



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

**LAUREN CHRYS SOATO MARIN**

**AÇÃO DA N-ACETILCISTEÍNA ASSOCIADA AO TREINAMENTO  
CONCORRENTE EM PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE RATOS  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Presidente Prudente - SP  
2024



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

**LAUREN CHRYS SOATO MARIN**

**AÇÃO DA N-ACETILCISTEÍNA ASSOCIADA AO TREINAMENTO  
CONCORRENTE EM PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE RATOS  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

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

Orientadora:  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ines Cristina Giometti

636.089  
M337a

Marin, Lauren Chris Soato.

Ação da N-acetilcisteína associada ao treinamento  
concorrente em parâmetros reprodutivos de ratos  
espontaneamente hipertensos / Lauren Chris Soato  
Marin. – Presidente Prudente, 2024.

81f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal)  
- Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente  
Prudente, SP, 2024.

Bibliografia.

Orientador: Ines Cristina Giometti.

1. NAC. 2. SHR. 3. VEGF. 4. Exercício. I. Título.

**LAUREN CHRYS SOATO MARIN**

**AÇÃO DA N-ACETILCISTEÍNA ASSOCIADA AO TREINAMENTO  
CONCORRENTE EM PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE RATOS  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Tese de doutorado apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora - Área de Concentração: Fisiopatologia e Saúde Animal.

Presidente Prudente, 9 de agosto de 2024.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ines Cristina Giometti  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giovana Rampazzo Teixeira  
Universidade Estadual Paulista – Unesp  
Presidente Prudente-SP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes  
Universidade Estadual de Londrina – UEL  
Londrina-PR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Caliê Castilho  
Universidade do Oeste Paulista  
Presidente Prudente -SP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Junqueira  
Universidade do Oeste Paulista  
Presidente Prudente -SP

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta tese aos meus pais Valdir Marin e Olga Soato Marin, à minha irmã Geisa Valéria Soato Marin Diniz Grangeia, que estiveram ao meu lado no momento mais sombrio e doloroso da minha vida, sempre me apoiando e me incentivando a seguir em frente, sem olhar para trás.

## **AGRADECIMENTOS**

Meus singelos agradecimentos 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 incentivou 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, à Profª Drª Caliê Castilho, à Profª Drª Francis Lopes Pacagnelli, à Profª Drª Gisele Nai, à Profª Drª Giovana Rampazzo Teixeira e à Profª Drª Glaura Scantamburlo Alves Fernandes por todos os ensinamentos e ajuda, fazendo com que este doutorado fosse uma imersão total na vida acadêmica.

Agradeço também aos meus colegas 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 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

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

*“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”. (Claude Lévi-Strauss)*

## RESUMO

### **Ação da N-acetilcisteína associada ao treinamento concorrente em parâmetros reprodutivos de ratos espontaneamente hipertensos**

A hipertensão arterial (HA) leva a um estresse oxidativo que é deletério para diferentes tipos celulares, sendo um importante fator de risco para a saúde humana. Um dos sistemas que sofrem esses efeitos indesejáveis da hipertensão é o reprodutor. Os exercícios físicos melhoram a hipertensão e a saúde geral do organismo e a NAC tem efeito antioxidativo nas células. Este estudo foi dividido em dois Capítulos: o Capítulo I é uma revisão de literatura sobre o tema e o Capítulo II é um estudo experimental no formato de artigo científico que descreve o experimento realizado com a verificação da ação da n-acetilcisteína (NAC) associada ao treinamento concorrente na angiogênese e no estresse oxidativo de testículos de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Foi realizado utilizando 48 ratos SHR que foram divididos em 4 grupos com 12 animais: Grupo sedentário controle (S); Grupo treinamento concorrente (TC), SHR submetidos ao protocolo de treinamento concorrente da associação do exercício aeróbico em esteira com o resistido (quatro subidas na escada com cargas), três vezes por semana, em dias alternados, por um período de oito semanas; Grupo sedentário NAC (SNAC), SHR que receberam a NAC na dose de 120mg/kg/dia via oral por oito semanas; e Grupo NAC + Treinamento concorrente (TNAC). Os testículos dos animais foram utilizados para: morfologia testicular e espermática; a expressão de mediadores relacionados à angiogênese, ao estresse oxidativo e apoptose; e o perfil oxidativo. O exercício físico melhora a hipertensão e a saúde geral do corpo e a n-acetilcisteína (NAC) tem um efeito antioxidante nas células. O objetivo da pesquisa foi verificar a ação da NAC associada ao treinamento concorrente na angiogênese e estresse oxidativo testicular de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). A NAC aumentou a quantidade de AR, de VEGF dimérico, de FLT1, de MDA e de GSH nos testículos. O treinamento concorrente aumentou AR, GSH e a atividade de GST e reduziu HIF1 $\alpha$  e caspase 3 testiculares. Houve interação entre NAC e o treinamento no aumento de AR e dos fatores angiogênicos. Nenhuma diferença foi observada na morfologia espermática, no diâmetro dos túbulos seminíferos e na dosagem hormonal. Conclui-se que a NAC associada ao treinamento concorrente aumenta os mediadores angiogênicos, a

glutathiona e o receptor de andrógeno nos testículos de SHR. Além disso, o treinamento concorrente diminui o estresse oxidativo testicular. Outros parâmetros reprodutivos ainda devem ser estudados, que não foram verificados nesse estudo, como motilidade e concentração espermáticos.

