



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

RONIVANIA JENUARIO SILVA NESPOLO

**EXPRESSÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM TESTÍCULOS E DOSAGEM
HORMONAL DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS SUBMETIDOS AO
TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE**



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

RONIVANIA JENUARIO SILVA NESPOLO

**EXPRESSÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM TESTÍCULOS E DOSAGEM
HORMONAL DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS SUBMETIDOS AO
TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador: Dra. Ines Cristina Giometti

Presidente Prudente - SP
2021

636.089
N462n

Nespolo, Ronivania Jenuario Silva.

Expressão de mediadores inflamatórios em testículos e dosagem hormonal de ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao treinamento intervalado de alta intensidade / Ronivania Jenuario Silva Nespolo. – Presidente Prudente, 2021.

48f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2021.

Bibliografia.

Orientador: Ines Cristina Giometti

1. Exercício físico. 2. IL6. 3. Reprodução.
4. RT-qPCR. 5. TNF α . I. Título.

RONIVANIA JENUARIO SILVA NESPOLO

**EXPRESSÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM TESTÍCULOS E DOSAGEM
HORMONAL DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS SUBMETIDOS AO
TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Fisiopatologia Animal

Presidente Prudente, 12 de agosto de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Ines Cristina Giometti
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente – SP

Prof^a. Dr^a Giovana Rampazzo Teixeira
Universidade Estadual Paulista – Unesp
Presidente Prudente - SP

Prof^a. Dr^a. Francis Lopes Pacagnelli
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

DEDICATÓRIA

À minha família, meu esposo Jose Roberto Nespolo que me deu força e contribuiu para que eu alcançasse meu objetivo e especialmente aos meus filhos, Olga Roberta Silva Nespolo e Raphael Silva Nespolo que estiveram ao meu lado me dando apoio e incentivo. Aos colegas que me acompanharam e torceram por minha vitória. À minha orientadora Prof^a Dr^a Ines Cristina Giometti que esteve presente desde o início com sua total dedicação, aos demais mestres da Unoeste responsáveis pela minha formação, e aos meus amigos de turma.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde, por iluminar meus passos.

Agradeço a toda minha família que de alguma forma me incentivou nessa nova missão, à minha mãe, ao meu esposo e aos meus filhos que são a razão do meu viver! Filhos quero dizer nesse momento que vocês foram minha força, minha determinação, meus intercessores, não tenho palavras para agradecer, por isso o que posso fazer a partir de agora é recompensar com muita dedicação em minha profissão. AMO VOCÊS!

Agradeço imensamente à minha orientadora Prof^a Dr^a Ines Cristina Giometti, que tenho grande admiração, pela sabedoria, pela disposição, pelo sorriso a cada encontro e dedicação.

Às amigas de todos os momentos Regiane Soares, Magda Das Neves, Rebeca Bressa e José Antônio Bressa, que foram companheiras e torceram por mim. Vocês são geniais!

E agradeço com admiração também a todos os funcionários da UNOESTE (Universidade do Oeste Paulista) pela prontidão, colaboração e atendimento cordial; vocês são espetaculares e que Deus abençoe o trabalho de cada um! Aqui destaco o trabalho das colaboradoras Ina e Keid, sempre prontas a nos ajudar e com um sorriso brilhante.

Agradeço a todos os colaboradores desse estudo, sem eles nada disso seria possível! Obrigada à professora Dr^a Francis Lopes Pacagnelli e à sua orientada Francilene Lima Agostinho de Souza por cederem os materiais biológicos para o nosso experimento. Obrigada à professora Dr^a Giovana Rampazzo Teixeira e à sua orientada Allice Santos Cruz Veras pela disponibilidade e auxílio na imunohistoquímica. E também às alunas de pós-graduação Aline de Oliveira Santos e Lauren Chrys Soato Marin Schaffer e a técnica Mayara de Oliveira Vidotto Figueiredo pela importante ajuda nas análises laboratoriais. Agradeço de coração!

Agradeço também à FAPESP pelo apoio financeiro na realização do projeto regular (Processo número nº 2018/22682-0).

Por fim, aos meus amigos de sala e cotidiano por fazerem parte da somatória de pessoas que acreditaram em meu potencial. Quanta saudade sentirei, quanto foram ricas nossas trocas de conhecimento e como foram saudáveis as

risadas e preocupações com as entregas de trabalhos mesmo em tempos difíceis (PANDEMIA). Hoje posso afirmar:

“Valeu a pena!” SAUDADES.

RESUMO

Expressão de mediadores inflamatórios em testículos e dosagem hormonal de ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao treinamento intervalado de alta intensidade

A hipertensão é uma doença crônica não transmissível relacionada à idade que causa declínio no funcionamento de órgãos-alvo, incluindo o testículo, pois está associada ao aumento do estresse oxidativo e inflamação. As citocinas inflamatórias aumentam com a hipertensão e provocam inflamação e injúria tecidual. O treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) tem se mostrado promissor como tratamento não farmacológico para indivíduos hipertensos, porém ainda não se tem conhecimento de como atuaria no testículo de indivíduos hipertensos. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do HIIT sobre a inflamação nos testículos e sobre a concentração hormonal plasmática de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Os SHR machos foram divididos em dois grupos: SHR (controle, n=9); e HIIT (SHR submetidos ao HIIT em esteira, 5 dias/semana, por 8 semanas, n=10). A pressão arterial sistólica (PAS) foi verificada nos animais. Ao final do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia e o plasma e os testículos foram colhidos. Os fragmentos de um dos testículos dos ratos foram congelados e depois utilizados para extração de RNA pelo protocolo de TRIzol®. As expressões gênicas dos mediadores inflamatórios (*Tnfa* e *Il6*) foram quantificadas por RT-qPCR. A combinação de dois genes referência (*Hprt1* e *Rps18*) foi utilizada para normalizar a reação. O outro testículo dos ratos foi utilizado para a confecção de lâminas para a imunohistoquímica de TNF α e IL6. As dosagens plasmáticas de testosterona e de corticosterona foram realizadas por radioimunoensaio e de prolactina por enzimaensaio. A análise estatística realizada foi teste T de Student não pareado, exceto para testosterona que foi o teste de Mann-Whitney ($P<0,05$). Os animais que participaram HIIT tiveram menor valor de PAS. Os grupos não apresentaram diferença significativa na concentração dos hormônios plasmáticos. O grupo HIIT apresentou menor imunomarcagem de TNF α e de IL6 que o SHR e menor pressão arterial sistólica ($P<0,05$). Conclui-se que o HIIT por dois meses é efetivo em reduzir os mediadores inflamatórios nos testículos dos ratos hipertensos.

Palavras-Chave: Exercício físico. IL6. Reprodução. RT-qPCR. TNF α .

