



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**LAUREN CHRYS SOATO MARIN SCHAFFER**

**EFEITO DA APLICAÇÃO DE GH SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR  
EM TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR SOB TREINAMENTO RESISTIDO**

Presidente Prudente - SP  
2020



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**LAUREN CHRYS SOATO MARIN SCHAFFER**

**EFEITO DA APLICAÇÃO DE GH SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR  
EM TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR SOB TREINAMENTO RESISTIDO**

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

Orientador: Dr<sup>a</sup> Ines Cristina Giometti

Presidente Prudente - SP  
2020

636.089  
S296e Schaffer, Lauren Chrys Soato Marin.  
Efeito da aplicação de GH sobre a proliferação celular em testículos de ratos wistar sob treinamento resistido / Lauren Chrys Soato Marin Schaffer. – Presidente Prudente, 2020.  
56f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2020.  
Bibliografia.  
Orientador: Ines Cristina Giometti

1. AgNOR. 2. Exercício físico. 3. GH. 4. Reprodução. 5. RT-qPCR. I. Título.

Catálogo na fonte: Michele Mogni – CRB 8/6204

**LAUREN CHRYS SOATO MARIN SCHAFFER**

**EFEITO DA APLICAÇÃO DE GH SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR  
EM TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR SOB TREINAMENTO RESISTIDO**

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

Presidente Prudente, 15 de maio de 2020.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª Drª Ines Cristina Giometti  
Universidade do Oeste Paulista –  
Unoeste Presidente Prudente-SP

---

Profª Drª Francis Lopes Pacagnelli  
Universidade do Oeste Paulista -  
Unoeste Presidente Prudente-SP

---

Profª Drª Ana Paula Mattoso Miskulin Cardoso  
Universidade Estadual Paulista -  
UNESP Presidente Prudente-SP

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta dissertação aos meus pais Valdir e Olga que sempre me apoiaram e me educaram para ser uma mulher livre, independente, com opinião, corajosa, ética e temente à Deus.

## **AGRADECIMENTOS**

Meus singelos agradecimentos ao meu esposo Maurício Bruno Schaffer e à toda a minha família e amigos que sempre estiveram ao meu lado, nas horas boas e ruins.

À minha querida Profª Drª. Ines Cristina Giometti que me acolheu quando mais precisei e que confiou em meu potencial para realizar este projeto.

Não poderia deixar de agradecer ao Prof. Dr. Anthony César de Souza Castilho, ao Prof. Dr. Leonardo Oliveira Mendes, à Profª Drª Caliê Castilho, à Profª Drª Francis Lopes Pacagnelli e à Profª Drª Ana Paula Alves Favareto por todos os ensinamentos e ajuda, fazendo com que este mestrado fosse uma imersão total na vida acadêmica. Agradeço também aos alunos de Doutorado, alunos de Mestrado, Técnicos de laboratório, alunos de iniciação científica e a todos que de alguma maneira contribuíram para meu aprendizado.

Agradeço à UNOESTE que me proporcionou um excelente aprendizado, com oportunidades significativas para meu crescimento pessoal e profissional dentro de uma estrutura de ensino de qualidade.

Agradeço à FAPESP pela Bolsa TT3 do Processo nº 2018/24317-7, por auxiliar em minha capacitação técnica, trazendo um aprimoramento em minhas pesquisas e auxiliando em meu conhecimento profissional.

E por fim, mas não menos importante, agradeço à Deus e aos meus espíritos protetores por terem me dado a força necessária para chegar onde eu cheguei!

*“Sabemos o que somos, mas não sabemos o que poderemos ser”.*

*(William Shakespeare)*

## RESUMO

### **Efeito da aplicação de GH sobre a proliferação celular em testículos de ratos Wistar submetidos ao hormônio do crescimento sob treinamento resistido**

O hormônio do crescimento (GH) é frequentemente utilizado de forma indiscriminada por indivíduos que buscam um melhor desempenho físico, com finalidade de aumentar a massa muscular, o que pode levar a efeitos não desejados ao organismo. O objetivo do presente estudo foi investigar a proliferação celular e a expressão gênica ligadas à multiplicação celular em testículos de ratos Wistar que foram submetidos ao hormônio do crescimento sob treinamento resistido. Foram utilizados 32 ratos machos Wistar, com idade de 9 semanas, divididos em 4 grupos experimentais: CG (grupo controle, n=8); GHG (grupo de animais em que se administrou 0,2 UI/Kg de GH, 3 vezes por semana por 30 dias, n=8); TG (grupo de animais submetidos ao treinamento resistido, 4 séries de 10 saltos em água com 50% do peso do animal, 3 vezes por semana durante 30 dias, n=8) e GHTG (grupo de animais submetidos ao treinamento resistido e à administração de GH, n=8). Após a eutanásia dos ratos, os testículos foram coletados para verificar a proliferação celular pela técnica de AgNOR e para a RT-qPCR dos genes-alvo *Ghr*, *Igf1* e *Igf2*. A análise estatística dos dados foi ANOVA seguida de Tukey, diferença estatística significativa foi considerada com  $p < 0,05$ . Os ratos do GHG apresentaram maior ganho de peso que os demais grupos e maior peso testicular que o GHTG ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa na contagem de regiões organizadoras de nucléolos e na área dos núcleos e dos nucléolos. Também não houve diferença significativa na expressão dos genes-alvo. A realização do experimento se justifica para saber se o uso de GH em ratos machos haveria multiplicação celular e se o uso do GH juntamente com o treinamento resistido afetaria geneticamente o sistema reprodutor masculino. Concluiu-se que a aplicação de GH sob treinamento resistido não alteram a proliferação celular testicular nem a expressão gênica de *Ghr*, *Igf1* e *Igf2* nos testículos de ratos Wistar no período analisado.

**Palavras-Chave:** AgNOR. Exercício físico. GH. Reprodução. RT-qPCR.

## ABSTRACT

### **Effect of GH application on cell proliferation in Wistar rats testicles submitted to growth hormone under resisted training**

Growth hormone (GH) is often used indiscriminately by individuals looking for better physical performance, in order to increase muscle mass, which can lead to unwanted effects on the body. The aim of the present study was to investigate cell proliferation and gene expression linked to cell multiplication in testicles of Wistar rats that were subjected to growth hormone under resistance training. 32 male Wistar rats, aged 9 weeks, were used, divided into 4 experimental groups: CG (control group, n = 8); GHG (group of animals administered 0.2 IU / kg of GH, 3 times a week for 30 days, n = 8); TG (group of animals submitted to resistance training, 4 series of 10 jumps in water with 50% of the animal's weight, 3 times a week for 30 days, n = 8) and GHTG (group of animals submitted to resistance training and administration GH, n = 8). After the mice were euthanized, the testicles were collected to check for cell proliferation by the AgNOR technique and for the RT-qPCR of the target genes *Ghr*, *Igf1* and *Igf2*. The statistical analysis of the data was ANOVA followed by Tukey, a statistically significant difference was considered with  $p < 0.05$ . GHG rats showed greater weight gain than the other groups and greater testicular weight than GHTG ( $p < 0.05$ ). There was no significant difference in the count of nucleolus organizing regions and in the area of nucleus and nucleolus. There was also no significant difference in the expression of the target genes. The experiment is justified to find out if the use of GH in male rats would have cell multiplication and if the use of GH together with resistance training would genetically affect the male reproductive system. It was concluded that the application of GH under resistance training does not alter the testicular cell proliferation or the gene expression of *Ghr*, *Igf1* and *Igf2* in the testicles of Wistar rats in the analyzed period.

**Keywords:** AgNOR. Physical exercise. GH. Reproduction. RT-qPCR

## SUMÁRIO

<b>ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA EUROPEAN JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY.....</b>	<b>10</b>
<b>ANEXO 1- APROVAÇÃO DO CEUA.....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXO 2- NORMAS DA REVISTA EUROPEAN JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY.....</b>	<b>47</b>

**Artigo científico para a publicação seguindo as normas da revista European Journal of  
Applied Physiology**

**(Qualis A2 / Fator de impacto: 3.055 (2018))**

**Hormônio do crescimento sob treinamento resistido com duração de 30 dias, não alteram a multiplicação celular nem a expressão de genes nos testículos de ratos Wistar**

*GH sob treinamento resistido não alteram a multiplicação celular testicular*

Lauren Chrys Soato Marin **Schaffer**<sup>1</sup>; Franscislaine Anelize Garcia **Santos**<sup>2</sup>; Raissa de Almeida **Suzuki**<sup>1</sup>; José Carlos Silva Camargo **Filho**<sup>1</sup>; Robson Chacon **Castoldi**<sup>1</sup>; Caliê **Castilho**<sup>1</sup>; Francis Lopes **Pacagnelli**<sup>1</sup>; Osimar Carvalho **Sanches**<sup>3</sup>; Hermann **Bremer-Neto**<sup>1</sup>;  
Ines Cristina **Giometti**<sup>\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Campus II, Rod. Raposo Tavares, Km 572, Limoeiro, CEP 19067-175, Presidente Prudente, SP, Brasil

<sup>2</sup> Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Dr. Orlando Marques Paiva, 87, CEP 05508-270, São Paulo, SP, Brasil

<sup>3</sup> Universidade de Santo Amaro (UNISA), Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340, Jardim das Imbuías, São Paulo (SP).

Autor para correspondência \*:

E-mail: [inesgiometti@unoeste.br](mailto:inesgiometti@unoeste.br)/ [inesgiometti@yahoo.com.br](mailto:inesgiometti@yahoo.com.br)

Fone: 55-18-3229-2033 / 55-18-3229-2115.

## RESUMO

**Hormônio do crescimento e treinamento resistido não alteram a multiplicação celular nem a expressão de genes proliferativos nos testículos de ratos Wistar**

**Objetivo:** O objetivo do presente estudo foi investigar a proliferação celular e a expressão gênica ligada à multiplicação celular em testículos de ratos Wistar que foram submetidos ao hormônio do crescimento sob treinamento resistido a curto prazo.

**Métodos:** 32 ratos machos Wistar com idade de 70 dias, foram divididos em 4 grupos experimentais: CG (grupo controle, n=8); GHG (grupo de animais em que se administrou GH, n=8); TG (grupo de animais submetidos ao treinamento resistido aquático, n=8) e GHTG (grupo de animais submetidos ao treinamento resistido e à administração de GH, n=8). Após 30 dias de experimento, os testículos foram coletados para a verificação da multiplicação celular pela técnica de AgNOR e para a RT-qPCR dos genes-alvo (*Ghr*, *Igf1* e *Igf2*).