**Palavras-chave:** exercício, NAC, receptores, reprodução, SHR, VEGF.

## ABSTRACT

### **Action of n-acetylcysteine associated with concurrent training on reproductive parameters of spontaneously hypertensive rats**

High blood pressure leads to oxidative stress that is harmful to different cell types, being an important risk factor for human health. One of the systems that suffer these undesirable effects of hypertension is the reproductive system. Physical exercise improves hypertension and the body's general health and n-acetylcysteine (NAC) has an anti-oxidative effect on cells. This study was divided into two Chapters: Chapter I is a literature review on the topic and Chapter II is an experimental study in the format of a scientific article that describes the experiment carried out to verify the action of n-acetylcysteine (NAC) associated to concurrent training on angiogenesis and oxidative stress in testicles of spontaneously hypertensive rats (SHR). It was carried out using 48 SHR rats that were divided into 4 groups with 12 animals: Control sedentary group (S); Concurrent training group (TC), SHR submitted to the concurrent training protocol combining aerobic exercise on a treadmill with resistance exercise (four climbs up the stairs with loads), three times a week, on alternate days, for a period of eight weeks; NAC sedentary Group (SNAC), SHR who received NAC at a dose of 120mg/kg/day orally for eight weeks; and NAC Group + Concurrent Training (TNAC). The animals' testicles were used for: testicular and sperm morphology; the expression of mediators related to angiogenesis, oxidative stress and apoptosis; and the oxidative profile. Physical exercise improves hypertension and the body's general health and n-acetylcysteine (NAC) has an antioxidant effect on cells. The objective of the research was to verify the action of NAC associated with concurrent training on angiogenesis and testicular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats (SHR). A NAC aumentou a quantidade de AR, de VEGF dimérico, de FLT1, de MDA e de GSH nos testículos. O treinamento composto aumentou AR, GSH e a atividade de GST e prejudicial HIF1 $\alpha$  e caspase 3 testiculares. Houve interação entre NAC e o treinamento no aumento de AR e dos fatores angiogênicos. Nenhuma diferença foi observada na morfologia espermática, no diâmetro dos túbulos seminíferos e na dosagem hormonal. Conclui-se que o NAC associado ao treinamento concorrente aumenta os mediadores angiogênicos, a glutatona e o receptor de andrógeno nos testículos de SHR. Além disso, o

treinamento concomitante diminui o estresse oxidativo testicular. Outros parâmetros reprodutivos ainda devem ser treinados, que não foram verificadas nesse estudo, como motilidade e concentração espermática.

**Keywords:** exercise, NAC, receptors, reproduction, SHR, VEGF.

## LISTA DE SIGLAS

ABP	- Proteína de ligação ao andrógeno
AINE	- Antiinflamatório não estereoidal
AMPc	- Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	- Análise de variância
AR	- Receptor de anfrógeno
AVC	- Acidente vascular cerebral
BTB	- Barreira hemato-testicular
CASP	- Caspase 3
CAT	- Catalase
CEUA	- Comitê de ética no uso de animais
CPE	- Células progenitoras endoteliais
CV	- Cardiovascular
DCV	- Doença cardiovascular
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DSS	- Ratos sensíveis ao sal
EO	- Estresse oxidativo
ERO	- Espécie reativa de oxigênio
EX	- Exercício físico
FA	- Fibrilação arterial
FHH	- Ratos hipertensos de capuz fulvo
FLT1	- Receptor de tirosina quinase semelhante a Fms
FSHR	- Receptor do hormônio folículo-estimulante
GAPDH	- Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
T	- Grupo treinamento concorrente
TNAC	- Grupo N-acetilcisteína + treinamento concorrente
GSS	- Glutathiona sintetase
GSSG	- Glutathiona oxidada
GST	- Glutathiona S-transferase
GSH	- Glutathiona
GT	- GT total
H2O2	- Peróxido de hidrogenio
HAR	- Hipertensão resistente
HIF1	- Fator de indução por hipóxia

HIF1a	- Fator de indução por hipóxia 1 alfa
HO*	- Radical hidroxila
HOCl	- Ácido hipocloroso
HPE	- Hipotensão pós-exercício
HPRT1	- Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1
IEO%	- % de Índice de estresse oxidativo
IMF	- Infertilidade por fator masculino
KDR	- Receptor de domínio de inserção de quinase
LH	- Hormônio luteinizante
MDA	- Malondialdeído
MMHG	- Milímetros de mercúrio
NO	- Óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	- Superóxido
ONOO <sup>-</sup>	- Peroxinitrito
PA	- Pressão arterial
QPCR	- Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA	- Ácido ribonucleico
RPS18	- Proteína Ribossomal S18
RT	- Transcrição reversa
S	- Grupo controle, sedentário
SNAC	- Grupo N-acetilcisteína
SC	- Células de Sertoli
SHR	- Rato espontaneamente hipertenso
SM	- Síndrome metabólica
SOD	- Superóxido desmutase
T	- Grupo treinamento concorrente
TNAC	- Grupo N-acetilcisteína + treinamento concorrente
VE	- Ventrículo esquerdo
VEGF	- Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR1	- Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1
VEGFR2	- Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2
WKYR	- Rato Wistar-Kyoto

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>13</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Hipertensão arterial (HA).....</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Hipertensão e reprodução masculina.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3</b>	<b>Ratos espontaneamente hipertensos (SHR).....</b>	<b>17</b>
<b>2.4</b>	<b>Exercícios físicos e hipertensão.....</b>	<b>23</b>
<b>2.5</b>	<b>Exercícios físicos e reprodução masculina.....</b>	<b>25</b>
<b>2.6</b>	<b>Estresse oxidativo.....</b>	<b>28</b>
<b>2.7</b>	<b>Antioxidante N-acetilcisteína (NAC).....</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>34</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>
	<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>51</b>
	<b>ANEXO I – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO CEUA.....</b>	<b>72</b>
	<b>ANEXO II – NORMAS DA REVISTA MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION.....</b>	<b>73</b>

## CAPÍTULO I

### 1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial (HA) é uma doença crônica não transmissível que possui uma alta prevalência na população e é considerada um dos maiores problemas de saúde pública (Lerman *et al.*, 2019), levando a aproximadamente 7,6 milhões de mortes por ano no mundo (Kitt *et al.*, 2019) e tendo 1 bilhão e 300 milhões de pessoas acometidas pela doença (OMS, 2023). É um importante fator de lesão vascular e doença aterosclerótica e é o principal fator de risco para eventos cardiovasculares, incluindo acidentes vasculares cerebrais (Rivas *et al.*, 2021). No entanto, na maioria dos indivíduos, a causa precisa da pressão arterial (PA) elevada não pode ser determinada, por ser multifatorial e ter uma complexa fisiopatologia (Malachias *et al.*, 2016) (Cepaityte *et al.*, 2023).

