta-analysis identifies common and rare variants influencing blood pressure and overlapping with metabolic trait loci. **Nature Genetics**, v. 48, n. 10, p. 1162–1170, 2016.

LUFT, F. C. Twins in cardiovascular genetic research. **Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)**, v. 37, n. 2 Pt 2, p. 350–356, fev. 2001.

LYSIAK, J. J. et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha is constitutively expressed in murine Leydig cells and regulates 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 promoter activity. **Journal of Andrology**, v. 30, n. 2, p. 146–156, abr. 2009.

MATZUK, M. M.; LAMB, D. J. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. **Nature Medicine**, v. 14, n. 11, p. 1197–1213, nov. 2008.

MENKVELD, R. et al. Possible changes in male fertility over a 15-year period. **Archives of Andrology**, v. 17, n. 2, p. 143–144, 1986.

MERZENICH, H.; ZEEB, H.; BLETTNER, M. Decreasing sperm quality: a global problem? **BMC public health**, v. 10, p. 24, 19 jan. 2010.

MILLS, K. T. et al. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-Based Studies From 90 Countries. **Circulation**, v. 134, n. 6, p. 441–450, 9 ago. 2016.

MORAES, C. R.; MEYERS, S. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. **Animal Reproduction Science**, v. 194, p. 71–80, jul. 2018.

MUCIACCIA, B. et al. Higher clusterin immunolabeling and sperm DNA damage levels in hypertensive men compared with controls. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 27, n. 8, p. 2267–2276, ago. 2012.

MUKHERJEE, S.; RIDGEWAY, A. D.; LAMB, D. J. DNA mismatch repair and infertility. **Current Opinion in Urology**, v. 20, n. 6, p. 525–532, nov. 2010.

MULVANY, M. J. et al. Vascular remodeling. **Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)**, v. 28, n. 3, p. 505–506, set. 1996.

MULVANY, M. J.; HANSEN, O. K.; AALKJAER, C. Direct evidence that the greater contractility of resistance vessels in spontaneously hypertensive rats is associated with a narrowed lumen, a thickened media, and an increased number of smooth muscle cell layers. **Circulation Research**, v. 43, n. 6, p. 854–864, dez. 1978.

MURATURE, D. A. et al. Phthalate esters and semen quality parameters. **Biomedical & Environmental Mass Spectrometry**, v. 14, n. 8, p. 473–477, ago. 1987.

NEAVES, W. B. et al. Leydig cell numbers, daily sperm production, and serum gonadotropin levels in aging men. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 59, n. 4, p. 756–763, out. 1984.

NILSSON, K. O.; HEDING, L. G.; HÖKFELT, B. The influence of short term submaximal work on the plasma concentrations of catecholamines, pancreatic glucagon and growth hormone in man. **Acta Endocrinologica**, v. 79, n. 2, p. 286–294, jun. 1975.

NORDKAP, L. et al. Psychological stress and testicular function: a cross-sectional study of 1,215 Danish men. **Fertility and Sterility**, v. 105, n. 1, p. 174–187.e1–2, jan. 2016.

OKAMOTO, K. et al. Establishment and use of the M strain of stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Journal of Hypertension. Supplement: Official Journal of the International Society of Hypertension**, v. 4, n. 3, p. S21–24, out. 1986.

OLSEN, G. W. et al. Have sperm counts been reduced 50 percent in 50 years? A statistical model revisited. **Fertility and Sterility**, v. 63, n. 4, p. 887–893, abr. 1995.

OSSER, S.; LIEDHOLM, P.; RANSTAM, J. Depressed semen quality: a study over two decades. **Archives of Andrology**, v. 12, n. 1, p. 113–116, 1984.

OZMEN, B. et al. Relationship between sperm DNA damage, induced acrosome reaction and viability in ICSI patients. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 15, n. 2, p. 208–214, ago. 2007.

PAGE, L. B.; DAMON, A.; MOELLERING, R. C. Antecedents of cardiovascular disease in six Solomon Islands societies. **Circulation**, v. 49, n. 6, p. 1132–1146, jun. 1974.

PANZHINSKIY, E. et al. Hypoxia induces unique proliferative response in adventitial fibroblasts by activating PDGF β receptor-JNK1 signalling. **Cardiovascular Research**, v. 95, n. 3, p. 356–365, 1 ago. 2012.

PAULETTO, P.; RATTAZZI, M. Inflammation and hypertension: the search for a link. **Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 21, n. 4, p. 850–853, abr. 2006.

PINILLA, L. et al. Mechanism of reproductive deficiency in spontaneously hypertensive rats. **Physiology & Behavior**, v. 51, n. 1, p. 99–104, jan. 1992.

PINTO, Y. M.; PAUL, M.; GANTEN, D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. **Cardiovascular Research**, v. 39, n. 1, p. 77–88, jul. 1998.

POWELL, J. D. et al. Stimulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1alpha) protein in the adult rat testis following ischemic injury occurs without an increase in HIF-1alpha messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 3, p. 995–1002, set. 2002.

PRIES, A. R.; SECOMB, T. W. Making microvascular networks work: angiogenesis, remodeling, and pruning. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 29, n. 6, p. 446–455, nov. 2014.

RAPSOMANIKI, E. et al. Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases: lifetime risks, healthy life-years lost, and age-specific associations in 1·25 million people. **Lancet (London, England)**, v. 383, n. 9932, p. 1899–1911, 31 maio 2014.

REY, S.; SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. **Cardiovascular Research**, v. 86, n. 2, p. 236–242, 1 maio 2010.

ROCHA, W. A. et al. Kinetics of cardiac and vascular remodeling by spontaneously hypertensive rats after discontinuation of long-term captopril treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, v. 43, n. 4, p. 390–396, abr. 2010.