ABSTRACT

Expression of inflammatory mediators in the testes of spontaneously hypertensive rats submitted to high-intensity interval training

Hypertension is an age-related non-communicable chronic disease that causes a decline in the functioning of target organs, including the testis, as it is associated with increased oxidative stress and inflammation. Inflammatory cytokines increase with hypertension and cause inflammation and tissue injury. High-intensity interval training (HIIT) has shown promise as a non-pharmacological treatment for hypertensive individuals, but it is still unknown how it would act on the testicles of hypertensive individuals. The aim of this study was to investigate the effect of HIIT on testicular inflammation and on plasma hormone concentration in spontaneously hypertensive rats (SHR). Male SHR were divided into two groups: SHR (control, n=9); and HIIT (SHR undergoing HIIT on a treadmill, 5 days/week, for 8 weeks, n=10). Systolic blood pressure (SBP) was checked in the animals. At the end of the experiment, the animals were euthanized and the plasma and testes were collected. Fragments of one of the testicles of the rats were frozen and then used for RNA extraction using the TRIzol® protocol. Gene expressions of inflammatory mediators (Tnf α and Il6) were quantified by RT-qPCR. The combination of two reference genes (Hprt1 and Rps18) was used to normalize the reaction. The other testicle of the rats was used to make slides for the immunohistochemistry of TNF α and IL6. Plasma dosages of testosterone and corticosterone were performed by radioimmunoassay and prolactin by enzymeimmunoassay. The statistical analysis performed was unpaired Student's t test, except for testosterone which was the Mann-Whitney test ($P<0.05$). Animals that participated in HIIT had a lower SBP value. The groups did not show significant difference in the concentration of plasma hormones. The HIIT group had lower TNF α and IL6 immunostaining than the SHR and lower systolic blood pressure ($P<0.05$). It is concluded that HIIT for two months is effective in reducing inflammatory mediators in the testes of hypertensive rats.

Keywords: Physical exercise. IL6. Reproduction. RT-qPCR. TNF α .

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	10
	ANEXO A- APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE).....	34
	ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CIENTÍFICA JOURNAL OF HYPERTENSION.....	35

1 ARTIGO CIENTÍFICO

ARTIGO NAS NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA REPRODUCTIVE BIOLOGY

(Fator de Impacto = 2.376, Qualis B1 na Medicina Veterinária)

**TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE DIMINUI
MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NOS TESTÍCULOS DE RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Título curto: HIIT DIMINUI CITOCINAS TESTÍCULARES EM SHR

Ronivania Jenuario Silva NESPOLO^a; Allice Santos Cruz Veras^b; Lauren Chrys Soato Marin
SCHAFFER^a; Margarete Jardimetti de OLIVEIRA^a; Aline de Oliveira SANTOS^a; Evellin
Heloisa Paulineli PEREIRA^a; Francilene Lima Agostinho de SOUZA^{a,b}; Francis Lopes
PACAGNELLI^a; Caliê CASTILHO^a; Giovana Rampazzo TEIXEIRA^b; Ines Cristina
GIOMETTI^{a*}

^a UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista, Rodovia Raposo Tavares, Km 572, Bairro
Limoeiro, Presidente Prudente (SP), Brasil.

^b Unesp - Universidade Estadual Paulista, Rua Roberto Simonsen, 305 – Centro Educacional -
P. Prudente/SP - CEP 19060-900).

* Correspondence to Ines Cristina Giometti, UNOESTE, Km 572, Bairro Limoeiro, Presidente
Prudente (SP), CEP: 19067-175, Fone: +55-18-3229-2000, e-mail:
inesgiometti@yahoo.com.br

Declaração: Os autores declaram que não tem nenhum conflito de interesse.

Resumo

A hipertensão é uma das patologias relacionadas à idade que causa declínio no funcionamento de todos os sistemas orgânicos, incluindo o sistema reprodutor, pois está associada ao aumento do estresse oxidativo e inflamação. As citocinas inflamatórias aumentam com a hipertensão e provocam inflamação e injúria tecidual. O treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) tem se mostrado promissor como um tratamento não medicamentoso para indivíduos hipertensos, porém ainda não se tem conhecimento como atuaria sobre o sistema reprodutivo de indivíduos hipertensos. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do HIIT sobre as concentrações plasmáticas hormonais e na expressão de mediadores inflamatórios nos testículos de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Os SHR machos foram divididos em 2 grupos: SHR (controle, n=8) e HIIT (SHR submetidos ao HIIT em esteira por 8 semanas, n=9). A expressão dos mediadores inflamatórios (TNF α e IL6) no testículo e as concentrações de testosterona, prolactina e corticosterona plasmáticas foram verificadas. Os grupos não apresentaram diferenças significativas nas dosagens hormonais. Porém, o grupo HIIT apresentou menor imunomarcagem de TNF α e de IL6 que o SHR (P<0,05) e também apresentou menor pressão arterial sistólica. Concluimos que o HIIT por dois meses reduz os mediadores inflamatórios nos testículos de ratos hipertensos.

1. Introdução

A hipertensão arterial é a maior causa de morte prematura e o custo médico anual com hipertensão é estimado em \$370 bilhões no mundo inteiro [1]. A elevada pressão arterial é a principal causa de doença cardiovascular e provoca a morte de 10 milhões de pessoas ao ano [2]. Mais de dois terços da população mundial acima de 65 anos tem hipertensão [3].

A hipertensão provoca estresse oxidativo e inflamação que juntos são os responsáveis pelos danos vasculares, incluindo disfunção endotelial, hipertrofia vascular e fibrose [4–6]. Os mediadores inflamatórios da hipertensão, como o fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), estimulam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e com isso aumentam o fator indutor de hipóxia ($\text{HIF1}\alpha$) que causa hipóxia tecidual [4]. As citocinas inflamatórias (interferons, interleucinas, $\text{TNF}\alpha$) levam a uma infiltração de células T e macrófagos que contribuem para a injúria tecidual [5]. A interleucina 6 (IL6) aumenta com a hipertensão e tem um importante efeito nos vasos sanguíneos, incluindo ativação endotelial, recrutamento das células imunes, permeabilidade vascular, hipertrofia e fibrose vasculares e disfunção endotelial, contribuindo para o aumento da pressão arterial [6].

Aproximadamente, 700 milhões de homens em idade reprodutiva tem hipertensão [7]. É sabido que a hipertensão pode afetar os órgãos reprodutivos de humanos, causando diminuição na qualidade e volume do sêmen, na motilidade e quantidade de espermatozoides [8]. A qualidade espermática é um indicador da saúde masculina, visto que homens com uma espermatogênese normal apresentam maior longevidade [9]. A disfunção erétil em humanos apresenta correlação positiva com hipertensão [10]. A hipertensão também está correlacionada com menores níveis de testosterona total sérica e testosterona livre [11]. A hipertensão em ratos altera a morfologia dos túbulos seminíferos, diminui a espermatogênese [12], a concentração espermática, a motilidade e aumenta as anormalidades na morfologia espermática [13]. Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) têm alterações vasculares que

acarretam em desordens nos túbulos seminíferos, com consequente depleção das células germinativas e prejuízo na espermatogênese e apresentam menores reflexos de ereção também [14].

Várias citocinas inflamatórias, como $TNF\alpha$, $IL1\beta$, $IL6$ e $IL8$, estão elevadas no plasma seminal de homens com fertilidade prejudicada, apesar disso, a resposta imune celular em relação à fertilidade é pouco estudada [15]. Sabe-se que a leucocitospenia é associada à produção de ROS e de citocinas [15]. A $IL6$ do plasma seminal é correlacionada negativamente com a motilidade espermática e viabilidade espermática em humanos [16]. O receptor de $IL6$ ($IL6R$) foi detectado na peça intermediária do espermatozoide humano e existe uma positiva correlação entre a sua imunolocalização com o nível de $IL6$ no plasma seminal e contagem espermática e uma negativa correlação de $IL6R$ com a motilidade espermática [15]. O aumento de macrófagos e $IL6$ nos testículos pode influenciar negativamente a espermatogênese por uma perturbação na barreira sanguínea e infertilidade [17]. Além disso, os níveis de $TNF\alpha$ e $IL6$ estão aumentados no plasma seminal de homens obesos, afetando a qualidade espermática [18]. Em outro trabalho o aumento de $IL6$ e $TNF\alpha$ foi verificado em homens com varicocele [19].