**Resultados:** Os ratos do GHG apresentaram ganho de peso médio ( $p < 0,05$ ) ( $80,62 \pm 2,57$ g) que os demais grupos (CG= $66,69 \pm 5,84$ g; TG= $61,83 \pm 5,66$ g; GHTG= $60,00 \pm 4,45$ g). O peso médio dos testículos dos ratos do grupo GHG foi maior do que o do grupo GHTG (GHG= $1,40 \pm 0,09$  g; GHTG= $1,15 \pm 0,07$ g). Entretanto, não houve diferença significativa na contagem de regiões organizadoras de nucléolos e na área dos núcleos e dos nucléolos. Também não houve diferença significativa na expressão dos genes-alvo.

**Conclusão:** A aplicação de GH e o treinamento resistido a curto prazo não alteram a multiplicação celular testicular nem a expressão gênica de *Ghr*, *Igf1* e *Igf2* nos testículos de ratos Wistar, durante os 30 dias experimentais.

**Palavras-Chave:** AgNOR, Exercício físico, GH, Reprodução, RT-qPCR

## **Growth hormone and resistance training do not alter cell multiplication or the expression of proliferative genes in the testicles of Wistar rats**

**Purpose:** The aim of the present study was to investigate cell proliferation and gene expression linked to cell multiplication in testis of Wistar rats that were subjected to growth hormone under short-term resistance training.

**Methods:** 32 male Wistar rats aged 70 days were divided into 4 experimental groups: CG (control group, n = 8); GHG (group of animals administered GH, n = 8); TG (group of animals subjected to aquatic resistance training, n = 8) and GHTG (group of animals subjected to resistance training and GH administration, n = 8). After 30 days of experiment, the testicles were collected for verification of cell multiplication by the AgNOR technique and for the RT-qPCR of the target genes (Ghr, Igf1 and Igf2).

**Results:** GHG rats showed average weight gain ( $p < 0.05$ ) ( $80.62 \pm 2.57g$ ) than the other groups (CG =  $66.69 \pm 5.84g$ ; TG =  $61.83 \pm 5.66g$ ; GHTG =  $60.00 \pm 4.45g$ ). The average testicle weight of rats in the GHG group was greater than that of the GHTG group (GHG =  $1.40 \pm 0.09g$ ; GHTG =  $1.15 \pm 0.07g$ ). However, there was no significant difference in the counting of nucleolus organizing regions and in the area of nuclei and nucleoli. There was also no significant difference in the expression of the target genes. **Conclusion:** GH application and short-term resistance training do not alter testicular cell multiplication or Ghr, Igf1 and Igf2 gene expression in the testicles of Wistar rats during the 30 experimental days.

**Keywords:** AgNOR, Physical exercise, GH, Reproduction, RT-qPCR

AgNOR - Técnica de coloração pela prata das regiões organizadoras de nucléolos ANOVA

– Análise de variância

CG – Grupo controle

FSH - Hormônio folículo estimulante

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GH - Hormônio do crescimento

GHG - Grupo com administração de hormônio do crescimento

*Ghr* – Receptor de GH

GHRH - Hormônio liberador de GH

GHTG- Grupo com treinamento físico e com administração de hormônio do crescimento

IGF – Fator de crescimento semelhante à insulina

LH - Hormônio Luteinizante

NORs - Regiões organizadoras de nucléolo

PCR - Reação em cadeia da polimerase

rhGH - Hormônio do crescimento recombinante humano

RT-qPCR - Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa

TG - Grupo do treinamento

físico HPRT1 - Proteína

ribossomal

RPS18 - Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase

## 1 INTRODUÇÃO

O hormônio do crescimento (GH) é um hormônio proteico pleiotrópico que coordena uma imensa variedade de funções fisiológicas, como a alimentação, o metabolismo, a osmorregulação, o sistema imune e a reprodução (Bergan-Roller and Sheridan 2018). Esse hormônio, apesar de seus conhecidos efeitos colaterais, é utilizado de forma indiscriminado por alguns praticantes de treinamento físico com o objetivo de obter melhor desempenho físico (Cruzat et al. 2008).

A secreção hipofisária do GH exerce seus efeitos biológicos através da interação entre o GH e seu receptor (GHR), o que leva à produção hepática do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1), seu principal mediador biológico (Salzano et al. 2018). Tanto o GH quanto o IGF1 têm atividade mitogênica e antiapoptótica celular (Chae et al. 2015).

O GH regula a expressão gênica em diferentes tecidos que expressam o GHR, para exercer os seus efeitos fisiológicos, sendo o gene do *Igf1* o maior alvo transcricional na maioria dos tecidos. Apesar do IGF1 originário do fígado executar funções endócrinas, o IGF1 produzido localmente também tem importante papel fisiológico (Chia 2014).

A função do sistema reprodutor masculino é produzir andrógenos como a testosterona, que mantêm a função reprodutiva masculina e promover a espermatogênese (Gurung and Jialal 2020). O eixo hipotálamo-hipófise-gonadal desempenha um papel importante na promoção da maturidade sexual, produção de espermatozoides e no desenvolvimento de características sexuais secundárias (Gurung and Jialal 2020). O hipotálamo secreta o hormônio liberador de GH (GnRH) no sistema portal hipotálamo-hipofisário para estimular a hipófise anterior. O GnRH é um hormônio peptídico liberado pelos neurônios hipotalâmicos de maneira pulsátil e

atua nos gonadotrofos da hipófise anterior através da ligação e ativação de um receptor de proteína G, que estimula a hipófise anterior através da ativação do inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) (que aumenta o cálcio intracelular) para liberar FSH e LH (Gurung and Jialal 2020). Um desequilíbrio no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal pode resultar em infertilidade e hipogonadismo e a perda da função testicular resulta em células de Leydig ou Sertoli danificadas ou subdesenvolvidas que não podem responder a estímulos para manter a função reprodutiva (Gurung and Jialal 2020).

O IGF1 é sintetizado pela maioria dos tecidos do corpo, se não todos, onde exerce efeitos autócrinos ou parácrinos (Neirijnck et al. 2019). A regulação da produção hepática de IGF1 é complexa e envolve principalmente a função do GH (Neirijnck et al. 2019). O IGF1 tem sido implicado como um importante biomarcador modulador para o condicionamento físico e treinamento para exercícios, hipertrofia, densidade mineral óssea (DMO), alterações da composição corporal, função cognitiva, mortalidade e câncer (Nindl and Pierce 2010). O GH age simultaneamente com IGF1 no músculo reduzindo a absorção da glicose, aumentando a absorção dos aminoácidos e aumentando a síntese protéica alcançando o aumento da massa magra muscular (Mourkioti and Rosenthal 2005).

O IGF2 também é expresso em vários tecidos, incluindo o fígado, mas sua produção hepática não é regulada pelo GH, sendo importante ressaltar que o gene IGF2 / Igf2 exibe impressão genômica: em humanos, assim como em outros mamíferos como roedores, o alelo IGF2 / Igf2 herdado paternamente é expresso, enquanto o alelo materno é transcricionalmente silencioso (Neirijnck et al. 2019). Nos camundongos, o Igf2 é expressa principalmente durante o desenvolvimento embrionário e cessa algumas semanas após o nascimento (Neirijnck et al. 2019). Assim, o IGF2 exerce suas ações proliferativas e antiapoptótica apenas durante os

estágios embrionários e fetais, enquanto o crescimento pós-natal é independente do IGF2 (Neirijnck et al. 2019). Nos seres humanos, no entanto, um padrão diferente é observado, uma vez que o IGF1 e o IGF2 permanecem expressos ao longo da vida e foram relatados como atuantes como moduladores importantes do crescimento muscular e da diferenciação (Neirijnck et al. 2019). Após o nascimento, IGF1 e IGF2 são expressos de maneira robusta nas células germinativas, marcadamente na espermatogônia, enquanto todas as proteínas de substrato receptor de insulina são encontradas nos testículos de camundongos adultos (Neirijnck et al. 2019). Embora a insulina seja produzida principalmente pelas células pancreáticas, foi recentemente demonstrado que o testículo também produz insulina, porém, é a insulina pancreática, e não testicular, que regula o eixo Hipotálamo Hipofisário Gonadal masculino e, portanto, é essencial para a fertilidade masculina de ratos (Neirijnck et al. 2019).

Tanto o IGF1 como o IGF2, agem por meio do receptor 1 (IGF1R) que também pertence à família dos receptores tirosina-quinase. A ligação do IGF1 ativa as cascatas de sinalização intracelular canônica (Kamenický et al. 2014). O IGF1 é um regulador essencial para o desenvolvimento, maturação e sobrevivência de vários tecidos (Uysal et al. 2017). O IGF1 é produzido pelas células de Sertoli no testículo (Iliadou et al. 2015).

IGF1 tem influência na produção e secreção esteroidogênica testicular (Shimonovitz et al. 1993). Além disso, em ratos, a privação de GH por inibidor do fator liberador de GH causa atraso na maturidade sexual, caracterizado pela presença de poucos ou nenhum espermatozóide (Arsenijevic et al. 1989). A deficiência de GH também afeta a síntese e secreção de Hormônio Folículo Estimulante (FSH) (Arsenijevic et al. 1989). O testículo é mais responsivo as gonadotrofinas depois do tratamento com GH e IGF1 em camundongos (Shimonovitz et al. 1993).

O exercício físico é uma condição bem reconhecida que estimula naturalmente a liberação de GH e GHRH (hormônio liberador de GH) na circulação (Ribeiro de Oliveira Longo Schweizer et al. 2018) e pode exercer efeitos benéficos ou prejudiciais para a reprodução masculina, dependendo dos vários parâmetros inerentes ao tipo de exercício: tipo, intensidade, volume, objetivo ou organização (Vaamonde et al. 2017).

Pesquisas anteriores sugerem que o treinamento de restrição de fluxo sanguíneo pode causar aumento dos níveis de hormônios relacionados à hipertrofia muscular, como o GH e IGF-1 (Amani-Shalamzari et al. 2020). A maioria das pesquisas anteriores utilizou a restrição de fluxo sanguíneo em conjunto com protocolos de treinamento aeróbico de baixa intensidade (<40% VO<sub>2</sub>max) ou de treinamento de resistência (<30% uma repetição máxima (1RM)) e relatou melhorias nas enzimas oxidativas, VO<sub>2</sub>max, tempo de exercício até a exaustão e aumento do músculo, hipertrofia e força (Amani-Shalamzari et al. 2020).

A realização do experimento se justifica para analisar se o uso de GH em ratos machos haveria multiplicação celular e se o uso do GH juntamente com o treinamento resistido afetaria geneticamente o sistema reprodutor masculino. A relevância clínica se dá por não haver literatura e estudos publicados desta natureza na atualidade. O estudo é pioneiro na avaliação dos aspectos moleculares suplementados com GH e treinamento resistido a curto prazo.