Os fatores de risco incluem: idade avançada, obesidade, alto consumo de cloreto de sódio (NaCl) e baixa ingestão de potássio na dieta, embora estes pareçam contribuir, mas não causar a hipertensão (Barrows; Ramezani; Raj, 2019; Dybiec *et al.*, 2023; Lerman *et al.*, 2019). Estudos apontam que o estresse oxidativo tem fundamental relação na patogênese dessa doença (Rodrigo; Gonzalez; Paoletto, 2011; Montezano; Touyz, 2012) (Cepaityte *et al.*, 2023).

A HA leva a alterações sistêmicas importantes e prejudica drasticamente a função normal dos órgãos ao longo do tempo. Ela afeta cerca de 700 milhões de homens em idade reprodutiva e homens hipertensos apresentam risco aumentado para distúrbios reprodutivos, como disfunção erétil. Os estudos relataram associações entre diminuição da fertilidade do sexo masculino e qualidade do sêmen com alterações na saúde geral dos homens (Colli *et al.*, 2019).

Ratos hipertensos apresentaram morfologia testicular alterada, principalmente alterações vasculares e vasomotricidade testicular prejudicada. Ratos hipertensos também apresentaram diminuição na concentração espermática, danos na integridade do DNA, aumento nas porcentagens de espermatozoides com mitocôndrias disfuncionais, atividade do ânion superóxido intracelular e morfologia anormal (Barrows *et al.*, 2019) (Colli *et al.*, 2019). O estresse oxidativo é um fator expressivo para a infertilidade masculina devido à alta taxa de divisão celular e ao consumo de oxigênio mitocondrial no tecido testicular (Asadi *et al.*, 2017; Ayad *et al.*, 2022).

Nesse sentido, a N-acetilcisteína (NAC) apresenta potencial para o tratamento de HA por combater o estresse oxidativo, já que é um potente antioxidante e que reduz diretamente os radicais livres mediante interação com o radical hidroxila e peróxido de hidrogênio. Age também induzindo a síntese de glutathiona (GSH), cuja principal função é a remoção de radicais livres e defesa contra o estresse oxidativo (Alahmar, 2019; Finkel; Holbrook, 2000; Cepaityte *et al.*, 2023).

Showell e colaboradores, em sua revisão sistemática de literatura concluíram que, em humanos, o sistema antioxidante corporal, sozinho, não é capaz de prevenir complicações prejudiciais do estresse oxidativo, e, portanto, o uso de antioxidantes pode melhorar o processo de espermatogênese (Showell *et al.*, 2011). Há evidências de que uso da NAC por três meses melhore a motilidade e a concentração espermática quando comparada ao placebo (Ciftci *et al.*, 2009; Jannatifar *et al.*, 2019) e que em seis meses, a concentração espermática teve melhora quando comparada ao placebo e ao uso do selênio (Safarinejad; Safarinejad, 2009). A NAC também melhorou a concentração espermática e a reação de acrossoma reduzindo as espécies reativas de oxigênio (EROs) e a oxidação do DNA espermático (Comhaire *et al.*, 2000; Jannatifar *et al.*, 2019).

A atividade física é reconhecida por sua importância para a saúde geral do indivíduo, entretanto, os estudos descrevendo uma relação entre a atividade física e a qualidade seminal são inconsistentes, com resultados bem contraditórios. Sendo que, tanto a intensidade quanto a modalidade do exercício físico interferem na saúde reprodutiva masculina. Há correlação positiva entre a dieta hipotensiva e atividade física nos parâmetros de fertilidade (concentração e quantidade espermática) em homens saudáveis (Danielewicz *et al.*, 2019; Belladelli *et al.*, 2023).

Há aumento na expressão de enzimas antioxidantes em vários tecidos, após treinamento aeróbio ou anaeróbio (Aurino de Pinho *et al.*, 2010; Koike *et al.*, 1992), e também redução na expressão de enzimas pró-oxidantes. Reforçando-se assim, a indicação de exercício físico para o tratamento não medicamentoso da HA (Malachias *et al.*, 2016; Belladelli *et al.*, 2023).

A presente revisão de literatura objetivou analisar os efeitos da suplementação por NAC sobre o sistema reprodutor masculino, quando associada ao treinamento combinado (exercício aeróbico associado ao treinamento resistido), para a modulação do estresse oxidativo em indivíduos hipertensos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Hipertensão arterial (HA)

A HA é a doença crônica mais comum no mundo e produz alta morbidade e mortalidade (Lerman *et al.*, 2019). É caracterizada por índices maiores que 140 milímetros de mercúrio (mmHg) de diástole e por índices acima de 90 mmHg de sístole em jovens adultos (Barroso *et al.*, 2021; Dybiec *et al.*, 2023; Keasley *et al.*, 2020). Esses valores são encontrados na Sociedade Internacional de Hipertensão (ISH) e pela Associação Renal Europeia (ERA) (Mancia *et al.*, 2023).

Muitas vezes, a HA é assintomática, especialmente nas fases iniciais, levando à sua descrição como um “assassino silencioso” (Kitt *et al.*, 2019), já que é associada a um risco aumentado de morte prematura cardiovascular, e sua forma grave se manifesta como hipertensão resistente (Dybiec *et al.*, 2023). Estudos clínicos relataram que o risco de mortalidade duplica com aumentos na pressão arterial sistólica de 120 mmHg para 140 mmHg e de 140 mmHg para 160 mmHg em todas as faixas etárias (Barrows; Ramezani; Raj, 2019; Dybiec *et al.*, 2023; Rivas *et al.*, 2021).

A hipertensão crônica é a causa mais comum de disfunção diastólica assintomática, que engloba anormalidades no enchimento diastólico, distensibilidade ou relaxamento do ventrículo esquerdo. A sobrecarga de volume e pressão causam diferentes tipos de remodelação do ventrículo esquerdo e desenvolvimentos fisiopatológicos (Di Palo; Barone, 2020). Além disso, a HA é um fator de risco para fibrilação atrial, sendo que metade das pessoas com fibrilação arterial tem hipertensão, tornando a medição da pressão arterial um aspecto importante do cuidado desses pacientes (Kitt *et al.*, 2019).