SABETI, P. et al. Etiologies of sperm oxidative stress. **International Journal of Reproductive Biomedicine (Yazd, Iran)**, v. 14, n. 4, p. 231–240, abr. 2016.

SAITO, N. et al. Changes in various tissues in the arterial wall of spontaneously hypertensive rats. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology. Supplement**, v. 22, n. 1, p. S126-128, dez. 1995.

SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, v. 2, p. 12, 23 mar. 2004.

SCHMIEDER, R. E. et al. Angiotensin II related to sodium excretion modulates left ventricular structure in human essential hypertension. **Circulation**, v. 94, n. 6, p. 1304–1309, 15 set. 1996.

SCHMIEDER, R. E. The role of non-haemodynamic factors of the genesis of LVH. **Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 20, n. 12, p. 2610–2612, dez. 2005.

SCHMIEDER, R. E. End organ damage in hypertension. **Deutsches Arzteblatt International**, v. 107, n. 49, p. 866–873, dez. 2010.

SENGUPTA, P. et al. Decline in sperm count in European men during the past 50 years. **Human & Experimental Toxicology**, v. 37, n. 3, p. 247–255, mar. 2018.

SERMONDADE, N. et al. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. **Human Reproduction Update**, v. 19, n. 3, p. 221–231, jun. 2013.

SETCHELL, B. P. Sperm counts in semen of farm animals 1932-1995. **International Journal of Andrology**, v. 20, n. 4, p. 209–214, ago. 1997.

SETCHELL, B. P.; WAITES, G. M. BLOOD FLOW AND THE UPTAKE OF GLUCOSE AND OXYGEN IN THE TESTIS AND EPIDIDYMIS OF THE RAM. **The Journal of Physiology**, v. 171, p. 411–425, jun. 1964.

Sexuality, Masculinity, and Infertility in Egypt: Potent Troubles in the Marital and Medical Encounters - Marcia C. Inhorn, 2002. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3149/jms.1003.343>>. Acesso em: 10 set. 2019.

SHARMA, R. et al. Cigarette Smoking and Semen Quality: A New Meta-analysis Examining the Effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen. **European Urology**, v. 70, n. 4, p. 635–645, 2016.

STOJKOV, N. J. et al. Repeated immobilization stress disturbed steroidogenic machinery and stimulated the expression of cAMP signaling elements and adrenergic receptors in Leydig cells. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 302, n. 10, p. E1239-1251, 1 maio 2012.

SURENDRAN, P. et al. Trans-ancestry meta-analyses identify rare and common variants associated with blood pressure and hypertension. **Nature Genetics**, v. 48, n. 10, p. 1151–1161, 2016.

SUZUKI, T. Morphological Studies on Hypertensive Vascular Changes in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats 1. Preliminary Report on the Testicular Artery. v. 4, n. 2, p. 389–401, 1979.

SWAN, S. H.; ELKIN, E. P.; FENSTER, L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 10, p. 961–966, out. 2000.

TARHAN, S. et al. Effect of varicocele on testicular artery blood flow in men--color Doppler investigation. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, v. 37, n. 1, p. 38–42, 2003.

“The Worms Are Weak”: Male Infertility and Patriarchal Paradoxes in Egypt
- Marcia C. Inhorn, 2003. Disponível em:
<<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1097184X02238525>>. Acesso em: 10 set. 2019.

THE HANDMAID'S TALE. Direção: Bruce Miller. Produção: Margaret Atwood e Elisabeth Moss. Interpretes: Elisabeth Moss, Joseph Fiennes, Yvonne Strahovski, Alexis Bledel, Madeline Brewer, Ann Dowd, Olatunde Olateju Olaolorun, Max Minghella, Samira Wiley, Amanda Brugel e Bradley Whitford. Produzido por Hulu. Baseado no livro “The Handmaid’s tale” de Margaret Atwood. Programa de TV.

TÜRK, G. et al. Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats. **Theriogenology**, v. 67, n. 4, p. 778–785, 1 mar. 2007.

WALSH, T. J. et al. Increased risk of high-grade prostate cancer among infertile men. **Cancer**, v. 116, n. 9, p. 2140–2147, 1 maio 2010.

WALZOG, B.; GAEHTGENS, P. Adhesion Molecules: The Path to a New Understanding of Acute Inflammation. **News in Physiological Sciences: An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society**, v. 15, p. 107–113, jun. 2000.

WANG, C.; SWERDLOFF, R. S. Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. **Fertility and Sterility**, v. 102, n. 6, p. 1502–1507, dez. 2014.

WANG, G. L. et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 12, p. 5510–5514, 6 jun. 1995.

WHELTON, P. K. et al. 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: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 71, n. 19, p. 2199–2269, 15 2018.

WHO | Raised blood pressure. Disponível em: <https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence_text/en/>. Acesso em: 10 set. 2019.

WILLIAMS, B. et al. [2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension]. **Kardiologia Polska**, v. 77, n. 2, p. 71–159, 2019.

YILDIRIM, M. E. et al. What is harmful for male fertility: cell phone or the wireless Internet? **The Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 31, n. 9, p. 480–484, set. 2015.

ZHANG, M.-H. et al. Changes in Levels of Seminal Nitric Oxide Synthase, Macrophage Migration Inhibitory Factor, Sperm DNA Integrity and Caspase-3 in Fertile Men after Scrotal Heat Stress. **PloS One**, v. 10, n. 10, p. e0141320, 2015.

ZHANG, S. C.; WANG, H. Y.; WANG, J. D. Analysis of change in sperm quality of Chinese fertile men during 1981-1996. **Reproduction and Contraception**, v. 10, n. 1, p. 33–39, mar. 1999.

ZHAO, S. et al. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 11, n. 5, p. 428–437, set. 2014.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.