O objetivo do presente estudo foi investigar a proliferação celular e a expressão gênica de genes ligado à multiplicação celular em testículos de ratos Wistar que foram submetidos ao hormônio do crescimento sob treinamento resistido.

## 2. MÉTODOS

### 2.1 Delineamento experimental

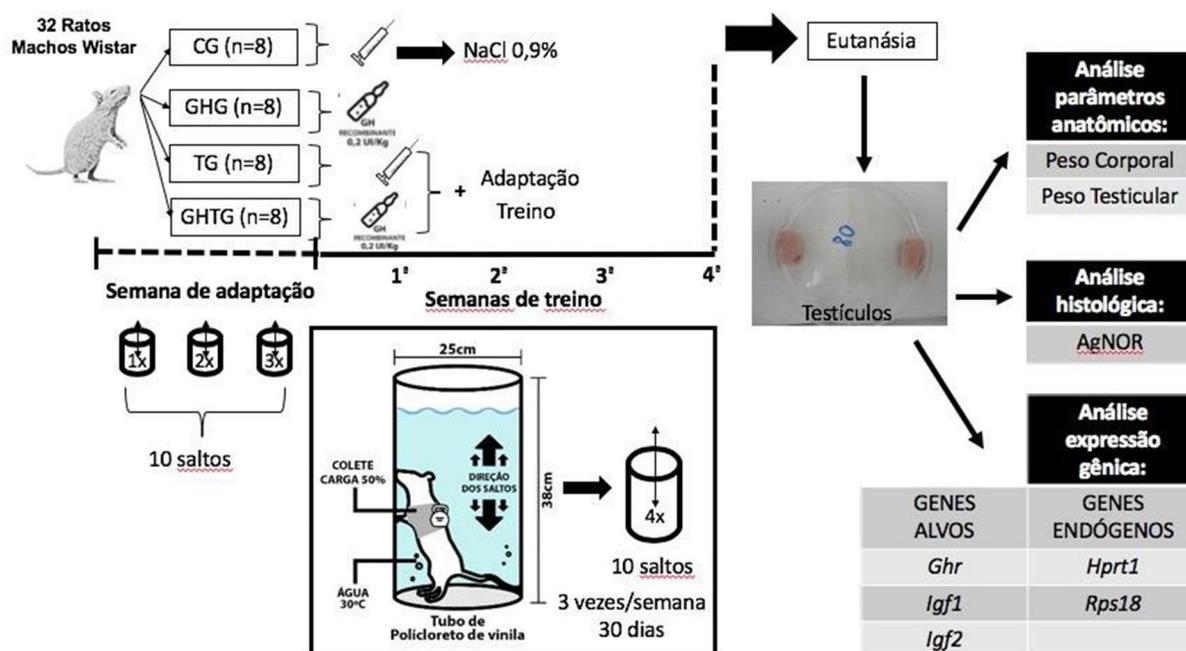


Figura 1 - Delineamento experimental

#### 2.1.1 Separação dos grupos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNOESTE (número 5167). Foram utilizados 32 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, com idade de 70 dias, com peso médio de  $235,27 \pm 15,21$  gramas, no início do experimento. Os animais foram mantidos em caixas, com 3 a 4 animais/caixa, recebendo água e ração SupraLab® (Supra, empresa Alisul, Brasil) *ad libitum*, em local com temperatura ambiente entre 20 e 30°C e com luz controlada em ciclo de 12 horas (claro-escuro).

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos: CG (grupo controle; n=8), GHG (grupo de animais que receberam GH; n=8), TG (grupo de animais que praticaram treinamento resistido em água; n=8) e GHTG (grupo de animais que praticaram treinamento resistido em água e receberam GH; n=8).

### 2.1.2 Aplicação de GH

No grupo GH foi utilizado 0,2 UI/Kg de GH recombinante humano (Saizen® ; Merck, Brasil), seguindo o protocolo de Kaminsky et al. (2012) e Junqueira et al. (2016). A administração foi realizada, por via subcutânea sempre no mesmo horário, 3 vezes/semana, em dias alternados, durante 30 dias; os animais do grupo Controle e do Grupo Treinamento receberam solução fisiológica (0,9% de cloreto de sódio) em volume similar.

### 2.1.3 Treinamento resistido

O período de adaptação foi realizado a cada dois dias por uma semana e consistiu em uma série de 10 saltos verticais no primeiro dia, duas séries de 10 saltos no segundo dia e três séries de 10 saltos no terceiro dia com coletes acomodados na região anterior ao tórax que continham uma sobrecarga de metal de 50% do peso corporal; com intervalo de um minuto entre as séries.

O treinamento ocorreu dentro de um tubo de policloreto de vinila de 25 cm de diâmetro com 38 cm com água aquecida (30°C). Os animais eram pesados, em uma balança de precisão (Modelo BT 8000, Marca Gehaka, Brasil), a cada dois dias de treinamento resistido a fim de recalcular a sobrecarga do colete. Após o período de adaptação, os animais foram submetidos ao treinamento resistido que consistiu de 4 séries de 10 saltos com intervalo de 1 minuto entre cada série, por meio de um protocolo de saltos verticais na água,

3 vezes/semana, em dias alternados, por 30 dias consecutivos, como descrito por Malheiro et al. (2009) e Castoldi et al (2017, 2019a). Após a prática do treinamento físico era realizada a secagem dos ratos com toalhas, para retornarem as suas caixas.

#### 2.1.4 Eutanásia

Ao final de 4 semanas, os animais foram anestesiados com Tiopental sódico na dose de 0,05mL/Kg e induzidos à morte por exsanguinação. Um dos testículos de cada animal foi colocado em solução de Davidson (ácido acético P.A. - 10 mL, Formaldeído (37-40%) - 20 mL, Etanol a 95% - 30 mL e água destilada - 30 mL) por 24 horas, a seguir foram lavados em água corrente e então fixados em álcool 70º para posterior confecção de lâminas. O outro testículo foi armazenado e acondicionado em 1 mL de TRIzol® (Invitrogen®) em freezer a -80°C.

#### 2.1.5 Análises histológicas

Para a confecção das lâminas, o material foi incluso em parafina e obtidos cortes de 5 µm de espessura (Micrótomo rotativo, mod. 820, American Optical N- 45387, USA). As lâminas foram confeccionadas e submetidas à coloração de AgNOR (Técnica de coloração pela prata das regiões organizadoras de nucléolos). A técnica AgNOR avalia as NORs de cromossomos ativos durante o ciclo celular e o número ou área das NORs mostram a atividade proliferativa do ciclo (Murray 2004). As proteínas que são coradas pela prata aparecem ao microscópio como pontos pretos dentro dos nucléolos, que podem ser contados de acordo com o número de pontos por célula diretamente ao microscópio ou avaliados quanto a morfometria em analisador de imagem, sendo esse último um método mais rápido e preciso (Trerè 2000). A capacidade de corar os NORs pela prata é influenciada por vários

fatores, como métodos de fixação e duração da exposição a diferentes temperaturas (Trerè 2000). Esse modelo de marcação AgNOR possui um grande valor para diagnóstico e prognóstico de tumores, pois quanto maior o grau de malignidade, maior o número e menor o tamanho de AgNORs presentes dentro do núcleo (Crocker et al. 1989).

As áreas dos núcleos celulares e dos NORs, ou seja, pontos marrom-acastanhados no interior dos núcleos, foram mensuradas em 10 células testiculares dos túbulos seminíferos, em 10 campos aleatórios de cada animal, em aumento de 1000x. A técnica histoquímica do AgNOR consiste na coloração pela prata das proteínas associadas às regiões organizadoras nucleolares (NORs).

#### 2.1.6 Análise da expressão gênica

Para a análise da PCR em tempo real foram utilizados os testículos dos ratos coletados e imersos em TRIzol® (ThermoFisher Scientific®). Os tecidos armazenados foram triturados em homogeneizador de tecidos (Homomix®) e submetidos ao protocolo de extração do TRIzol® (ThermoFisher Scientific®) de extração total. A concentração do RNA total recuperado foi mensurada por espectrofotometria (Eppendorf BioPhotometer® plus, Hamburg, Germany). 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 SuperScript III (Invitrogen®) seguindo protocolo do fabricante utilizando OligoDT como oligonucleotídeo iniciador.

A qPCR foi realizada para a análise quantitativa da expressão gênica relativa. Como controle interno das reações de qPCR foram utilizados os genes endógenos Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (*Rps-18*), Proteína ribossomal (*Hprt-1*) e Gliceraldeído-3-

fosfato desidrogenase (*Gapdh*) a fim de normalizar os resultados obtidos para o gene-alvo. Os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) para os genes- alvo (*Ghr*, *Igf1* e *Igf2*) e os controles endógenos foram obtidos de ensaios já padronizados a partir de sequências de ratos (Primer TaqMan GHR, GeneBank

NM\_017094.1, produto 92pb, Primer TaqMan RPS18, GeneBank NM\_213557.1, produto 62pb, Primer TaqMan HPRT-1, GeneBank NM\_012583.2, produto 64 pb, Primer TaqMan GAPDH, GeneBank NM\_017008.3, produto 175pb, Primer Taq-Man IGF1, GeneBank NM\_001082477.2, produto 69pb, Primer Taq-Man IGF2, GeneBank NM\_001190162.1, produto 74pb) (Tabela 1). As reações foram realizadas utilizando o sistema TaqMan® (Applied Biosystems, Foster, USA).

As PCRs foram conduzidas em duplicatas para cada amostra e a expressão foi determinada pela quantificação em relação ao gene endógeno (Labnet MultiGene™ Gradient PCR Thermal Cycler, New Jersey, USA). O cálculo das eficiências para os genes alvo e controle foi feito por meio do programa “LinRegPCR”. Para isso, considera-se a eficiência média com base na curva de amplificação individual de cada amostra. Para quantificação relativa das amplificações foi empregado o método de Pfaffl (2001).

## 2.2 Análises estatísticas

Os dados foram analisados quanto ao pressuposto de normalidade empregando-se o teste de Shapiro-Wilk. As variáveis foram submetidas ao teste análise de variância (ANOVA) para comparar as médias dos quatro grupos, seguida do teste de Tukey. Os programas computacionais utilizado para a análise estatística foram o NormFinder e o Biostatic. O nível de significância adotado para todas as comparações foi de  $p < 5\%$ .

### 3. RESULTADOS

Não houve diferença significativa entre os grupos na média de peso dos animais nem no início ( $p=0,7400$ ) nem no final ( $p=0,2579$ ) do experimento. Porém, houve diferença significativa entre os grupos na média de ganho de peso dos ratos. O GHG teve maior ganho de peso que os demais (Figura 2). A média de peso médio dos testículos foi maior no grupo GHG ( $p=0,0313$ ) que no grupo GHTG (Figura 3).