Como o oxigênio é um pré-requisito importante para a respiração aeróbica, é essencial para os sistemas cardiovasculares manterem a homeostase celular (Yu *et al.*, 2022; Richalet *et al.*, 2023). No entanto, quando o suprimento de oxigênio não atende à demanda de energia celular, o corpo sofre de hipóxia, e as células são forçadas a passar por respiração anaeróbica (Sendoel; Hengartner, 2014; Yu *et al.*, 2022). A hipóxia leva à disfunção celular e até mesmo à morte celular, que é uma das principais causas de doenças cardiovasculares (DCVs), incluindo aterosclerose,

hipertensão arterial pulmonar (HAP), remodelação vascular e insuficiência cardíaca (Abe; Semba; Takeda, 2017; Beaudin *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2022)

Na HA, a hipóxia desempenha um papel crucial, pois os fatores induzíveis por hipóxia (HIFs) são os principais fatores de transcrição para respostas hipóxicas adaptativas, que orquestram a transcrição de vários genes envolvidos na angiogênese, eritropoiese, metabolismo glicolítico, inflamação e assim por diante (Richalet *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2022).

A angiogênese é um dos principais impulsionadores da adaptação do coração no cenário de sobrecarga da pressão arterial e esta angiogênese, é uma resposta adaptativa do coração para evitar a apoptose dos cardiomiócitos (Thandavarayan *et al.*, 2020; Ross *et al.*, 2023).

A HA leva a um estresse oxidativo com a liberação de EROs, excedendo a capacidade antioxidante endógena, levando à morte celular. Em níveis cardiovasculares, o estresse oxidativo está altamente implicado no infarto do miocárdio, isquemia/reperfusão ou insuficiência cardíaca (Dubois-Deruy *et al.*, 2020; Cohen; Fuchs, 2021; Mass; Jansen, 2023).

Como estamos falando da pressão arterial, a angiotensina é uma das principais moléculas na regulação da pressão arterial. A angiotensina II, em particular, é um potente vasoconstritor que aumenta a pressão arterial através de diversos mecanismos: contração da musculatura lisa vascular atuando nos receptores AT1, provocando contração e aumento da resistência vascular periférica; liberação de aldosterona pelas glândulas adrenais, promovendo a retenção de sódio e água nos rins, contribuindo para o aumento do volume sanguíneo e da pressão arterial; estimula diretamente o coração, aumentando a frequência cardíaca e a força de contração, o que contribui para o aumento da pressão arterial; promove a proliferação de células musculares lisas, contribuindo para o espessamento das paredes dos vasos sanguíneos e para o desenvolvimento da aterosclerose (Oparil; Calhoun, 2019; Barrow *et al.*, 2019; Rivas *et al.*, 2021; Cunha; Carvalho, 2021; Liao; Yang, 2023).

A HA é uma condição clínica, de etiologia multifatorial e fisiopatologia complexa, e por isso, correntemente associada a alterações metabólicas, funcionais e estruturais dos órgãos-alvo (coração, rim, cérebro, vasos) e possivelmente do sistema imunológico (Cepaityte *et al.*, 2023). Muitos fatores podem ser a causa da hipertensão resistente, mas a hipervolemia, medicamentos como anti-inflamatórios

não esteroides (AINEs), glicocorticosteroides ou antidepressivos, hipertensão secundária à causas diversas, como aldosteronismo, doença renal ou apneia do sono, ou ainda, atividade excessiva do sistema nervoso simpático devido ao estresse crônico ou dor devem ser considerados como os mais importantes (Dybiec *et al.*, 2023).

Estudos epidemiológicos têm mostrado uma forte associação entre estilos de vida sedentários e fatores de risco cardiovascular, incluindo obesidade, diabetes e hipertensão, bem como uma associação entre inatividade física com doença cardiovascular e mortalidade por todas as causas (Wyss *et al.*, 2020). No entanto, na maioria dos indivíduos, a causa precisa da pressão arterial elevada não pode ser determinada, sendo classificada como hipertensão primária ou essencial. Os fatores de risco que contribuem para a hipertensão primária, mas não são a causa, incluem a idade avançada, a obesidade, o alto consumo de NaCl e baixo de potássio na dieta. O perfil renina-sódio tem sido utilizado para classificar a hipertensão primária, pois os indivíduos apresentam diferente sintomatologia, porém o tratamento pode ser influenciado pela etnia e pelas doenças associadas à hipertensão (Lerman *et al.*, 2019).

A hipertensão é uma patologia que causa declínio no funcionamento de todos os sistemas do organismo (Colli *et al.*, 2019; Guzik; Touyz, 2017; Sun, 2015), pois está associada a alterações metabólicas, funcionais e estruturais de vários órgãos e sistemas, incluindo o sistema imunológico (Montezano; Touyz, 2012; Williams *et al.*, 2018), endócrino e reprodutor (Rivas *et al.*, 2021). Observam-se alterações estruturais na micro e na macrocirculação, independente da causa primária da HA sistêmica, o que leva à manutenção da pressão arterial elevada e acarreta em danos a diferentes órgãos do organismo (Lerman *et al.*, 2019).

## 2.2 Hipertensão e reprodução masculina

A literatura recente tem demonstrado uma relação entre o potencial fértil dos homens e a saúde masculina geral. Muitos estudos têm demonstrado relação entre redução nas taxas de fertilidade e/ou na qualidade do sêmen e a ocorrência de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, alterações metabólicas e doenças de pele, para citar algumas. Um ponto chave são as alterações da

microcirculação local, onde ocorrem remodelamento arteriolar, alterações do tônus vascular e alterações na densidade dos vasos (Colli *et al.*, 2019).

Reduções no fluxo sanguíneo para o testículo podem desempenhar um papel importante na patogênese da infertilidade masculina. Como esse órgão dependente de oxigênio, funciona em um estado de quase anoxia, tal diminuição no fluxo sanguíneo pode muito provavelmente ter efeitos profundos na morfologia do tecido que predisporia a várias formas de hipoespermatogênese com consequente comprometimento da capacidade reprodutiva (Azu, 2015).