Comprovadamente, os exercícios físicos reduzem os riscos de incidentes cardiovasculares em indivíduos hipertensos [20] e os efeitos na hipertensão e na mortalidade dependem do tipo de exercício físico [21,22]. As mais vigorosas atividades físicas, como as corridas, são atribuídas a menores riscos de mortalidade por hipertensão [23]. Alguns estudos têm evidenciado que os exercícios de alta intensidade intervalados (HIIT) também podem ser indicados para cardiopatas [24,25]. Em camundongos obesos, tanto os exercícios físicos moderados quanto os de alta intensidade diminuem a gordura corporal, mas apenas os exercícios físicos moderados são capazes de diminuir o estresse oxidativo e a inflamação na função reprodutiva, melhorando a biossíntese de testosterona e a qualidade espermática [26].

Sendo assim, o objetivo do presente estudo é verificar o efeito do HIIT na expressão de mediadores inflamatórios (TNF α e IL6) em testículos e na concentração hormonal de SHR.

2. Material e métodos

2.1. Animais experimentais

Foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR), com 12 meses de idade no início do experimento e a média de peso (g) dos animais era de 315,66 (305,3-329,1). Os ratos foram divididos em 2 grupos: SHR (SHR que não realizaram HIIT, n=9); e HIIT (SHR que realizaram o HIIT com n=10). Os animais foram alocados em caixas plásticas com dimensão 41x34x16cm, contendo de 3-5 animais em cada caixa, com temperatura de 21° a 23° C e umidade relativa do ar de 50% a 60%, com ciclos invertido de luminosidade de 12 h claro-escuro e receberam ração e água *ad libitum*.

Todos os protocolos experimentais que foram utilizados estavam em conformidade com os princípios de cuidados com animais de laboratório formulado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicado pelo *National Research Council*. Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente (SP), número de protocolo 4418.

2.2. Treinamento HIIT

Após o período de adaptação de uma semana, em cinco dias consecutivos, na esteira adaptada para roedores (modelo TK 1, IMBRAMED) [27], o protocolo de treinamento foi realizado em por um período de 8 semanas, com 5 sessões por semana de aproximadamente 50 minutos por treino (Fig.1) [28,29], levando em conta a velocidade máxima de exaustão. Os

151 ratos foram considerados em exaustão quando eles se recusavam a correr mesmo após a
152 estimulação ou quando ficaram incapazes de coordenar os passos [30].

154 2.3. Pressão arterial sistólica (PAS)

155 Para avaliar o controle pressórico foi verificada a PAS por pletismografia, com uso do
156 método do manguito de cauda (Narco Bio-System®, modelo 709-0610, International
157 Biomedical, Inc, EUA), antes e após o período do treinamento. Antes da aferição, os animais
158 foram aquecidos a 37° C por 15 minutos, promovendo a dilatação da artéria caudal. Foi
159 calculado o percentual da variação da PAS (Δ): $[(\text{valor final} - \text{valor inicial}) \div \text{valor inicial}] \times$
160 100 [31].

162 2.4. Colheita dos órgãos

163 Dois dias após o final do programa HIIT, os animais foram pesados e anestesiados
164 com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip) e
165 eutanasiados por decapitação. Partes dos testículos direitos dos ratos foram colhidos e imersos
166 em TRIzol® (ThermoFisher Scientific®), congelados imediatamente em nitrogênio líquido e
167 armazenadas em freezer -80°C para serem utilizados na análise de expressão gênica dos genes
168 *Il6* e *Tnfa*. Os testículos esquerdos foram colhidos, limpos e imersos em solução fixadora de
169 Methacarn (60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido aceto acético). Após 24
170 horas, as peças foram lavadas e a solução foi substituída por álcool 70%, onde as peças
171 permaneceram até o processamento. Então, o material foi incluso em parafina Paraplast para a
172 obtenção de cortes com espessura de 3 μm e submetidos à imunohistoquímica para detecção
173 de proteínas de IL6 e TNF α .

175 2.5. Expressão gênica

Para a análise da RT-qPCR, os testículos armazenados em TRIzol® (ThermoFisher Scientific®) no freezer a -80°C foram triturados em homogeneizador de tecidos e submetidos ao protocolo de extração do TRIzol®. A concentração do RNA total recuperado foi mensurada por espectrofotometria. Todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas à transcrição reversa (RT) seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), conforme as instruções do protocolo DNase I – Amplification Grade (Invitrogen®).

A RT foi realizada utilizando o protocolo da High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®) seguindo protocolo do fabricante com oligonucleotídeos iniciadores randômicos.

A qPCR foi realizada para a análise quantitativa da expressão gênica relativa. Como controle interno das reações de qPCR foram utilizados 3 genes referência, a fim de normalizar os resultados obtidos para o gene-alvo. Os oligonucleotídeos iniciadores foram obtidos a partir de ensaios TaqMan® (Applied Biosystems®, Foster, USA), já padronizados conforme descrição a seguir, para os gene-alvos: *Tnfa*, GeneBank: NM_012675.3, Produto: 92pb; *Il6*, GeneBank: NM_012589.2, Produto: 90pb e para os genes de referência: proteína ribossômica S18 (*Rps18*), GeneBank: MN_213557.1, Produto: 62pb; gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*Gapddh*), GeneBank: MN_017008.3, Produto: 175pb e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1 (*Hprt1*), GeneBank: MN_012583.2, Produto: 64pb,

As PCRs foram conduzidas em duplicatas para cada amostra e a expressão gênica foi determinada pela quantificação em relação ao gene referência. O cálculo das eficiências para os genes alvo e controle foi realizado por meio da curva padrão relativa com diluições seriadas. Para quantificação relativa das amplificações foi empregado o método de Pfaffl [32]. A melhor combinação dos genes de referência foi escolhido utilizando o programa NormFinder® (MOMA, Dinamarca).

2.6. Análises Imunohistoquímicas

Amostras dos testículos dos animais foram utilizadas para as imunomarcações de TNF- α e IL-6. De acordo com as características de cada antígeno, a recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato por panela de pressão durante 10 minutos. Para o bloqueio da peroxidase endógena, os cortes foram submetidos a solução de peróxido de hidrogênio+metanol (3% em metanol), o bloqueio proteico foi realizado pela incubação em solução bloqueadora com albumina soro bovino (BSA 5%), com tampão TBS-T em temperatura ambiente. Na etapa seguinte, as seções foram submetidas à reação com os anticorpos primários específicos TNF- α (1:50, 52B83, sc-257) e IL-6 (1:50, E-4, sc-28343), incubadas em câmara úmida overnight a 4°C na geladeira. Os cortes foram incubados com anticorpos secundário m-IgGK (1:200, IgG-HRP, sc-516 conjugado) em temperatura ambiente por 2 horas, revelados com diaminobenzidina (DAB 1:50 diluído em peróxido de hidrogênio a 3% por 3 minutos), contra corados com Hematoxilina de Harris por 3 minutos, e avaliados no fotomicroscópio Zeiss Axiophoto (Zeiss, Munique, Alemanha). As imagens foram adquiridas, 4 animais por grupo, utilizando o fotomicroscópio de Zeiss Axiophoto (Zeiss, Munique, Alemanha) com ampliação de 40x e quantificadas em Image-J (versão 1.5).