Não houve diferença entre os grupos estudados nas áreas dos núcleos, nas áreas de NOR, no número de NOR, na área total de NOR por núcleo e na razão da área do núcleo pela área de NOR ( $p>0,05$ ) dos túbulos seminíferos (Tabela 2).

Foram testados três genes endógenos, *Hprt1*, *Rps18* e *Gapdh* e a combinação dos endógenos *Hprt1* e *Rps18* apresentaram melhor estabilidade neste modelo experimental. Não houve diferença significativa na expressão gênica relativa de *Ghr* (Figura 4), *Igf1* (Figura 5) e *Igf2* (Figura 6).

#### 4. DISCUSSÃO

Os animais do GHG apresentaram maior ganho de peso no mês experimental que os demais grupos, provavelmente devido à aplicação do GH na ausência do treinamento físico. A aplicação GH leva a um aumento de massa magra, diminuição de massa gorda e aumento na densidade óssea em humanos deficientes de GH (Balercia et al. 2011), que poderiam justificar um maior peso corporal. Porém, em ratos com produção normal de GH o treinamento resistido é mais eficiente que a aplicação de GH no aumento da densidade (Caetano et al. 2019; Castoldi et al. 2019b) e não diferiu do GH no aumento de fibras musculares (Castoldi et al. 2017).

Os efeitos no GH no metabolismo são exaustivamente estudados, porém os efeitos do GH nas gônadas são pobremente compreendidos (Chandrashekar et al. 1999). É relatado que o GH tem influência na fertilidade masculina, pois está envolvido na gametogênese e na esteroidogênese e a resistência ao GH pode levar à azoospermia e infertilidade em homens (Balercia et al. 2011).

Os animais do GHG apresentaram maior peso testicular que os do GHTG e não diferiram dos demais grupos. É possível que o treinamento físico tenha alterado o metabolismo desses animais e que eles não tenham respondido da mesma forma ao GH exógeno. O GH quando administrado a camundongos anões induz aumento do ganho de peso e aumento de vários órgãos, incluindo os testículos (Chatelain et al. 1991). Sabe-se que o GH é um potente anabolizante e que leva à proliferação celular, angiogênese e pode levar ao desenvolvimento de câncer em muitos tipos celulares (De Santi et al. 2019), por isso a necessidade de se verificar a proliferação testicular e a expressão dos genes envolvidos na proliferação testicular após a descoberta da diferença nos pesos testiculares. É importante ressaltar que os ratos do presente estudo não eram deficientes de GH como os camundongos anões e sua resposta à aplicação de Gh também pode ser diferente.

Quando se analisou as áreas e quantidade de NOR e sua relação com a área nuclear, nenhum efeito dos tratamentos na proliferação celular foi observado nos testículos. Em estudo com tumor venéreo transmissível canino foi verificado que quanto maior o número de pequenas NORs, maior era a atividade proliferativa da célula, com tumores na fase de crescimento apresentando maior número médio de NOR no interior do núcleo comparado os TVTs regressivos, constatando-se que o número e a área das NORs representam parâmetros que refletem o grau da atividade proliferativa das células (Santos et al. 2011). As NORs com maior área e em menor quantidade indicam menor proliferação celular, enquanto que NORs menores e em maior quantidade indicam maior proliferação celular (Silva et al. 2003).

Constitui um recurso para analisar a proliferação celular, uma vez que estas estruturas estão relacionadas com o nível de atividade celular e nuclear. Nas células

em proliferação, aumenta o número de NORs, tornando-se possível a relação entre a contagem de NORs e a proliferação celular (Derenzini 2000).

O aumento no peso testicular pode ser devido a uma alteração no número de células de Leydig que aumentam sua resposta aos hormônios gonadotróficos em camundongos anões (Chatelain et al. 1991). A proliferação testicular do presente estudo foi verificada nos túbulos seminíferos (células germinativas e células de Sertoli) para verificar alterações na produção espermática e não nas células de Leydig.

Em muitos estudos, as crianças com deficiência de GH e tratadas com o hormônio recombinante não tiveram qualquer efeito no desenvolvimento testicular ou na sua função (Balercia et al. 2011). Entretanto, em outro estudo, foi demonstrado que 4 crianças que tinham baixa estatura e nenhuma deficiência de GH e foram tratadas com esse hormônio apresentaram reduzido volume testicular e disfunção testicular endócrina e exócrina, houve redução do volume testicular nesses meninos durante o tratamento, sem qualquer causa clínica dessas alterações (Bertelloni et al. 1999).

No presente estudo não se observou o efeito do exercício físico no peso dos testículos, nem na proliferação celular do testículo. O exercício físico é um potente modulador da liberação de hormônios em um grande número de atletas e tem sido amplamente estudado como um estímulo da secreção hormonal. Em particular, o estresse físico tem uma gama de efeitos sobre o hipotálamo-hipófise-gônadas, dependendo do tipo, intensidade e duração da atividade, e das boas condições físicas do indivíduo (De Souza et al. 1994; De Souza and Miller 1997). Em relação ao efeito do exercício físico no testículo, os dados da literatura são conflitantes, alguns autores relatam o aumento do estresse oxidativo e da apoptose nas células testiculares (Manna et al. 2003; Shokri et al. 2009) com diminuição no peso dos testículos e das glândulas acessórias (Shokri et al. 2009), outros autores descrevem uma atividade

antioxidante no testículo, com proteção aos efeitos deletérios da idade (Somani and Husain 1996) e da ingestão de álcool (Husain and Somani 1998) na função testicular. Aparentemente, a intensidade e a modalidade de exercício físico determinam se haverá um efeito de estresse oxidativo com peroxidação lipídica ou antioxidativo das células testiculares (Aitken and Roman 2008).

Nenhuma diferença foi observada entre os grupos na expressão dos genes proliferativos estudados (*Ghr*, do *Igf1* e *Igf2*) nos testículos. Sabe-se que o aumento do GH/IGF1 plasmático leva a um aumento da proliferação celular e do risco de câncer (De Santi et al. 2019). Porém nosso estudo avaliou o IGF1 de produção local testicular, e a expressão desse gene não foi alterada pelos tratamentos. O IGF1 testicular é produzido por células de Leydig e de Sertoli (Balercia et al. 2011). Bertelloni et al. (1999) sugerem em seu estudo que uma hiperestimulação dos testículos na puberdade com GH em indivíduos com produção normal pode levar a alterações na produção local de peptídeos e esteroides resultando em desenvolvimento testicular comprometido. Os ratos do presente estudo já eram considerados maduros sexualmente, pois já tinham mais de 70 dias de idade, a puberdade é dos 40 aos 60 dias de idade em ratos (Quinn 2005), então nenhuma alteração foi observada na expressão de *Ghr*, *Igf1* ou *Igf2*.

Apesar de nenhuma alteração na expressão do *Igf1* local, sabe-se que o GH pode agir no testículo por meio de seu mediador IGF1 sérico, no qual aumenta o número de receptores de LH nas células de Leydig em camundongos (Chatelain et al. 1991) aumentando a produção de testosterona (Balducci et al. 1993). Aparentemente, o IGF1 leva a uma modulação das gonadotrofinas testiculares e que o IGF1 local é regulado pelas gonadotrofinas em células *in vitro* (Chatelain et al. 1991).

Em roedores machos o GH é liberado em forma de rajadas com longos intervalos sem secreção de GH, que são chamados de vales, então a forma de administração do GH interfere na sua ação. Quando comparado o GH administrado duas vezes ao dia (forma pulsátil) ou em infusão contínua, a forma pulsátil obteve maiores respostas no ganho de peso dos animais e na expressão gênica de *Igf1* em outros órgãos (Walser et al. 2014).

É relatado que quando o GH liga-se ao GHR em células do fígado e na maioria das células orgânicas induz uma série de eventos que acabam resultando na produção do IGF1 e IGF2 (Gomes, R. J.; Caetano, F. H.; Hermini, H. A.; Rogatto 2003). Os efeitos fisiológicos de sobrevivência, proliferação, diferenciação celular do IGF1 e IGF2 são mediados via ativação de seu receptor do tipo tirosina quinase (Özdamar et al. 2018). No geral, IGF1 tem um papel significativo no crescimento e IGF2 é relacionado ao desenvolvimento embrionário, mas isso não é bem verdade em se tratando de órgãos reprodutivos que apresentam diferenciação e proliferação celular por toda a vida reprodutiva (Özdamar et al. 2018).

Camundongos knockout que não tem o gene do receptor de GH apresentam menor fertilidade e menor produção de testosterona (Chandrashekar et al. 1999). Apesar da ausência de ação de GH ser importante na fertilidade dos machos, sua maior concentração parece não alterar a espermatogênese em ratos maduros sexualmente, pois no presente estudo a administração de GH ou o treinamento resistido não alteraram a expressão gênica de *Ghr*, *Igf1* ou *Igf2* nos testículos, nem a proliferação celular dos túbulos seminíferos (Arsenijevic et al.1989). Observaram que o tratamento com GH em homens com severa oligospermia idiopática não provoca aumento ou diminuição na contagem espermática (Lee et al. 1995).

Como limitações do presente estudo, podemos apontar a ausência de contagem espermática e de dosagem dos hormônios sexuais.

## **5. CONCLUSÃO**

A aplicação de GH e o treinamento resistido a curto prazo não alteram a proliferação celular testicular nem a expressão gênica de *Ghr*, *Igf1* e *Igf2* nos testículos de ratos Wistar.

### **Conflito de interesse**

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

### **Declaração de contribuição dos autores**

LCSMS, FAGS, RAS conduziram os experimentos. JCSCF, RCC, CC, FLP e ICG conceberam e projetaram a pesquisa. OCS contribuiu com novas técnicas de análise. ICG e CC analisaram os dados. CC, FLP e ICG escreveram o manuscrito.