A espermatogênese é um processo complexo e altamente regulado que ocorre nos testículos e envolve a produção de espermatozoides maduros (Clermont, 1972; Kretser; Burger, 1990; Russell; Griswold, 1993; Aitken, 2014).

A espermatogênese e a hipertensão estão em uma relação complexa e frequentemente negligenciada. Apesar de serem processos fisiológicos distintos, ambos são sensíveis ao estresse oxidativo, que pode afetar negativamente a qualidade do espermatozoide e aumentar o risco de complicações cardiovasculares (Aitken, 2014; Jannatifar *et al.*, 2019; Oparil; Calhoun, 2019; Lunetti *et al.*, 2021).

A espermatogênese é um processo delicado que ocorre nos testículos e envolve a produção de espermatozoides maduros. É altamente sensível ao estresse oxidativo, que pode danificar o DNA dos espermatozoides, afetar a mobilidade e a morfologia, comprometendo a fertilidade. As células germinativas, que estão envolvidas na espermatogênese, possuem mecanismos de defesa antioxidante (Kretser; Burger 1990; Russel; Griswold, 1993; Aitken, 2014; Jannatifar *et al.*, 2019; Lunetti *et al.*, 2021).

A Hipertensão é uma condição crônica caracterizada por pressão arterial elevada, que aumenta o risco de doenças cardiovasculares, incluindo doença cardíaca coronária, derrame, insuficiência cardíaca e doença renal crônica. Esta HÁ associada ao estresse oxidativo, contribui para o desenvolvimento e a progressão da doença. O estresse oxidativo na hipertensão pode afetar o sistema vascular, levando à disfunção endotelial, ao espessamento da parede dos vasos e à aterosclerose (Oparil; Calhoun, 2019; Yu *et al.*, 2022; Mass; Jansen, 2023).

Tanto a espermatogênese quanto a hipertensão são impactadas negativamente pelo estresse oxidativo. As EROs danificam as células germinativas, os espermatozoides e o endotélio vascular. Este mesmo estresse oxidativo pode danificar o DNA dos espermatozoides, afetando a fertilidade. Da mesma forma, o

estresse oxidativo na hipertensão pode contribuir para a proliferação de células musculares lisas e o desenvolvimento de aterosclerose. Este estresse oxidativo na hipertensão leva à disfunção endotelial, afetando a vasodilatação e aumentando a pressão arterial. Esta disfunção endotelial também pode afetar a microcirculação testicular, impactando a espermatogênese (Touyz; Schiffrin, 2001; Aitken *et al.*, 2010; Williams; Johnston, 2012; Colli *et al.*, 2019; Hosseini *et al.*, 2021; Rudolf *et al.*, 2022).

O estresse oxidativo, um fator comum em ambos os processos (espermatogênese e hipertensão), pode resultar em infertilidade masculina, devido à redução da qualidade do esperma e maior risco de doenças cardiovasculares (Barrows *et al.*, 2019).

O estilo de vida moderno afetou diretamente a saúde individual. Particularmente, a HA desempenha um papel importante porque não só é uma das doenças crônicas mais comuns em todo o mundo, como geralmente é assintomática e o seu diagnóstico é tardio (Colli *et al.*, 2019).

É também digno de nota que o aumento da prevalência de doenças cardiovasculares também resultou numa diminuição da qualidade do sêmen, embora esta diminuição ainda seja objeto de muito debate. No entanto, a diminuição da qualidade do sêmen tornou-se uma preocupação de saúde pública global, porque estes homens apresentam taxas de mortalidade mais elevadas quando comparados com homens com qualidade de sêmen normal. A qualidade do sêmen, portanto, tem sido sugerida como um biomarcador da saúde masculina, e muitos estudos sugerem que existe uma etiologia comum entre a saúde individual geral prejudicada e a saúde reprodutiva (Colli *et al.*, 2019).

A saúde reprodutiva é vital para a sobrevivência da espécie e inclui o bem-estar sexual de homens. A capacidade do macho de produzir espermatozoides nos testículos, é necessária para uma reprodução bem-sucedida. A reprodução humana é afetada pelo estilo de vida, genética e fatores ambientais. Também é afetado por anormalidades fisiológicas como obesidade, dislipidemia, resistência à insulina e hipertensão (Navaneethabalakrishnan *et al.*, 2020).

Em relação às doenças crônicas e à saúde reprodutiva masculina, alguns estudos demonstraram que a hipertensão também afeta a saúde reprodutiva em homens (Navaneethabalakrishnan *et al.*, 2020). Os efeitos prejudiciais da hipertensão incluem disfunção erétil, significativa redução na qualidade e no volume

do sêmen, na motilidade e na quantidade de espermatozoides (Guo *et al.*, 2017). Homens hipertensos apresentam menor qualidade espermática, com morfologia anormal dos espermatozoides e fragmentação de DNA (Muciaccia *et al.*, 2012; Navaneethabalakrishnan *et al.*, 2020), além disso, apresentam redução na testosterona (Fogari *et al.*, 2002; Qu *et al.*, 2021). Os testículos também são alterados, apresentando hialinização, diminuição da proporção lúmen/parede das arteríolas intratesticulares e aumento da densidade volumétrica vascular em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) propensos a acidente vascular cerebral (AVC) (Colli *et al.*, 2019).

Estudo realizado com homens hipertensos apontou associação entre hipertensão e perda de qualidade do sêmen, ocorrendo menor volume de sêmen, motilidade e quantidade de espermatozóides, alterações que também podem estar relacionadas aos medicamentos utilizados para o tratamento da HA (Guo *et al.*, 2017).