2.7. Dosagens hormonais

Após a decapitação dos animais, o sangue (2 mL) foi colhido em tubos com anticoagulante EDTA, o plasma removido após centrifugação e armazenado em freezer a -30°C. As dosagens hormonais plasmáticas foram realizadas em duplicatas. O radioimunoensaio para testosterona direta foi realizado em um único ensaio com o kit (Immunotech - Beckman Couter, França), com capacidade de ligação de 60%, sensibilidade de 90% (0,02 ng/mL) e coeficiente de variação intraensaio de 6,81% (baixo) e 4,49% (alto). O

radioimunoensaio de corticosterona foi realizado em um único ensaio com kit comercial específico para ratos (MP Biomedicals Inc, EUA), com capacidade de ligação de 57%, sensibilidade de 90% (1,52 ng/mL) e coeficiente de variação intraensaio de 4,96% (baixo) e 3,35% (alto). Já a prolactina foi dosada por um único ensaio de enzimaensaio com kit comercial de ratos (EZ Internacional Trading CORP, EUA), com sensibilidade de 89% (0,40 ng/mL) e coeficiente de variação intraensaio de 4,68% (baixo) e 5,41% (alto).

2.8. Análise estatística

Os resultados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalização dos dados. Todas as variáveis foram analisadas por Teste T não pareado, exceto a dosagem de testosterona que não seguiu uma distribuição normal e foi submetida ao teste de Mann-Whitney. Diferenças foram consideradas com $P < 0.05$.

3. Resultados

Os animais HIIT apresentaram menores valores de PAS ($P = 0,0089$) que os animais do grupo SHR, conforme apresentado na Figura 2.

Para a expressão gênica relativa optou-se pela combinação do *Hprt1* e do *Rps18* como normalizador de reação, pela sua estabilidade no programa NormFinder®. Porém, qualquer um dos três genes de referência testados (*Gapdh*, *Hprt1* e *Rps18*) tiveram valores inferiores a 0,5 no NormFinder® nesse delineamento experimental e poderiam servir como normalizadores de reação. Não houve diferença entre os dois grupos experimentais na abundância relativa de RNAm de *Tnfa* ($P = 0,5606$) e de *Il6* ($P = 0,4617$) nos testículos (Figura 3).

Com relação à imunohistoquímica (figura 4), os testículos dos animais do grupo SHR apresentaram maior imunomarcção de IL6 ($P=0,280$) e de $TNF\alpha$ ($P=0,0042$) em relação aos HIIT.

As concentrações plasmáticas de testosterona, prolactina e corticosterona não diferiram entre os dois grupos experimentais (SHR e HIIT), $P=0,4622$, $P=0,7643$ e $P=0,0872$, respectivamente. Os dados estão apresentados na figura 5.

4. Discussão

Como esperado, o HIIT foi capaz de diminuir a PAS nos animais hipertensos. Os SHR nascem normotensos, mas começam a desenvolver hipertensão aos 2 a 4 meses de vida e já têm uma hipertensão sustentada aos 6 meses de vida [14], os animais iniciaram esse experimento já com 12 meses de vida. Além da pressão alta elevada, os SHR apresentam múltiplas complicações microvasculares que alteram a estrutura e o funcionamento vasculares capazes de afetar a fertilidade dos animais [14].

Embora os dados de expressão gênica tenham apresentado uma tendência à diminuição na abundância de RNAm de *Il6* e *Tnfα* no grupo HIIT, não foi detectada diferença estatística entre os grupos. Porém, houve uma redução significativa na síntese dessas citocinas inflamatórias nos testículos dos animais com hipertensão que praticaram o HIIT, demonstrando que essa modalidade de treinamento físico pode ser efetiva para uma diminuição de mediadores inflamatórios testiculares causados pela hipertensão. Já foi demonstrado que a IL6 está aumentada no plasma seminal de homens com fertilidade prejudicada [15]. As citocinas agem em conjunto em uma rede, podendo prejudicar a espermatogênese [33]. Há uma correlação negativa entre a motilidade espermática e IL6 no plasma seminal [16]; também com os receptores de IL6 nos espermatozoides [15]. Além disso, há uma diminuição da motilidade espermática pela IL6 [15].

Isso mostra um efeito benéfico do HIIT para as células testiculares de indivíduos hipertensos. Tanto a IL6 quanto o TNF α no plasma seminal são positivamente correlacionados com a obesidade e podem afetar a qualidade espermática [18]. Em indivíduos obesos, houve diminuição da motilidade e concentração espermáticas e aumento do IL6 no plasma seminal, comparado aos indivíduos que não eram obesos [18]. A obesidade é um dos fatores que levam ao aumento da pressão sanguínea e sabe-se que a hipertensão pode causar diminuição na concentração e motilidade dos espermatozoides [8]. A hipertensão afeta a função vascular e a inflamação e o estresse oxidativo estão envolvidos nesse processo [5]. Na hipertensão, os mediadores inflamatórios, como TNF α , estimulam o estresse oxidativo [4] e a IL6 aumenta o recrutamento de células imunes e a permeabilidade vascular, contribuindo para maior injúria tecidual [6].

O HIIT não alterou a concentração plasmática de testosterona nos SHR, porém os SHR apresentam níveis sanguíneos de testosterona equivalentes aos ratos da linhagem Wistar-Kyoto normotensos (linhagem de origem dos SHR) [34] e superiores a dos Long-Evans normotensos [35]. A hipertensão está correlacionada com baixos níveis de testosterona em homens [36–38], o locus cromossômico responsável pela elevada pressão corporal dos SHR fica no cromossomo Y e sua expressão máxima depende de testosterona e do receptor de andrógeno, de tal forma, que a atividade da enzima esteroide sulfatase é aumentada nos testículos, enzima responsável pela hidrólise do sulfato dos esteroides para a forma ativa desses hormônios [39]. Os machos SHR têm pressões sanguíneas maiores que as fêmeas SHR [39]. Provavelmente a etiologia da infertilidade dos SHR está relacionada aos danos vasculares [14].

O HIIT não alterou as concentrações plasmáticas de prolactina e corticosterona. Ambos hormônios aumentam em situações de estresse agudo [40]. Tan e Hutchinson [41] não encontraram diferença significativa nos níveis de prolactina entre os SHR e os ratos Wistar-

Kyoto, embora os SHR tenham apresentado concentrações maiores de prolactina. Os SHR também respondem com maiores níveis de prolactina ao estresse [40]. A prolactina aumenta a responsividade das células de Leydig ao LH e o tratamento de LH combinado à prolactina aumenta a produção de testosterona em ratos [42].

Os SHR apresentam maiores concentrações de corticosterona e cortisol que os Wistar-Kyoto com 10 semanas de idade [34], provavelmente porque os glicocorticoides estão envolvidos na regulação da pressão sanguínea [43]. O cortisol e a corticosterona estão relacionados com resposta inflamatória e o aumento dos mesmos diminui as citocinas inflamatórias [34]. Apesar disso, não foi observado aumento da corticosterona plasmática no grupo que praticou HIIT e houve uma significativa diminuição das citocinas inflamatórias.

5. Conclusão

Conclui-se que o HIIT é benéfico para diminuir a pressão arterial sistólica e os mediadores inflamatórios do testículo de indivíduos hipertensos, sem alterar as concentrações plasmáticas de testosterona, prolactina e corticosterona.

Agradecimentos

Agradecemos a FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro (Processo nº 2018/22682-0) e ao CNPq pela bolsa de PIBIC-EM.