## REFERÊNCIAS

- Aitken RJ, Roman SD (2008) Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Adv Exp Med Biol* 636:154–171. <https://doi.org/10.4161/oxim.1.1.6843> Amani-Shalamzari S, Sarikhani A, Paton C, et al (2020) Occlusion training during specific futsal training improves aspects of physiological and physical performance. *J Sport Sci Med* 19:374–382
- Arsenijevic W, Wehrenberg WB, Conz A, et al (1989) Growth hormone (gh) deprivation induced by passive immunization against rat gh-releasing factor delays sexual maturation in the male rat. *Endocrinology* 124:3050–3059. <https://doi.org/10.1210/endo-124-6-3050>
- Balducci R, Toscano V, Mangiantini A, et al (1993) The effect of growth hormone administration on testicular response during gonadotropin therapy in subjects with combined gonadotropin and growth hormone deficiencies. *Acta Endocrinol (Copenh)*. <https://doi.org/10.1530/acta.0.1280019>
- Balercia G, Giovannini L, Paggi F, et al (2011) Growth hormone deficiency in the transition period: Body composition and gonad function. *J. Endocrinol. Invest.*
- Bergan-Roller HE, Sheridan MA (2018) The growth hormone signaling system: Insights into coordinating the anabolic and catabolic actions of growth hormone. *Gen Comp Endocrinol* 258:119–133. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.07.028>
- Bertelloni S, Baroncelli GI, Viacava P, et al (1999) Can growth hormone treatment in boys without growth hormone deficiency impair testicular function? *J Pediatr* 135:367–370. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(99\)70136-8](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(99)70136-8)

- Caetano HRDS, Castoldi RC, Zanuto ÉAC, et al (2019) Muscle strength training is better than the use of growth hormone (Gh) in bone health of wistar rats. *Int J Morphol*.  
<https://doi.org/10.4067/S0717-95022019000100104>
- Castoldi RC, Manganaro LJ, Ferreira SC, et al (2019a) Effect of growth hormone (GH) and resistance training on the collagen properties of femoral bone tissue. *Int J Morphol*.  
<https://doi.org/10.4067/S0717-95022019000401416>
- Castoldi RC, Ozaki GAT, Garcia TA, et al (2019b) Effects of muscular strength training and growth hormone (GH) supplementation on femoral bone tissue: analysis by Raman spectroscopy, dual-energy X-ray absorptiometry, and mechanical resistance. *Lasers Med Sci*. <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02821-5>
- Castoldi RC, Ozaki GAT, Giometti IC, et al (2017) Morphometric Study of Muscle Fibers in Rats Submitted to Strength Training and Growth Hormone. *Int J Morphol* 35:472–478. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022017000200015>
- Chae HW, Kim DH, Kim HS (2015) Growth hormone treatment and risk of malignancy. *Korean J Pediatr* 58:41–46. <https://doi.org/10.3345/kjp.2015.58.2.41>
- Chandrashekar V, Bartke A, Coschigano KT, Kopchick JJ (1999) Pituitary and testicular function in growth hormone receptor gene knockout mice. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/endo.140.3.6557>
- Chatelain PG, Sanchez P, Saez JM (1991) Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor I Treatment Increase Testicular Luteinizing Hormone Receptors and Steroidogenic Responsiveness of Growth Hormone Deficient Dwarf Mice\*. *Endocrinology* 128:1857–1862. <https://doi.org/10.1210/endo-128-4-1857>
- Chia DJ (2014) Minireview: Mechanisms of growth hormone- mediated gene

- regulation. *Mol Endocrinol* 28:1012–1025. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1099>
- Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ (1989) How should we count AgNORS? Proposals for a standardized approach. *J Pathol* 158:185–188. <https://doi.org/10.1002/path.1711580303>
- Cruzat VF, Donato J, Tirapegui J, Schneider CD (2008) Hormônio do crescimento e exercício físico: Considerações atuais. *Rev Bras Ciências Farm J Pharm Sci* 44:549–562. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000400003>
- De Santi M, Baldelli G, Brandi G, et al (2019) Use of hormones in doping and cancer risk. *Ann Ig* 31:590–594. <https://doi.org/10.7416/ai.2019.2319>
- De Souza MJ, Arce JC, Pescatello LS, et al (1994) Gonadal hormones and semen quality in male runners. A volume threshold effect of endurance training. *Int J Sports Med* 15:383–391. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1021075>
- De Souza MJ, Miller BE (1997) The effect of endurance training on reproductive function in male runners. A “volume threshold” hypothesis. *Sport Med* 23:357–374
- Derenzini M (2000) The AgNORs. *Micron* 31:117–120. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(99\)00067-0](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(99)00067-0)
- Gomes, R. J.; Caetano, F. H.; Hermeni, H. A.; Rogatto GP (2003) Efeitos do treinamento físico sobre o hormônio do crescimento ( GH ) e fator de crescimento semelhante à insulina ( IGF-1 ) em ratos diabéticos. *R bras Ci e Mov* 11 (3):55–60
- Gurung P, Jialal I (2020) *Physiology , Male Reproductive System*
- Husain K, Somani SM (1998) Interaction of exercise training and chronic ethanol ingestion on testicular antioxidant system in rat. *J Appl Toxicol* 18:421–429. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1263\(199811/12\)18:6<421::AID-JAT532>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1263(199811/12)18:6<421::AID-JAT532>3.0.CO;2-R)

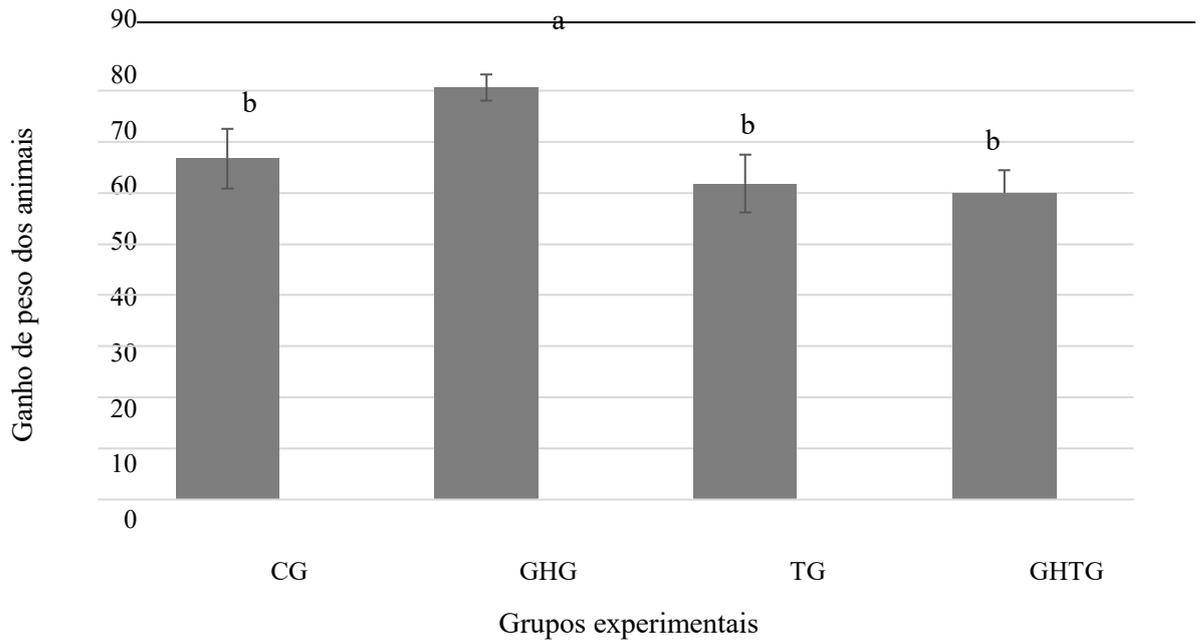
- Iliadou PK, Tsametis C, Kaprara A, et al (2015) The sertoli cell: Novel clinical potentiality. *Hormones* 14:504–514. <https://doi.org/10.14310/horm.2002.1648>
- Junqueira A, Cicogna AC, Engel LE, et al (2016) Effects of Growth Hormone on Cardiac Remodeling During Resistance Training in Rats. *Arq Bras Cardiol* 106:18–25. <https://doi.org/10.5935/abc.20160003>
- Kamenický P, Mazziotti G, Lombès M, et al (2014) Growth hormone, insulin-like growth factor-1, and the kidney: Pathophysiological and clinical implications. *Endocr Rev* 35:234–281. <https://doi.org/10.1210/er.2013-1071>
- Kaminsky P, Walker PM, Deibener J, et al (2012) Growth hormone potentiates thyroid hormone effects on post-exercise phosphocreatine recovery in skeletal muscle. *Growth Horm IGF Res* 22:240–244. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2012.08.001>
- Lee KO, Ng SC, Lee PS, et al (1995) Effect of growth hormone therapy in men with severe idiopathic oligozoospermia. *Eur J Endocrinol* 132:159–162. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1320159>
- Malheiro OCDM, Giacomini CT, Justulin LA, et al (2009) Calcaneal tendon regions exhibit different MMP-2 activation after vertical jumping and treadmill running. *Anat Rec* 292:1656–1662. <https://doi.org/10.1002/ar.20953>
- Manna I, Jana K, Samanta PK (2003) Effect of intensive exercise-induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders in mature male Wistar strain rats: A correlative approach to oxidative stress. *Acta Physiol Scand* 178:33–40. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2003.01095.x>
- Mourkioti F, Rosenthal N (2005) IGF-1, inflammation and stem cells: Interactions during muscle regeneration. *Trends Immunol* 26:535–542. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.08.002>

- Murray AW (2004) Recycling the Cell Cycle: Cyclins Revisited. *Cell* 116:221–234.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01080-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01080-8)
- Neirijnck Y, Papaioannou MD, Nef S (2019) The insulin/IGF system in mammalian sexual development and reproduction. *Int J Mol Sci* 20:.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20184440>
- Nindl BC, Pierce JR (2010) Insulin-like growth factor i as a biomarker of health, fitness, and training status. *Med Sci Sports Exerc* 42:39–49.  
<https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181b07c4d>
- Özdamar MY, Şahin S, Zengin K, et al (2018) Detection of insulin-like growth factor receptor-1 in the human cremaster muscle and its role in the etiology of the undescended testis. *Asian J Surg* 0–6. <https://doi.org/10.1016/j.asjsur.2018.02.005>
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Quinn R (2005) Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? *Nutrition*. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2005.04.002>
- Ribeiro de Oliveira Longo Schweizer J, Ribeiro-Oliveira Jr A, Bidlingmaier M (2018) Growth hormone: isoforms, clinical aspects and assays interference. *Clin Diabetes Endocrinol* 4:1–11. <https://doi.org/10.1186/s40842-018-0068-1>
- Salzano A, Marra AM, D'Assante R, et al (2018) Growth Hormone Therapy in Heart Failure. *Heart Fail Clin* 14:501–515. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2018.05.002>
- Santos FGA, Moro L, Cassali GD, et al (2011) Cell proliferation markers in the transplanted canine transmissible venereal tumor. *Arq Bras Med Vet e Zootec* 63:1345–1352.  
<https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000600010>