As mudanças no fluxo sanguíneo e na microcirculação têm função importante na patofisiologia testicular (Colli *et al.*, 2019). O fluxo sanguíneo da microvasculatura testicular pode ser regulado localmente e demonstram variações rítmicas regulares, que medeiam a transferência de fluídos entre o plasma sanguíneo e o fluido intersticial (Colli *et al.*, 2019; Collin *et al.*, 1993; Collin; Zupp; Setchell, 2000). A testosterona é um dos fatores que controlam essas variações e o fluxo sanguíneo testicular, que por sua vez, afeta a dinâmica dos fluídos e a função testicular (Colli *et al.*, 2019; Qu *et al.*, 2021).

A testosterona confere muitas vantagens fisiológicas aos homens; no entanto, é também associada ao risco de doença cardiovascular em homens com idade avançada. A testosterona é capaz de ativar tanto os mecanismos vasodilatadores quanto vasoconstritores, mas é principalmente pró-hipertensiva e mais propensa a induzir vasoconstrição, retenção de sódio e hipertrofia cardíaca. Por outro lado, a testosterona é um hormônio anabólico que promove massa muscular, perda de gordura e sensibilidade à insulina. Portanto, a deficiência crônica de testosterona também está intimamente associada com a características da síndrome metabólica, como dislipidemia, obesidade abdominal e hipertensão (Qu *et al.*, 2021).

Em testículos de roedores adultos, o hormônio luteinizante (LH) estimula a produção de fator de crescimento endotélio-vascular (VEGF) para exercer sua função de permeabilidade vascular e proliferação celular do endotélio vascular por

meio do seu receptor do domínio de inserção da quinase (KDR ou VEGFR2). As células de Sertoli e Leydig secretam VEGF que se liga aos seus receptores para atuar na vascularização testicular (Ekerbicer *et al.*, 2018). O VEGF tem sido implicado também na homeostase da célula germinativa e tem sido apontado como importante para a fertilidade masculina, tendo um evidente papel na proliferação ou diferenciação das células germinativas (Reddy *et al.*, 2012). O KDR é expresso nas espermatogônias e o outro receptor de VEGF, receptor de tirosina quinase semelhante a Fms (FLT1 ou VEGFR1), nas espermátides (Potter; DeFalco, 2017).

O fator induzível por hipóxia (HIF1) está presente nos testículos de ratos normotensos, pois as gônadas masculinas trabalham em ambiente com baixa tensão de oxigênio (Colli *et al.*, 2019). Porém em ratos com varicocele, a hipóxia testicular promove o aumento do HIF1 que se liga ao elemento responsivo a hipóxia (HRE) no promotor do gene VEGF, aumentando-o para que ocorra angiogênese testicular (Goren *et al.*, 2016). Tanto o HIF1 quanto o VEGF foram observados no citoplasma de células germinativas de ratos com varicocele experimental (Kilinc *et al.*, 2004; Shiraishi; Matsuyama; Takihara, 2012).

Roedores são constantemente utilizados para análises moleculares e histológicas de alterações testiculares como modelos experimentais de humanos, visto que é possível fazer um melhor controle do ambiente experimental e análises mais aprofundadas nos indivíduos (Lerman *et al.*, 2019). Os SHR são os animais de escolha como modelo experimental para o estudo da hipertensão em humanos (Gomes *et al.*, 2019).

### 2.3. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR)

A natureza complexa dos fenótipos hipertensivos em combinação com o modo poligênico de herança da hipertensão requer modelos apropriados passíveis de estudo, como estudos genéticos em humanos hipertensos e modelos experimentais de hipertensão (Lerman *et al.*, 2019). Algumas linhagens de ratos têm sido utilizados em estudos genéticos, patofisiológicos e farmacológicos, como: o SHR, o rato Dahl sensível ao sal (DSS), o rato hipertensivo “Fawn-hooded” (FHH), o rato Milan, o rato Lyon, o rato Sabra e o modelo hereditário de rato com HA induzida por estresse (Rocha, 2022). Destes, o mais estudado é o SHR (Lerman *et al.*, 2019).

O SHR originou-se em Kyoto, Japão, a partir do cruzamento por endogamia seletiva de ratos Wistar-Kyoto, originários de um macho com pressão arterial espontaneamente elevada e uma fêmea com pressão levemente elevada (Lerman *et al.*, 2019; Quiroga *et al.*, 2020). O acasalamento subsequente entre irmão e irmã foi continuado com seleção para animais com pressão sistólica de pressão arterial >150 mmHg (Lerman *et al.*, 2019). Essa linhagem endogâmica foi posteriormente estabelecida nos Estados Unidos no final da década de 1960, após 20 gerações de endogamia nos Institutos Nacionais de Saúde, obtém-se os ratos com hipertensão espontânea quando adultos. O SHR é amplamente utilizado em diversos estudos como modelo de hipertensão primária ou essencial em ratos. Esta linhagem ou outras sub-linhagens, como a SHR propensa a acidente vascular cerebral (AVC), provaram ser úteis em estudos de AVC, função vascular, regulação autonômica, função renal, intervenções terapêuticas e genética da hipertensão primária (Lerman *et al.*, 2019).

O SHR é um dos modelos animais mais amplamente utilizados para estudar hipertensão, que também apresenta muitos fenótipos metabólicos, incluindo resistência à insulina, dislipidemia e obesidade central, conhecidas coletivamente como síndrome metabólica (Dahale *et al.*, 2022). Portanto, fornece o cenário ideal para a compreensão dos efeitos das modificações no estilo de vida, como o exercício, num contexto poligênico, muito semelhante à doença humana (Quiroga *et al.*, 2020).

Os SHR apresentam hipertensão espontânea entre a 7<sup>a</sup> e a 15<sup>a</sup> semanas, atingindo um platô entre a 20<sup>a</sup> e 28<sup>a</sup> semanas (Akagashi *et al.*, 1996). E como consequência da alta pressão arterial e do aumento da resistência vascular periférica, desenvolvem hipertrofia ventricular esquerda (Gomes *et al.*, 2019).

Animais hipertensos apresentam hipertrofia compensatória do ventrículo esquerdo, seguida de remodelamento patológico no qual ocorre fibrose, alterações microvasculares, aumento da massa cardíaca, apoptose, disfunção cardíaca e consequente insuficiência cardíaca (Caniffi *et al.*, 2020; Krzesiak *et al.*, 2019).