Referências

- [1] Saco-Ledo G, Valenzuela PL, Ruiz-Hurtado G, Ruilope LM, Lucia A. Exercise Reduces Ambulatory Blood Pressure in Patients With Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Journal of the American Heart Association* 2020;9:1–15. doi:10.1161/JAHA.120.018487.
- [2] Frieden TR, Jaffe MG. Saving 100 million lives by improving global treatment of hypertension and reducing cardiovascular disease risk factors. *The Journal of Clinical Hypertension* 2018;20:208–11. doi:10.1111/jch.13195.
- [3] Sun Z. Aging, arterial stiffness, and hypertension. *Hypertension* 2015. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03617.
- [4] Handy DE, Loscalzo J. Responses to reductive stress in the cardiovascular system. *Free Radical Biology and Medicine* 2017. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.006.
- [5] Guzik TJ, Touyz RM. Oxidative Stress, Inflammation, and Vascular Aging in Hypertension. *Hypertension* 2017;70:660–7. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.07802.
- [6] Didion SP. Cellular and oxidative mechanisms associated with interleukin-6 signaling in the vasculature. *International Journal of Molecular Sciences* 2017. doi:10.3390/ijms18122563.
- [7] Mills KT, Bundy JD, Kelly TN, Reed JE, Kearney PM, Reynolds K, et al. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control. *Circulation* 2016;134:441–50. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018912.
- [8] Guo D, Li S, Behr B, Eisenberg ML. Hypertension and Male Fertility. *The World Journal of Men's Health* 2017;35:59–64. doi:10.5534/wjmh.2017.35.2.59.
- [9] Colli LG, Belardin LB, Echem C, Akamine EH, Antoniassi MP, Andretta RR, et al. Systemic arterial hypertension leads to decreased semen quality and alterations in the testicular microcirculation in rats. *Scientific Reports* 2019;9:11047. doi:10.1038/s41598-019-47157-w.

- [10] Foy CG, Newman JC, Berlowitz DR, Russell LP, Kimmel PL, Wadley VG, et al. Blood Pressure, Sexual Activity, and Erectile Function in Hypertensive Men: Baseline Findings from the Systolic Blood Pressure Intervention Trial (SPRINT). *The Journal of Sexual Medicine* 2019;16:235–47. doi:10.1016/j.jsxm.2018.12.007.
- [11] Navaneethabalakrishnan S, Goodlett BL, Lopez AH, Rutkowski JM, Mitchell BM. Hypertension and reproductive dysfunction: a possible role of inflammation and inflammation-associated lymphangiogenesis in gonads. *Clinical Science* 2020;134:3237–57. doi:10.1042/CS20201023.
- [12] Altıntaş Aykan D. The effects of sacubitril/valsartan and ramipril on the male fertility in hypertensive rats. *Northern Clinics of Istanbul* 2020;7:425–432. doi:10.14744/nci.2020.30906.
- [13] Akomolafe SF, Olasehinde TA, Oladapo IF, Oyeleye SI. Diet Supplemented with *Chrysophyllum albidum* G. Don (Sapotaceae) Fruit Pulp Improves Reproductive Function in Hypertensive Male Rats. *Reproductive Sciences* 2021. doi:10.1007/s43032-021-00746-5.
- [14] Azu OO. Testicular morphology in spontaneously hypertensive rat model: oxidant status and stereological implications. *Andrologia* 2015;47:123–37. doi:10.1111/and.12233.
- [15] Djourabchi Borojerdi AS, Welchowski T, Peng W, Buchen A, Novak N, Haidl G, et al. Human spermatozoa of male patients with subfertility express the interleukin-6 receptor. *Andrologia* 2020;52:1–7. doi:10.1111/and.13511.
- [16] Kopa Z, Wenzel J, Papp GK, Haidl G. Role of granulocyte elastase and interleukin-6 in the diagnosis of male genital tract inflammation. *Andrologia* 2005;37:188–94. doi:10.1111/j.1439-0272.2005.00676.x.
- [17] Hussein MR, Abou-Deif ES, Bedaiwy MA, Said TM, Mustafa MG, Nada E, et al. Phenotypic characterization of the immune and mast cell infiltrates in the human testis shows normal and abnormal spermatogenesis. *Fertility and Sterility* 2005. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.11.062.
- [18] Han R-Y, Ma J, Ma J-Y, Wang X-C, An X-T, Zhang Z-D, et al. [Correlation of semen

- parameters with inflammatory factors in the seminal plasma of obese males]. *Zhonghua Nan Ke Xue* = National Journal of Andrology 2017.
- [19] Micheli L, Collodel G, Cerretani D, Menchiari A, Noto D, Signorini C, et al. Relationships between Ghrelin and Obestatin with MDA, Proinflammatory Cytokines, GSH/GSSG Ratio, Catalase Activity, and Semen Parameters in Infertile Patients with Leukocytospermia and Varicocele. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019;2019:1–9. doi:10.1155/2019/7261842.
- [20] Li W, Wang D, Wu C, Shi O, Zhou Y, Lu Z. The effect of body mass index and physical activity on hypertension among Chinese middle-aged and older population. *Scientific Reports* 2017 7:1 2017;7:1–7. doi:10.1038/s41598-017-11037-y.
- [21] Oja P, Kelly P, Pedisic Z, Titze S, Bauman A, Foster C, et al. Associations of specific types of sports and exercise with all-cause and cardiovascular-disease mortality: a cohort study of 80 306 British adults. *British Journal of Sports Medicine* 2017;51:812–7. doi:10.1136/bjsports-2016-096822.
- [22] MacDonald C, Madika A, Lajous M, Laouali N, Artaud F, Bonnet F, et al. Associations Between Physical Activity and Incident Hypertension Across Strata of Body Mass Index: A Prospective Investigation in a Large Cohort of French Women. *Journal of the American Heart Association* 2020;9. doi:10.1161/JAHA.119.015121.
- [23] Wen CP, Wai JPM, Tsai MK, Yang YC, Cheng TYD, Lee M-C, et al. Minimum amount of physical activity for reduced mortality and extended life expectancy: a prospective cohort study. *The Lancet* 2011;378:1244–53. doi:10.1016/S0140-6736(11)60749-6.
- [24] Ciolac EG, Bocchi EA, Greve JMD, Guimaraes G V. Heart rate response to exercise and cardiorespiratory fitness of young women at high familial risk for hypertension: effects of interval vs continuous training. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation* : Official Journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on

- 393 Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology 2011;18:824–
394 30. doi:10.1177/1741826711398426.
- 395 [25] Tjønnå AE, Lee SJ, Rognmo Ø, Stølen TO, Bye A, Haram PM, et al. Aerobic interval training
396 versus continuous moderate exercise as a treatment for the metabolic syndrome: A pilot study.
397 Circulation 2008;118:346–54. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.772822.
- 398 [26] Yi X, Tang D, Cao S, Li T, Gao H, Ma T, et al. Effect of Different Exercise Loads on
399 Testicular Oxidative Stress and Reproductive Function in Obese Male Mice. Oxidative
400 Medicine and Cellular Longevity 2020;2020:1–13. doi:10.1155/2020/3071658.
- 401 [27] Pacagnelli FL, Okoshi K, Campos DHS, Alves De Souza RW, Padovani CR, Carvalho RF, et
402 al. Physical training attenuates cardiac remodeling in rats with supra-aortic stenosis.
403 Experimental and Clinical Cardiology 2014;20:3889–905.
- 404 [28] Moreira JBN, Bechara LRG, Bozi LHM, Jannig PR, Monteiro AWA, Dourado PM, et al. High-
405 versus moderate-intensity aerobic exercise training effects on skeletal muscle of infarcted rats.
406 Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md : 1985) 2013;114:1029–41.
407 doi:10.1152/jappphysiol.00760.2012.
- 408 [29] Zamberlan Ferreira N, Lima Agostinho de Souza F, Bruno Mariano T, Carrara B, Collegio G,
409 Orlandelli Molinari A, et al. EFEITO HIPOTENSOR DO EXERCÍCIO INTERVALADO DE
410 ALTA INTENSIDADE EM ANIMAIS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS.
411 COLLOQUIUM VITAE 2017;9:31–5. doi:10.5747/cv.2017.v09.n3.v206.
- 412 [30] Rossoni L V., Oliveira RAF, Caffaro RR, Miana M, Sanz-Rosa D, Koike MK, et al. Cardiac
413 benefits of exercise training in aging spontaneously hypertensive rats. Journal of Hypertension
414 2011;29:2349–58. doi:10.1097/HJH.0b013e32834d2532.
- 415 [31] Okoshi K, Ribeiro HB, Okoshi MP, Matsubara BB, Gonçalves G, Barros R, et al. Improved
416 Systolic Ventricular Function With Normal Myocardial Mechanics in Compensated Cardiac
417 Hypertrophy. Japanese Heart Journal 2004;45:647–56. doi:10.1536/jhj.45.647.