- Shimonovitz S, Zacut D, Chetrit A Ben, Ron M (1993) Growth hormone status in patients with maturation arrest of spermatogenesis. *Hum Reprod* 8:919–921.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138166>
- Shokri S, Aitken RJ, Abdolvahabi M, et al (2009) Exercise and Supraphysiological Dose of Nandrolone Deconoate Increase Apoptosis in Spermatogenic Cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106:324–330. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00495.x>
- Silva CM, Serakides R, Nascimento EF, et al (2003) Quantificação das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) como parâmetro para avaliar a proliferação das células da granulosa. *Arq Bras Med Vet e Zootec* 55:113–116. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352003000100019>
- Somani SM, Husain K (1996) Exercise training alters kinetics of antioxidant enzymes in rat tissues. *Biochem Mol Biol Int* 38:587–595
- Trerè D (2000) AgNOR staining and quantification. *Micron* 31:127–131.  
[https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(99\)00069-4](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(99)00069-4)
- Uysal N, Agilkaya S, Sisman AR, et al (2017) Exercise increases leptin levels correlated with IGF-1 in hippocampus and prefrontal cortex of adolescent male and female rats. *J Chem Neuroanat* 81:27–33. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2017.02.004>
- Vaamonde D, Garcia-Manso JM, Hackney AC (2017) Impacto de la actividad física y el ejercicio sobre el potencial reproductivo masculino: nuevo cuestionario de evaluación. *Rev Andaluza Med del Deport* 10:79–93. <https://doi.org/10.1016/j.ramd.2016.11.017>
- Walser M, Schiöler L, Oscarsson J, et al (2014) Different modes of GH administration influence gene expression in the male rat brain. *J Endocrinol* 222:181–190.  
<https://doi.org/10.1530/JOE-14-0223>

**Tabela 1** - Oligonucleotídeos iniciadores (“Primers”) do genes-alvos, fator de crescimento semelhante à insulina 1 e 2 (*Igf1* e *Igf2*) e receptor do hormônio de crescimento (*Ghr*) e dos genes endógenos, proteína ribossomal S18 (*Rps18*), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (*Hprt1*) e proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*) que foram utilizados na RT-qPCR.

<b>Primers</b>	<b>GeneBank</b>	<b>Produto</b>
Primer TaqMan GHR	NM_017094.1	92pb
Primer TaqMan RPS18	NM_213557.1	62pb
Primer TaqMan HPRT-1	NM_012583.2	64pb
Primer TaqMan GAPDH	NM_017008.3	175pb
Primer Taq-Man IGF1	NM_001082477.2	69pb
Primer Taq-Man IGF2	NM_001190162.1	74pb



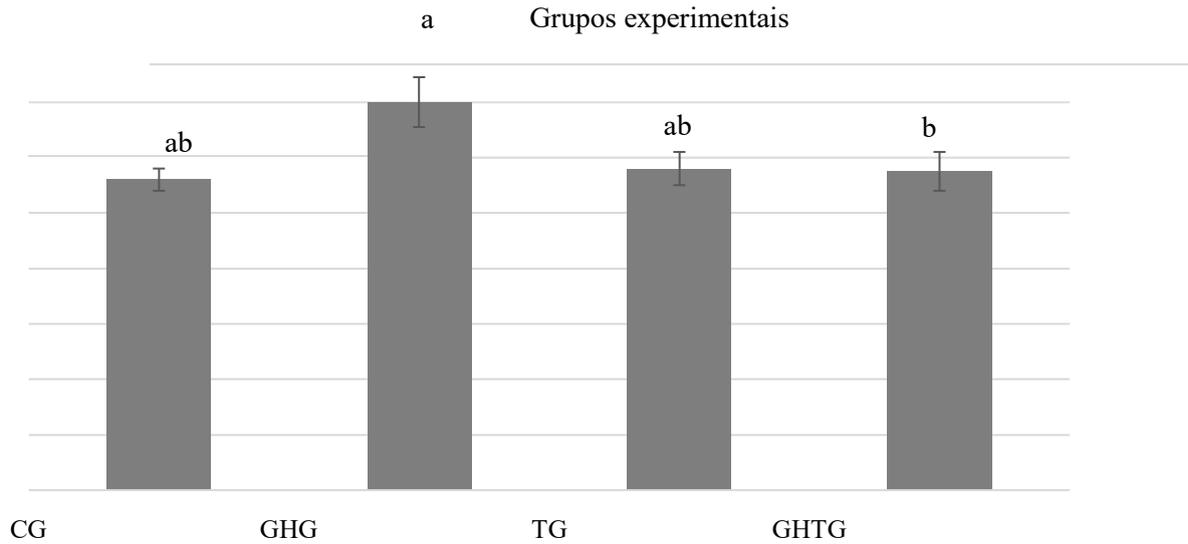
**Figura 2** – Média  $\pm$  erro padrão de ganho de peso (g) dos ratos Wistar nos diferentes grupos experimentais (n=8) no período de 30 dias. CG (Grupo controle), GHG (animais submetidos à administração de 0,2UI/Kg de hormônio do crescimento, 3 vezes por semana em dias alternados), TG (animais submetidos ao treinamento resistido de 4 séries de 10 saltos em água com 50% do peso do animal, 3 vezes por semana em dias alternados), GHTG (animais submetidos ao treinamento resistido e à aplicação de hormônio do crescimento). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $p = 0.0176$ ). ANOVA seguida de Tukey.

0.2

0

1.6  
1.4  
1.2  
1  
0.8  
0.6  
0.4

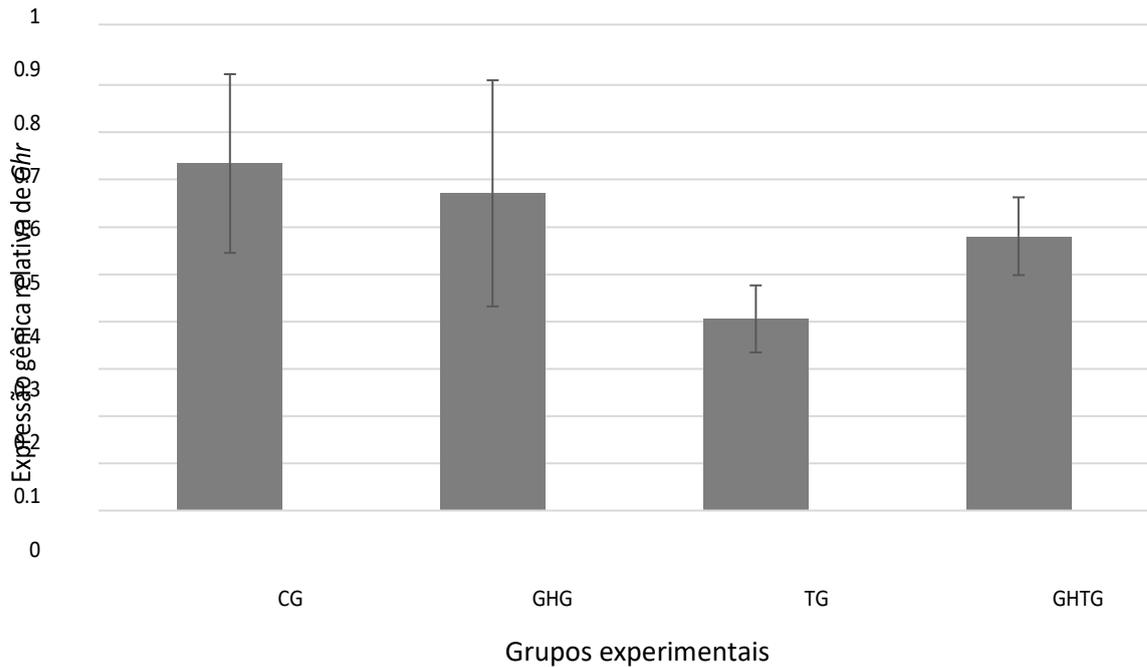
Peso médio dos testículos



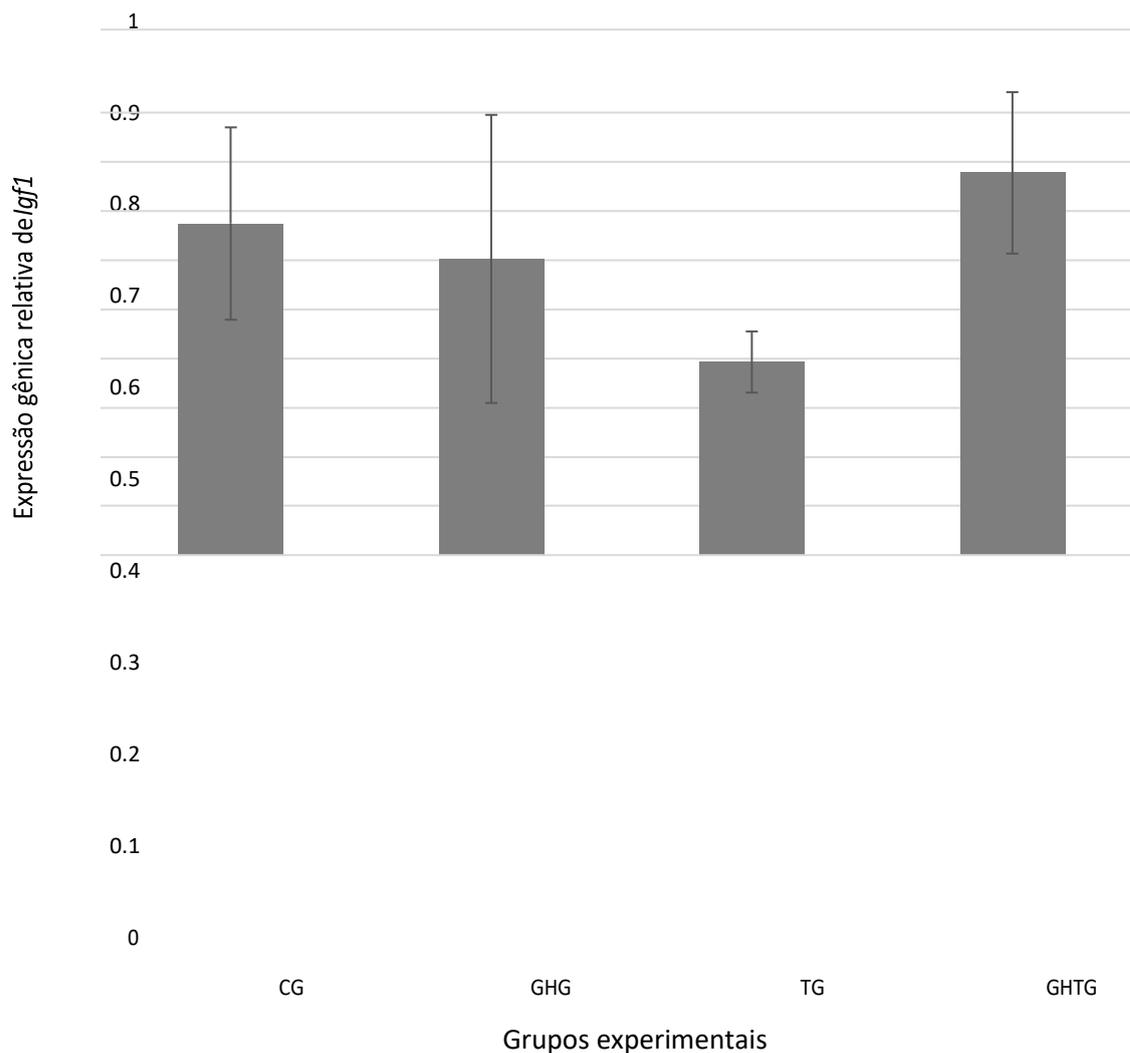
**Figura 3** - Média  $\pm$  erro padrão do peso médio dos testículos (g) dos ratos Wistar nos diferentes grupos experimentais (n=8) no período de 30 dias. CG (Grupo controle), GHG (animais submetidos à administração de 0,2UI/Kg de hormônio do crescimento, 3 vezes por semana em dias alternados), TG (animais submetidos ao treinamento resistido de 4 séries de 10 saltos em água com 50% do peso do animal, 3 vezes por semana em dias alternados), GHTG (animais submetidos ao treinamento resistido e à aplicação de hormônio do crescimento). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $p = 0.0313$ ). ANOVA seguida de Tukey.