Além disso, são observadas alterações no funcionamento fisiológico do miocárdio nesses animais e já foram demonstradas alterações patológicas nas atividades mecânicas e elétricas de cardiomiócitos ventriculares de animais SHR (Krzesiak *et al.*, 2019; Locatelli *et al.*, 2017) o que consequentemente afetará a funcionalidade do miocárdio (Elmarakby; Sullivan, 2021).

Os hormônios sexuais masculinos modulam a pressão arterial nos SHR e a testosterona promove o desenvolvimento de hipertensão nos machos (Elmarakby; Sullivan, 2021). Os estudos com SHR demonstraram alterações testiculares espontâneas por análise histopatológica (Akagashi; Kumamoto; Ito, 1994), são observadas alterações morfológicas nos túbulos testiculares, com maior número de células imaturas no lúmen testicular e necrose tubular (Colli *et al.*, 2019). Os SHR apresentam uma redução no comportamento de cópula e da ejaculação e menor frequência de copulação (Chan *et al.*, 1999).

O exercício pode levar a uma diminuição da pressão arterial nos SHR, denominada hipotensão pós-exercício. Isto pode ocorrer após o treinamento físico, mas também após uma única sessão de exercício leve a moderado (Krzesiak *et al.*, 2019).

#### 2.4. Exercícios físicos e hipertensão

O exercício físico traz benefícios ao sistema cardiovascular, incluindo aumento da sensibilidade ao cálcio, melhora da função cardíaca e da contratilidade dos cardiomiócitos, além de controlar condições inflamatórias e reduzir o estresse oxidativo. Contudo, os mecanismos precisos pelos quais o exercício físico melhora o controle cardiovascular, não são totalmente compreendidos, apesar de serem recomendados em diretrizes para o tratamento e controle da hipertensão (Teles *et al.*, 2023).

A rotina de exercícios físicos é muito efetiva como um tratamento não medicamentoso para a HA, doenças coronárias, obesidade, depressão e diabetes mellitus, sendo importante para a promoção da saúde e longevidade (O'Keefe *et al.*, 2012). Em um estudo observacional de 52 mil adultos por 15 anos, indivíduos que corriam distâncias de 1,6 a 32 km por semana, a uma velocidade de aproximadamente 10 Km/h e frequência de 2 a 5 dias por semana foram associados a menor mortalidade (19%) de diferentes causas em comparação aos que não corriam, enquanto maior quilometragem, frequência e velocidade não levou a essa mesma sobrevida (Lee *et al.*, 2012). Sessões de exercício físico de 30 minutos provocam menor estresse oxidativo e melhoram a elasticidade vascular do indivíduo (Michaelides *et al.*, 2011).

O exercício aumenta a produção sistêmica de óxido nítrico (NO) endotelial por meio do estresse de cisalhamento causado pelo efeito mecânico do aumento do fluxo sanguíneo. O exercício aeróbico tem efeitos positivos sobre os fatores de risco cardiovascular, e melhora o débito cardíaco e a tolerância ao exercício (Duca *et al.*, 2019).

Além de atuar sobre os fatores de risco clássicos (peso e níveis de colesterol), o exercício físico aeróbico regular demonstrou aumentar o número de células progenitoras endoteliais circulantes em pacientes com fatores de risco cardiovasculares e doença coronariana, melhorando a biodisponibilidade do NO, diminuindo resistência à insulina, citocinas pró-inflamatórias séricas e níveis de proteína C reativa (Duca *et al.*, 2019).

O exercício de resistência também pode ser benéfico, pois uma maior força muscular está associada a um melhor perfil de fatores de risco cardiometabólicos, menor risco de mortalidade por todas as causas e menos eventos cardiovasculares (Duca *et al.*, 2019).

Os exercícios físicos aeróbicos previnem a progressão de doenças cardiovasculares (Lee *et al.*, 2012; Roque *et al.*, 2013). Entretanto, como todo tratamento, deve ser feito moderadamente, pois altas doses podem causar malefícios à saúde, como traumas musculoesqueléticos, desarranjos metabólicos, estresse cardiovascular e outros (O'Keefe *et al.*, 2012). O treinamento físico aeróbico pode melhorar a função miocárdica, causando alterações na atividade e morfologia dos cardiomiócitos em indivíduos saudáveis, e pode potencialmente reverter a hipertrofia cardíaca patológica (Krzysiak *et al.*, 2019).

O treinamento físico intermitente de alta intensidade induz remodelação benéfica dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de SHR nos níveis morfológico, mecânico e molecular (Krzysiak *et al.*, 2019). Esse tipo de treinamento físico também aumenta a hipertrofia cardíaca, atenuando a disfunção diastólica miocárdica, diminui a pressão arterial e melhora a capacidade funcional do miocárdio (Engel *et al.*, 2022). Os resultados também confirmam, a nível celular, que este tipo de treino, por não parecer deletério, poderia ser aplicado na reabilitação de pacientes hipertensos (Engel *et al.*, 2022; Krzysiak *et al.*, 2019).

Os exercícios físicos produzem um poderoso estímulo angiogênico no músculo ativo que leva a um aumento da capilaridade com o treinamento (Prior *et al.*, 2003). Esse mecanismo é ativado pela hipóxia muscular e aumento do NO que

estimulam a produção de HIF1 e que, por sua vez, induz a expressão do VEGF, que é um potente estimulador de mitose para as células endoteliais (Prior *et al.*, 2003). A queda da concentração de oxigênio no plasma é uma influência importante para estimular as células endoteliais a liberarem HIF1 (Rey; Semenza, 2010),

Há também aumento na expressão de enzimas antioxidantes em vários tecidos e também redução na expressão de enzimas pró-oxidantes após treinamento aeróbio ou anaeróbio (Aurino De Pinho *et al.*, 2010; Koike *et al.*, 1992). Reforçando-se assim, a indicação de exercício físico para o tratamento não medicamentoso da HA (Malachias *et al.*, 2016).