- 418 [32] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.
419 Nucleic Acids Research 2001;29:e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45.
- 420 [33] Seshadri S, Bates M, Vince G, Jones DIL. ORIGINAL ARTICLE: The Role of Cytokine
421 Expression in Different Subgroups of Subfertile Men. American Journal of Reproductive
422 Immunology 2009;62:275–82. doi:10.1111/j.1600-0897.2009.00736.x.
- 423 [34] Kozłowska A, Wojtacha P, Równiak M, Kolenkiewicz M, Tsai M-L. Differences in serum
424 steroid hormones concentrations in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) – an animal model
425 of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). Physiological Research 2019;25–36.
426 doi:10.33549/physiolres.933907.
- 427 [35] Clark JT, Sahu A, Mrotek JJ, Kalra SP. Sexual function and neuropeptide Y levels in selected
428 brain regions in male spontaneously hypertensive rats. American Journal of Physiology-
429 Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 1991;261:R1234–41.
430 doi:10.1152/ajpregu.1991.261.5.R1234.
- 431 [36] Erenpreiss J, Fodina V, Pozarska R, Zubkova K, Dudorova A, Pozarskis A. Prevalence of
432 testosterone deficiency among aging men with and without morbidities. The Aging Male
433 2020;23:901–5. doi:10.1080/13685538.2019.1621832.
- 434 [37] Wang C, Jackson G, Jones TH, Matsumoto AM, Nehra A, Perelman MA, et al. Low
435 Testosterone Associated With Obesity and the Metabolic Syndrome Contributes to Sexual
436 Dysfunction and Cardiovascular Disease Risk in Men With Type 2 Diabetes. Diabetes Care
437 2011;34:1669–75. doi:10.2337/dc10-2339.
- 438 [38] Kelly DM, Jones TH. Testosterone: a metabolic hormone in health and disease. Journal of
439 Endocrinology 2013;217:R25–45. doi:10.1530/JOE-12-0455.
- 440 [39] Johnson ML, Ely DL, Turner ME. Steroid sulfatase and the Y chromosome hypertensive locus
441 of the spontaneously hypertensive rat. Steroids 1995;60:681–5. doi:10.1016/0039-
442 128X(95)00091-4.

- [40] Wexler BC, Iams SG, McMurtry JP. Pathophysiological differences between obese and non-obese spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Experimental Pathology* 1980;61:195–207.
- [41] Tan BKH, Hutchinson JS. PLASMA AND PITUITARY PROLACTIN AND BLOOD PRESSURE IN BROMOCRIPTINE-TREATED SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE AND WISTAR-KYOTO RATS. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 1987;14:797–803. doi:10.1111/j.1440-1681.1987.tb01871.x.
- [42] Bartke A, Dalterio S. Effects of Prolactin on the Sensitivity of the Testis to LH1. *Biology of Reproduction* 1976;15:90–3. doi:10.1095/biolreprod15.1.90.
- [43] Ohanian J, Heagerty AM. The phosphoinositide signaling system and hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 1992;1:73–82. doi:10.1097/00041552-199210000-00011.

2 Grupos:



SHR-G ratos espontaneamente hipertensos (SHR), sem treinamento



SHR-HIIT-G – SHR, com treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT)

HIIT
5 dias/semana
(~50 minutos)
Corrida em esteira
por 4 minutos
com intervalos de 6
minutos

Semanas	Treinamento
-1	Adaptação - 6m/min por 5 min
	Teste de capacidade máxima
1ª	5 x 100% da V _{máx} e intervalo de 60% da V _{máx}
2ª e 3ª	6 x 100% da V _{máx} e intervalo de 60% da V _{máx}
4ª	7 x 100% V _{máx} e intervalo de 60% V _{máx}
	Teste de capacidade máxima
5ª e 6ª	7 x 100% V _{máx} e intervalo de 60% V _{máx}
7ª	7 x 100% V _{máx} e intervalo de 60% V _{máx} com aumento gradativo diário de 3% até atingir 15%
8ª	7 x 100% V _{máx} e intervalo de 60% V _{máx} com aumento gradativo diário de 3% até atingir 18%

465

466 Figura 1. Delineamento experimental da divisão dos grupos e do treinamento intervalado de
 467 alta Intensidade (HIIT), em que o grupo SHR-HIIT foi submetido. V_{máx} = Velocidade
 468 máxima de exaustão, que foi considerada como o momento em que o rato se recusava a correr
 469 mesmo após a estimulação ou quando ficaram incapazes de coordenar os passos.

470

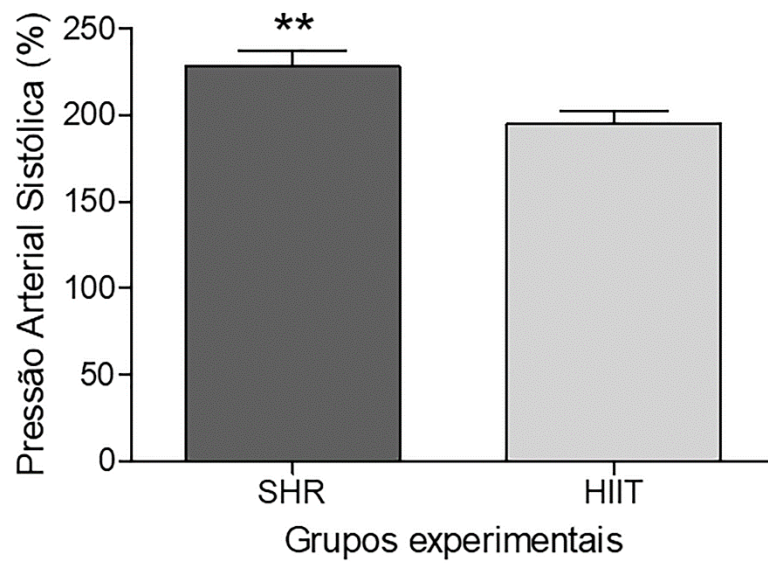


Figura 2. Médias $\pm$ erros padrões da média dos valores do percentual da variação da pressão arterial sistólica (Δ): $[(\text{valor final} - \text{valor inicial}) \div \text{valor inicial}] \times 100$ dos animais dos diferentes grupos: experimentais: SHR (ratos espontaneamente hipertensos, n=9); e HIIT (ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao treinamento HIIT em esteira, n=10). Test T não pareado. Asteriscos representam diferenças entre colunas (P=0,0089).