**Tabela 2** - Média  $\pm$  erro padrão das áreas dos núcleos, áreas das NOR, número de NOR, área total de NOR e da razão entre a área do núcleo e a área de NOR dos ratos Wistar nos diferentes grupos experimentais no período de 30 dias. CG (Grupo controle), GHG (animais submetidos à administração de 0,2UI/Kg de hormônio do crescimento, 3 vezes por semana em dias alternados), TG (animais submetidos ao treinamento resistido de 4 séries de 10 saltos em água com 50% do peso do animal, 3 vezes por semana em dias alternados), GHTG (animais submetidos ao treinamento resistido e à aplicação de hormônio do crescimento). Não houve diferença significativa entre os grupos pela ANOVA ( $p>0,05$ ).

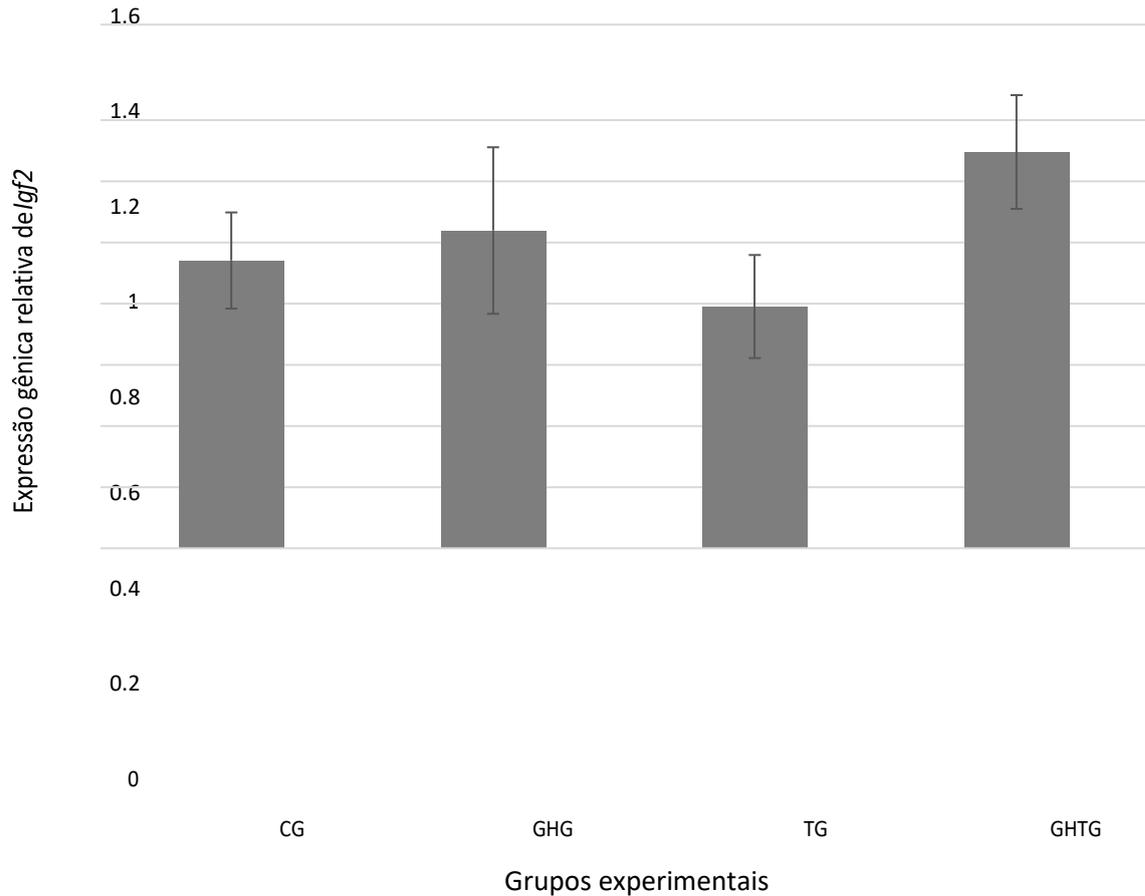
	Grupos experimentais			
	CG	GHG	TG	GHTG
Áreas dos núcleos ( $\mu\text{m}^2$ )	18852,4 $\pm$ 3776,0	20135.6 $\pm$ 4156,4	24874.8 $\pm$ 5656,7	19057,2 $\pm$ 3461,9
Áreas das NOR ( $\mu\text{m}^2$ )	40,39 $\pm$ 5,74	39,30 $\pm$ 6,44	56,91 $\pm$ 10,57	56,68 $\pm$ 12,45
Número de NOR	3,09 $\pm$ 0,18	3,16 $\pm$ 0,26	3,16 $\pm$ 0,32	3,24 $\pm$ 0,44
Área total das NOR ( $\mu\text{m}^2$ )	118,97 $\pm$ 15,25	114,70 $\pm$ 17,04	159,66 $\pm$ 23,21	148,41 $\pm$ 26,91
Área dos núcleos / áreas de NOR ( $\mu\text{m}^2$ )	147.10 $\pm$ 18.36	163.94 $\pm$ 23.48	138.56 $\pm$ 19.99	128.48 $\pm$ 15.63



**Figura 4** – Média  $\pm$  erro padrão da média da expressão gênica relativa de *Ghr* em testículos de ratos que foram submetidos aos grupos experimentais: CG (Grupo controle, n=5), GHG (animais submetidos à administração de 0,2UI/Kg de hormônio do crescimento, 3 vezes por semana em dias alternados, n=7), TG (animais submetidos ao treinamento resistido de 4 séries de 10 saltos em água com 50% do peso do animal, 3 vezes por semana em dias alternados, n=7), GHTG (animais submetidos ao treinamento resistido e à aplicação de hormônio do crescimento, n=7). A combinação dos endógenos HPRT-1 e RPS-18 foi utilizada para a normalização dos dados. Não foram encontradas diferenças entre os grupos pela ANOVA ( $p = 0.5645$ ).



**Figura 5** – Média  $\pm$  erro padrão da média da expressão gênica relativa de *Igf1* em testículos de ratos que foram submetidos aos grupos experimentais: CG (Grupo controle, n=5), GHG (animais submetidos à administração de 0,2UI/Kg de hormônio do crescimento, 3 vezes por semana em dias alternados, n=7), TG (animais submetidos ao treinamento resistido de 4 séries de 10 saltos em água com 50% do peso do animal, 3 vezes por semana em dias alternados, n=7), GHTG (animais submetidos ao treinamento resistido e à aplicação de hormônio do crescimento, n=7). A combinação dos endógenos HPRT-1 e RPS-18 foi utilizada para a normalização dos dados. Não foram encontradas diferenças entre os grupos pela ANOVA ( $p= 0,6099$ ).



**Figura 6** – Média  $\pm$  erro padrão da média da expressão gênica relativa de *Igf2* em testículos de ratos que foram submetidos aos grupos experimentais: CG (Grupo controle, n=5), GHG (animais submetidos à administração de 0,2UI/Kg de hormônio do crescimento, 3 vezes por semana em dias alternados, n=7), TG (animais submetidos ao treinamento resistido de 4 séries de 10 saltos em água com 50% do peso do animal, 3 vezes por semana em dias alternados, n=7), GHTG (animais submetidos ao treinamento resistido e à aplicação de hormônio do crescimento, n=7). A combinação dos endógenos HPRT-1 e RPS-18 foi utilizada para a normalização dos dados. Não foram encontradas diferenças entre os grupos pela ANOVA ( $p = 0.4656$ ).

## ANEXO 1

21/11/2019

Certificado

---

**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 DO GHR NOS TESTÍCULOS DE RATOS Wistar submetidos ao hormônio do crescimento e ao exercício físico", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 5167 e tendo como participante(s) LAUREN CHRYS SOATO MARIN SCHAFFER (discente), LAIS MAYUMI OSHIRO (discente), LUCIANA MACHADO GUABERTO (docente), INES CRISTINA GIOMETTI CEDA

(orientador responsável), foi avaliado e **APR. COM RECOMENDAÇÃO** 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 **APR. COM RECOMENDAÇÃO** em reunião realizada em 20/02/2019.

## MATERIAL ARMAZENADO/DOADO

Protocolo(s)	Data Aprovação	Armazenado (local)	É doação	Detalhes armazenamento
1013	23/11/2011	UNOESTE	NÃO	Laboratório de Genética Molecular - freezer -80C - Bloco Q

Presidente Prudente, 21 de Fevereiro de 2019.

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

Profª Ms. Adriana  
Falco 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](http://www.unoeste.br/sgp) informando o código de segurança  
**b1531a6edd244c9cca4389f2b209b544**

<https://www.unoeste.br/SGP/certificados/ver.asp?h=b1531a6edd244c9cca4389f2b209b544>

## **ANEXO 2**

EUROPEAN JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY

Instructions for

Authors TYPES OF

PAPERS

THE JOURNAL PUBLISHES ORIGINAL ARTICLES, EDITORIALS,  
INVITED

REVIEWS, LETTERS TO THE EDITOR, AND REPLIES.

### **• INSTRUCTIONS FOR INVITED REVIEWS**

THE EUROPEAN JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY (EJAP) NOW PUBLISHES INVITED REVIEWS ONLY. THE JOURNAL WELCOMES TOPICS FROM PHYSIOLOGICAL MECHANICS, BIOCHEMISTRY, ENDOCRINOLOGY, ERGONOMICS, IMMUNOLOGY, MOTOR CONTROL, NEUROSCIENCE AND NUTRITION.

INVITATIONS ARE ISSUED BY THE REVIEWS EDITOR MICHAEL LINDINGER  
(MI.LINDINGER@GMAIL.COM) ON BEHALF OF EJAP.