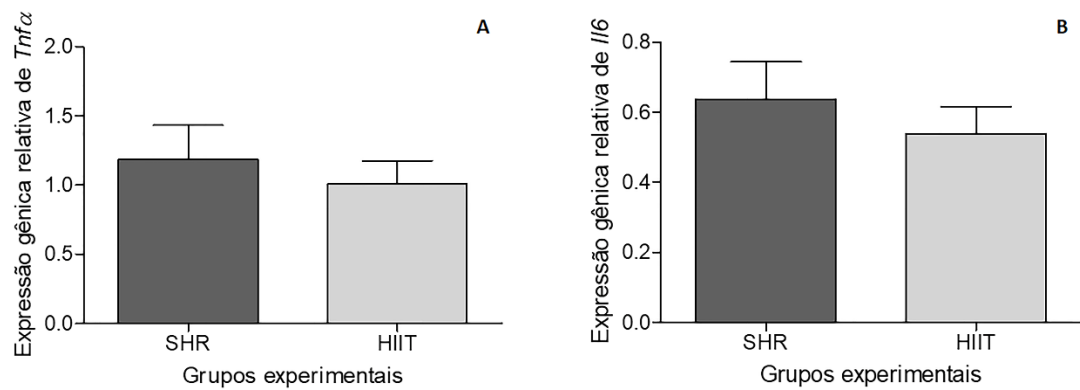


Figura 3. Expressão gênica relativa dos genes-alvo, *Tnfa* (A) e *Il6* (B), no testículo de ratos. Grupos experimentais: SHR (ratos espontaneamente hipertensos, n=9); e SHR-HIIT (ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao treinamento HIIT em esteira, n=10). A combinação dos genes referências, *Hprt1* e *RPS18*, foi utilizada como normalizador da reação. Test T não pareado. Não houve diferença significativa entre os grupos ($P>0,05$)

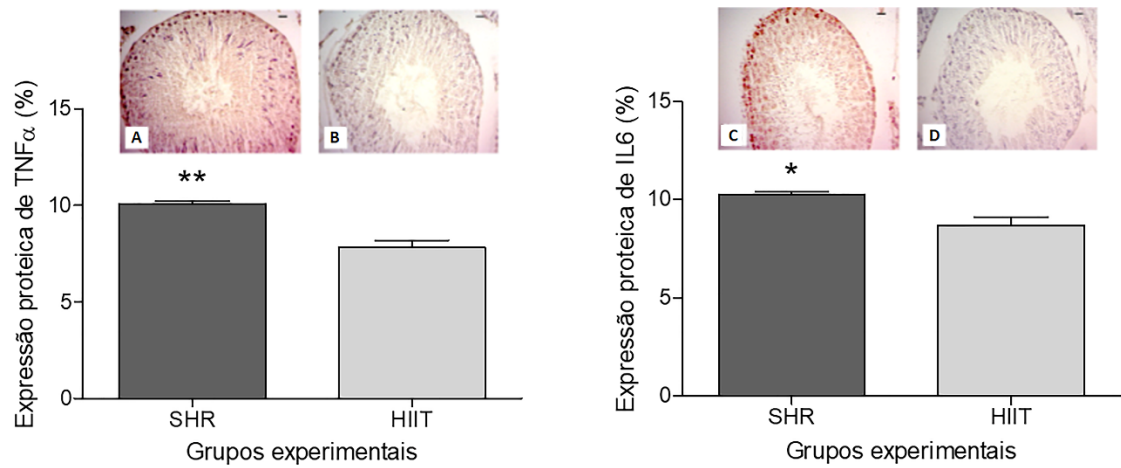


Figura 4. Expressão proteica de TNF α (A e B) e IL6 (C e D) no testículo de ratos dos seguintes grupos: SHR (ratos espontaneamente hipertensos, n=3, A e C); e HIIT (ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao treinamento HIIT em esteira, n=4, B e D), Teste T não pareado. Os asteriscos correspondem a diferenças significativas entre os grupos (* P=0,0280, ** P=0,0042).

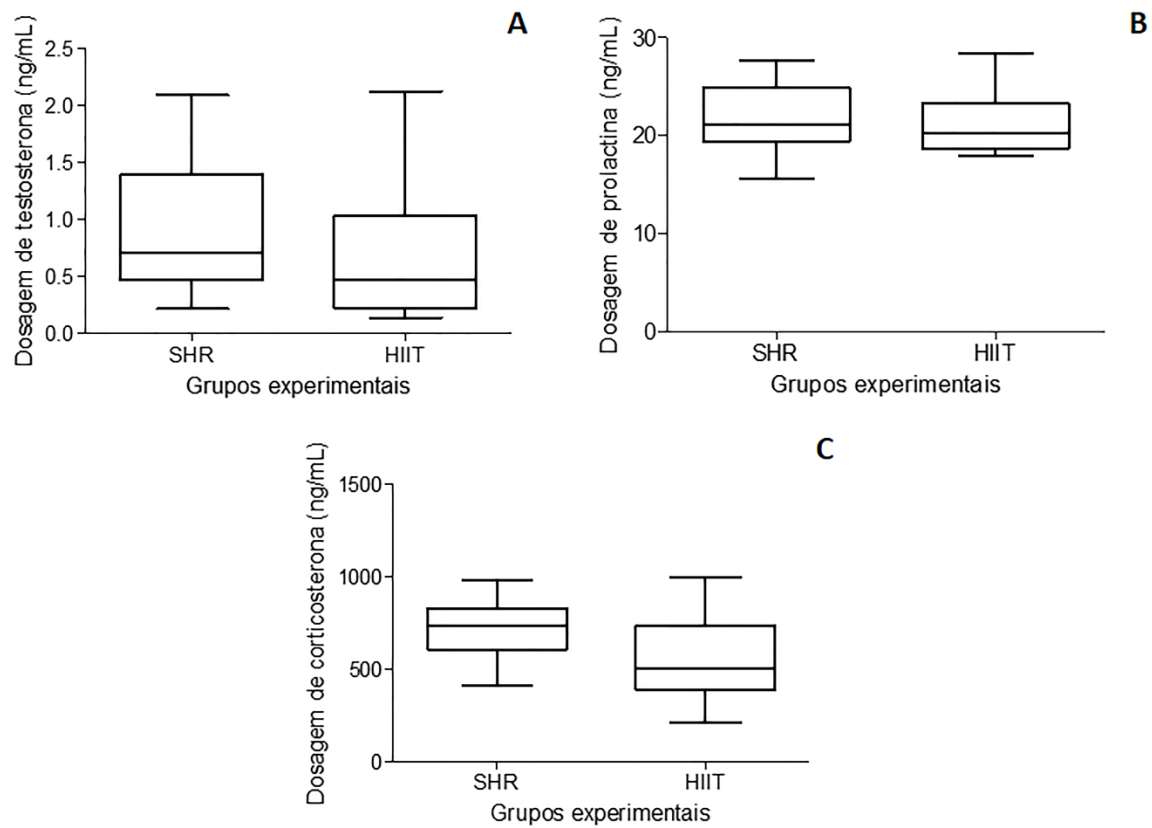


Figura 5. Concentrações plasmáticas de testosterona, prolactina e corticosterona em dois grupos experimentais: SHR (ratos espontaneamente hipertensos, n=9); e HIIT (ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao treinamento HIIT em esteira, n=10), Teste T não pareado para corticosterona e prolactina, teste de Mann-Whitney para a testosterona. Não houve diferença entre os grupos ($P>0,05$).

ANEXO A – APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE)

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "EXPRESSÃO GÊNICA DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM TESTÍCULOS DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS SUBMETIDOS AO TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE.", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 6323 e tendo como participante(s) ALINE DE OLIVEIRA SANTOS (discente), RONIVANIA JENUARIO SILVA NESPOLO (discente), EVELLIN HELOISA PAULINELI PEREIRA (discente), GIOVANA RAMPAZZO TEIXEIRA (participante externo/voluntário), FRANCIS LOPES PACAGNELLI (docente), INES CRISTINA GIOMETTI CEDA (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, 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 da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 06/05/2020.

Este Projeto de Pesquisa, 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 da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 06/05/2020.

MATERIAL ARMAZENADO/DOADO

Protocolo(s)	Data Aprovação	Armazenado (local)	É doação	Detalhes armazenamento
1167-2016	25/02/2016	UNOESTE	SIM	No freezer a -80C no laboratório de genética molecular

Presidente Prudente, 10 de Abril de 2021.


Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CPDI


Profª Dra. Adriana Faló de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação - CPDI - 18 3229-2079 - cpdi@unoeste.br
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP - 18 3229-2079 - cep@unoeste.br
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA - 183229-2079 - ceua@unoeste.br

valide este documento em www.unoeste.br/sgp informando o código de segurança f3bcdad4bc5fa3761634d218f3f40de1

ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CIENTÍFICA JOURNAL OF HYPERTENSION

Guide for Authors



[Download Guide for Authors in PDF](#)



Introduction

Criteria for manuscripts

The Editorial Board of *Reproductive Biology* considers for publication the original articles under the understanding that neither the manuscript nor any part of its essential substance, tables or figures have previously been published in print form or electronically, and are not submitted to any other journal or electronic medium. Each submission packet should include the statement signed by the corresponding author that the work has not been published previously or submitted elsewhere for review, and a copyright transfer form.

Types of article

Accepted papers are published in the following journal sections:

- **Research papers** (max. 55,000 characters without spaces, excluding abstract and references, References 60 or less, Abstract: up to 250 words, unstructured (i.e., no subheadings), keywords: 3-5, text divided into numbered sections: Introduction, Material and methods, Results, Discussion (more information <https://www.elsevier.com/journals/reproductive-biology/1642-431X/guide-for-authors#25000>)): **scientifically sound and containing novel mechanistic data manuscripts on reproduction, dealing generally with human or farm animal reproduction as well as the reproductive aspects in rodents with a clinical relevance would have priority for publication.**
- **Mini-reviews** (25,000 characters without spaces, excluding abstract and references, up to 30 references, abstract up to 200 words, unstructured manuscript (i.e., no subheadings), 3-5 keywords, 1 table and/or 1 figure): Mini-reviews address a specific topic and represent literature review and author opinions. Generally, the Editorial Board invites mini-reviews, but exceptional unsolicited mini-review manuscripts will also be considered.
- **Review papers** (55,000 words, structured manuscript with subheading with similar conditions as research papers) are published under the invitation from the Editorial Board.
- **Requirements for short communications and technical notes** (see articles published previously in *Reproductive Biology*). **Only** very highly focused manuscripts that highlight research breakthroughs requiring an accelerated publication (short communications), and novel technical methodologies or hypotheses in the reproductive sciences or transgenic models that may provide a strong foundation for innovative research in the future would be considered in this category (technical notes).
- **Short communications** (16,000 characters without spaces): Abstract should consist of 5-6 lines only, Introduction of no more than 2 paragraphs, Materials and Methods section should be undivided into subheadings, and Results and Discussion combined into one part. Limit the number of tables/figures to 2-3, References limited to 15.

- **Technical notes** (14,000 characters without spaces): Summary should consist of 5-6 lines, an expanded Methods and Materials section; Introduction of maximum 2-3 paragraphs, and Results and Discussion combined into one part. References limited to a number of 15.

Detailed and specific manuscript preparation information is written below in the section "manuscript preparation information".

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- Include **full** Authors' names
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.



Before You Begin

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to

differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Language (usage and editing services)

Please prepare your manuscript in the English language (American or British English is accepted, but not a mixture of both). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop <https://webshop.elsevier.com/language-editing-services/language-editing/> or visit our customer support site <https://service.elsevier.com> for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/repbio>.

Review process

Manuscripts are evaluated on the basis that they present new insights into the investigated topic and are likely to contribute to scientific progress. It is understood that all authors listed on a manuscript have agreed to its submission; the signature of the corresponding author on the letter of submission signifies that this condition has been fulfilled. Initially, the Editors of *Reproductive Biology* pre-evaluate all received manuscripts. Manuscripts with insufficient priority for publication are rejected promptly. Incomplete packages or manuscripts not prepared in compliance with the required quality or advised style will be sent back to authors without scientific review. The authors are notified with the reference number upon manuscript registration at the Editorial Office. The registered manuscripts are sent to independent experts for scientific evaluation. We encourage authors to suggest the names of possible reviewers, (potential reviewers could be suggested from the editorial board too), but we reserve the right of final selection. Submitted papers are accepted for publication after a positive opinion of the independent reviewers and Editors.

Permissions

A written statement must accompany materials taken from other sources from both the author and publisher giving permission to *Reproductive Biology* for reproduction of the materials. Obtain permission in writing from at least one author of papers in press, unpublished data, and personal communications.

Disclaimer

Every effort is made by the Editor-in-Chief and the Editorial Board of *Reproductive Biology* to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement will appear in *Reproductive Biology*. However, they wish to make it clear that the data and opinions contained in the articles and advertisements herein are the responsibility of the contributor, sponsor or advertiser concerned. Accordingly, the Editor-in-Chief and the Editorial Board accept no liability whatsoever for the consequences of any of such inaccurate or misleading data, opinion or statement. Every effort is made to ensure that drug doses and other quantities are presented accurately. Nevertheless, readers are advised that the method and techniques for drug usage and other treatments described in *Reproductive Biology*, should only be followed in conjunction with the drug or treatment specifications released by manufacturers in the readers' country of residence.



Preparation

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission

is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review](#).

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format, double spaced with numbered lines. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of the published literature.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible. Recommended for full title to set at max. 20 words and 6 words for the short title.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section and include them on the title page only. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Abstracts

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, nonstandard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Abstract should not be divided into sections, aims, methods etc. (not structured).

Abstracts for **Original Articles** should not exceed 250 words.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Use the abbreviations sparingly: only those abbreviations that are firmly established in the field are eligible. The keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Abbreviations that are unavoidable must be defined twice: (1) at their first mention in the Abstract and (2) at their first mention in the remaining part of the article. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References*Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version

(where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 2018;19:e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>

Reference to a book:

[3] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003].

Reference to a dataset:

[dataset] [6] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also [Samples of Formatted References](#)).

Reference style

Format the references in compliance with the recommended style for this journal:

Last name, initial, full paper title, journal full name, year, volume (number) first and last page.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Paivio A, Jansen B, Becker LJ. Comparisons through the mind's eye. *Cognition* 1975;37(2):635–47.

[2] Ulbrich SE, Kettler A, Einspanier R. Expression and localization of estrogen receptor α , estrogen receptor β and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;84(2–3):279–289.

Reference to a book:

[3] Letheridge S, Cannon CR, editors. *Bilingual education: teaching English as a second language*. New York: Praeger; 1980.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 3rd ed. New York: MacMillan; 1979 [chapter 4].

Reference to a conference (only abstracts 2-page long may serve as references):

[5] Douglass F, Ball Th. Tracking and viewing changes on the web. In: *Proc. 1996 USENIX technical conference*; 1996.

Reference to a Dataset

[6] [dataset] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).



After Acceptance

532

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.



Author Inquiries

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).