AUTHORS WISHING TO SUBMIT PROPOSALS FOR CONSIDERATION ARE WELCOME TO CONTACT THE REVIEWS EDITOR, PROVIDING A BRIEF DESCRIPTION OF THE REVIEW TOPIC (I.E. TITLE AND ONE-PARAGRAPH SUMMARY). IF A PROPOSAL IS DEEMED TO BE RELEVANT AND APPROPRIATE AFTER AN INITIAL EVALUATION, AUTHORS WILL RECEIVE A FORMAL INVITATION TO WRITE THE REVIEW.

- MAXIMUM MANUSCRIPT SIZE IS 15 PRINTED PAGES (4500-5000 CHARACTERS/PAGE)

- COLORED ILLUSTRATIONS HIGHLIGHTING CRITICAL CONCEPTS ARE STRONGLY ENCOURAGED

- NO LIMITATION TO NUMBER OF REFERENCES

- ABSTRACTS SHOULD AIM FOR 150-250 WORDS

- ABSTRACTS SHOULD CONTAIN THE NEED FOR THE REVIEW,

## PRIMARY OBJECTIVES AND LOGICAL CONCLUSIONS

- ABSTRACTS MUST NOT CONTAIN UNDEFINED ABBREVIATIONS OR REFERENCES
- **INSTRUCTIONS FOR LETTERS TO THE EDITOR**

IN ADDITION TO MANUSCRIPTS, LETTERS OR COMMENTS DISCUSSING AN ARTICLE PUBLISHED IN THE PAST SIX MONTHS IN EJAP ARE WELCOME AND MAY APPEAR IN PRINT IN ONE OF THE FOLLOWING ISSUES. EACH COMMENT WILL BE SENT TO THE CORRESPONDING AUTHOR OF THE DISCUSSED ARTICLE TOGETHER WITH AN INVITATION TO RESPOND. THE COMMENT AND THE REPLY MAY BE SENT TO AN INDEPENDENT REFEREE. HOWEVER, THE

EDITOR-IN-CHIEF WILL MAKE THE FINAL DECISION WHETHER THE CORRESPONDENCE WILL BE PUBLISHED. EJAP ALLOWS THE ORIGINAL AUTHOR A DEADLINE OF TWO WEEKS TO REPLY. IF NO ANSWER IS RECEIVED WITHIN THIS TIMEFRAME, THE EDITOR-IN-CHIEF WILL DECIDE IF THE LETTER OR COMMENT WILL BE PUBLISHED WITHOUT RESPONSE. LETTERS AND COMMENTS MAY BE EDITED AND SHORTENED FOR REASONS OF CLARITY AND SPACE. IN ORDER TO AVOID LONG DISPUTES, ONLY THE ORIGINAL COMMENT TOGETHER WITH THE AUTHOR'S RESPONSE WILL BE PUBLISHED. ANY ADDITIONAL COMMENTS OR REMARKS SHOULD BE SENT TO THE AUTHORS DIRECTLY AND WILL NOT FURTHER BE HANDLED BY EJAP.

- MAXIMUM MANUSCRIPT SIZE IS 1000 WORDS

- MAXIMUM NUMBER OF REFERENCES IS 5

- FIGURES CAN BE ADDED TO CLARIFY THE WRITTEN CONTENT

- PLEASE INCLUDE A SEPARATE PAGE WITH A SHORT TITLE, THE WRITER'S NAME, AFFILIATIONS AND THE EXACT CITATION OF THE ARTICLE COMMENTED ON

### ARTICLE REQUIREMENTS

TO FACILITATE RAPID PUBLICATION MANUSCRIPTS SHOULD BE PREPARED CAREFULLY IN ACCORDANCE WITH THE FOLLOWING REQUIREMENTS.

THE CONFLICT OF INTEREST IS MANDATORY FOR ALL ARTICLES TYPES. [SPECIAL ISSUES](#)

- CONTRIBUTIONS THAT ARE PART OF A SPECIAL ISSUE MUST INCLUDE THE FOLLOWING FOOTNOTE ON THE TITLE PAGE:

"THIS ARTICLE IS PUBLISHED AS PART OF THE SPECIAL ISSUE ON [TITLE OF THE SPECIAL ISSUE]"

## MANUSCRIPT SUBMISSION

### *Manuscript Submission*

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

### *Permissions*

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been

granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

### *Online Submission*

Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

### *Author Contribution Statement*

Authors must provide a short description of the contributions made by each listed author (please use initials). This will be published in a separate section in front of the Acknowledgments.

For example: AM and DB conceived and designed research. AM and BB conducted experiments. GR contributed new reagents or analytical tools. AM and GR analyzed data. AM wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

## TITLE PAGE

### *Title Page*

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

### Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results
- Conclusion

### Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

### Abbreviations

Authors are allowed to use abbreviations when appropriate, but these should be used sparingly. Abbreviations should be defined at first mention in the text and supplied as a list, in alphabetical order, to be included after the keywords, e.g.

**ANOVA**

**Analysis of variance**

EMG

Electromyography

MVC

Maximal voluntary contraction

If there are no abbreviations, state "None" in the Abbreviation list.

### Specific remarks on Abstract

The sections should describe briefly and concisely the background and aim/hypothesis of the investigation, the most important methods, the major results and the conclusions drawn. Major results should be presented quantitatively where appropriate, and changes reported must be expected to be statistically significant (e.g. write "endurance time increased from  $a \pm b$  to  $c \pm d$  min" and not "endurance time increased ( $P < 0.01$ )"). The conclusion should highlight the physiological significance of the study and not be a repetition of the results. The abstract should not contain any undefined abbreviations and references may not be cited.

TEXT

### Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages. Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package

#### Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

#### Result section

The results should describe the experimental findings in a way that it is easy to read. The text should be comprehensible to scientifically interested persons, who are not necessarily specialists in the particular field of the investigation. Thus, the text in the results section should be presented with focus on physiology and the outcome of statistical analyses should generally be limited to those used to test specified hypotheses. We encourage inclusion of complete statistical analyses and full data sets at the individual level, but these should be presented in tables or as Electronic Supplementary Material (ESM).

Figures should, if possible, include original records obtained during the actual experiments, and not simply group-mean responses. For instance, representative original records provide a good indication of the signal-to-noise relation and they can be used to show how measurements were performed. Moreover, the inclusion of original records is an excellent way of illustrating complex differences between groups.

#### Conclusions section

Authors should provide concise conclusions to their work and are encouraged to put their results into a wider physiological context. The conclusions must not just be a repetition of the results.

#### Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

#### SCIENTIFIC STYLE

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

#### REFERENCES

## Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

## Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

- **Journal article**

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- **Article by DOI**

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- **Book**

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- **Book chapter**

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- **Online document**

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- **Dissertation**

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 2 kB)

Please note:

The Editors-in-Chief highly disapprove of using dissertations as primary sources.

#### TABLES

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

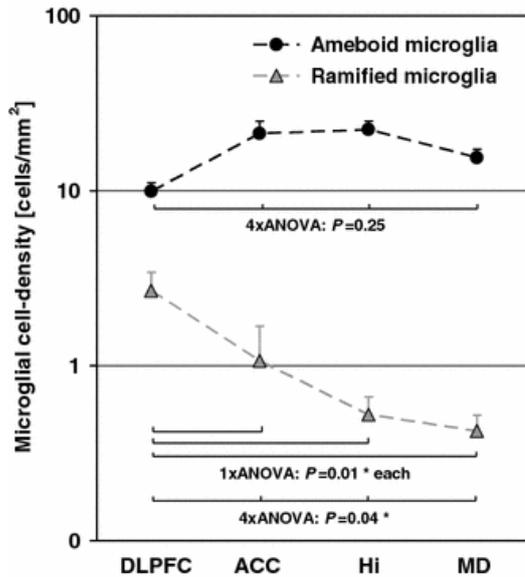
#### ARTWORK

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

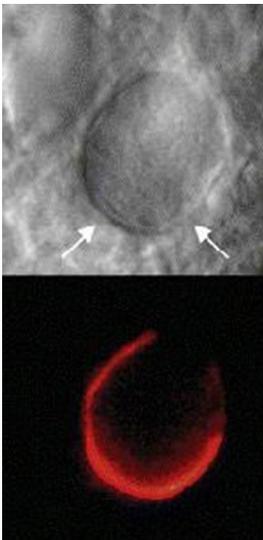
#### Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g.,

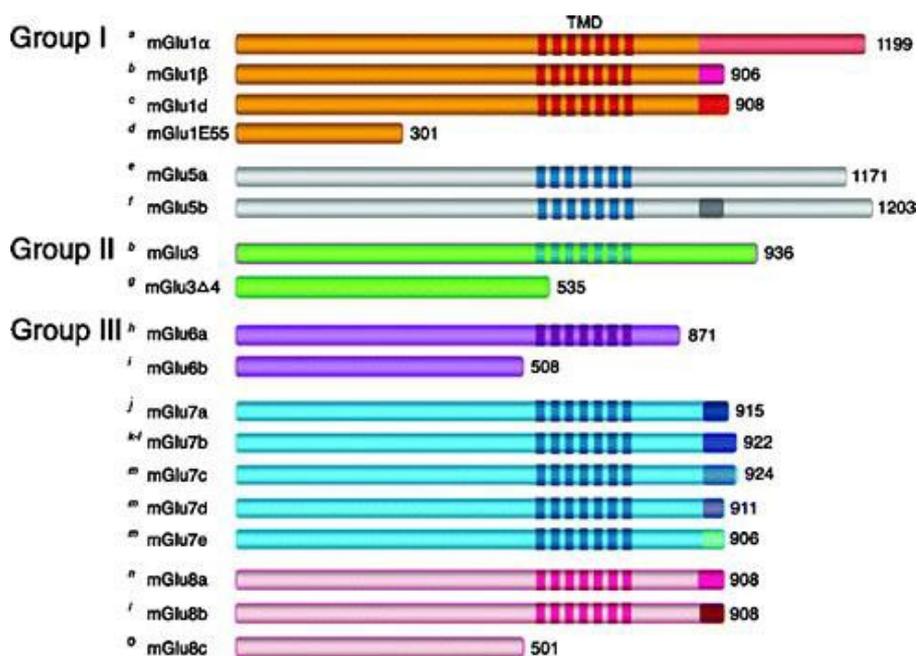
Fig1.eps. [Line Art](#)



- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files. [Halftone Art](#)



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi. [Combination Art](#)



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

#### Color Art

- Color art is free of charge for print and online publication.
- Color illustrations should be submitted as RGB.

#### Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

#### Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

#### Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

#### Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.
- For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

#### Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

#### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

<https://www.springer.com/authors/manuscript+guidelines?SGWID=0-40162-6-795169-0>