## 2.5 Exercícios físicos e reprodução masculina

A infertilidade masculina tem sido associada a certos fatores de risco modificáveis, incluindo nutrição, obesidade, tabagismo, alcoolismo e falta de atividade física. O exercício físico tem uma variedade de vantagens documentadas para a saúde. Os riscos de doenças cardiovasculares são reduzidos pelo exercício moderado, o que também ajuda a prevenir doenças crônicas não transmissíveis. O comportamento sedentário pode contribuir para o aumento da incidência de infertilidade (Belladelli; Basran; Eisenberg, 2023).

Um conjunto crescente de pesquisas indica que homens que levam estilos de vida sedentários são mais propensos a sofrer de hipogonadismo masculino de início tardio, que é causado por baixos níveis de testosterona, diminuição da libido, disfunção erétil e redução da viabilidade do espermatozoide. Além disso, foi demonstrado que homens fisicamente ativos têm uma proporção maior de espermatozoides móveis em comparação com homens sedentários (Belladelli; Basran; Eisenberg, 2023).

Além disso, foi demonstrado que exercício físico moderado pode retardar processos inflamatórios relacionados à idade e danos ao DNA no espermatozoide. No entanto, níveis mais extremos de atividade física têm sido associados à qualidade prejudicada do sêmen (Belladelli; Basran; Eisenberg, 2023).

Os homens que praticam regularmente treinamento físico têm melhores parâmetros de fertilidade (Sharma *et al.*, 2013). Foi observado que homens que praticam atividade física moderada têm maiores níveis de hormônio folículo estimulante (FSH), de LH e de testosterona do que os indivíduos sedentários

(Vaamonde *et al.*, 2012). O exercício moderado também regula os níveis hormonais (Barazani *et al.*, 2014), e os parâmetros espermáticos (Rosety *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2013).

Os protocolos esportivos, dependendo do método de exercício ou da intensidade da atividade física, podem ter efeito positivo ou negativo na qualidade do sêmen. Os dados mostram que a atividade física regular melhora os parâmetros de qualidade do sêmen e a qualidade do DNA do esperma em populações férteis e inférteis. Este efeito pode ser devido aos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do exercício (Hosseini *et al.*, 2021).

As evidências sugerem que o exercício resistido está associado ao estresse oxidativo. Durante o repouso, o corpo humano produz continuamente EROs; entretanto, em pessoas saudáveis, as EROs são produzidas em níveis que estão dentro da capacidade do sistema antioxidante do corpo. Durante o exercício de resistência, há um aumento no consumo de oxigênio corporal de 10 a 20 vezes, e a ingestão de oxigênio no músculo esquelético ativo aumenta de 200 a 1000 vezes. Este aumento no consumo de oxigênio pode levar à superprodução de EROs, que excede a capacidade de desintoxicação do corpo (Hosseini *et al.*, 2021).

O mecanismo pelo qual as EROs influenciam a fertilidade masculina é pelo aumento no estresse oxidativo testicular, embora o testículo possua diversas enzimas antioxidantes. O estresse oxidativo pode provocar varicocele, criptorquidia, torção testicular ou endocrinopatia, condições que prejudicam a função testicular e, portanto, a fertilidade masculina. Além disso, foi sugerido que o dano ao DNA induzido por EROs, é responsável pela aceleração da apoptose das células germinativas, levando a uma diminuição na contagem de espermatozoides e, portanto, há um declínio na qualidade do sêmen (Lunetti *et al.*, 2021).

Um nível considerável de dano ao DNA em células espermatogênicas testiculares também foi observado após a natação forçada extensa (Jana *et al.*, 2014). Altos níveis de EROs são capazes de romper as membranas mitocondriais, levando assim à liberação das mitocôndrias do citocromo c, que ativa as caspases e induz a apoptose. Nas células germinativas, a apoptose parece ser estritamente regulada por fatores extrínsecos e intrínsecos durante a espermatogênese. Além disso, quando grandes quantidades de DNA mitocondrial mutante patogênico se acumulam nos testículos, a disfunção respiratória mitocondrial é induzida nas células espermatogênicas, causando uma diminuição na produção de energia e, portanto,

parada meiótica e presença de anormalidades na morfologia espermática (Lunetti *et al.*, 2021).

Os EROs podem ter origem endógena ou exógena e podem causar defeitos na espermatogênese e infertilidade masculina (Aitken *et al.*, 2010). Em condições fisiológicas, os espermatozoides produzem pouco EROs, que são requeridos para a fisiologia espermática (hiperativação espermática, capacitação e reação de acrossoma) e para a fecundação. Porém o aumento patológico de EROs leva a disfunção espermatogênica (peroxidação lipídica), diminuição da qualidade espermática e dano de DNA espermático (Jannatifar *et al.*, 2019).

Os espermatozoides têm baixos níveis de antioxidantes e enzimas de reparo do DNA e suas membranas, embora ricas em ácidos graxos polinsaturados, são suscetíveis ao dano de oxigênio pela peroxidação lipídica. Os antioxidantes que são encontrados naturalmente no sêmen incluem vitaminas E e C, folato, zinco, selênio, carnitina e carotenoides (Alahmar, 2019; Showell *et al.*, 2011).

O exercício físico pode aumentar a fertilidade masculina, melhorando os parâmetros espermáticos necessários para a concepção espontânea, incluindo concentração e motilidade espermática (Brinson *et al.*, 2023). O exercício induz aumento agudo da testosterona, um importante modulador do desempenho físico (Duca *et al.*, 2019). A produção de testosterona mediada pelo exercício visa regular a resposta do sistema nervoso central, o metabolismo, a atividade neuromuscular e o crescimento muscular (Duca *et al.*, 2019; Sgrò, 2019).

Os efeitos antioxidantes e antiapoptóticos da atividade física regular em doenças crônicas foram amplamente confirmados. Estudos acumulados demonstraram que o exercício moderado pode inibir o estresse oxidativo testicular e a apoptose, e melhorar a qualidade do esperma e a função reprodutiva (Xu *et al.*, 2022).

As diferentes respostas dos hormônios sexuais masculinos ao treinamento físico influenciam as funções sexuais e a espermatogênese, que podem ser melhoradas, mantidas ou prejudicadas (Sgrò, 2019). Em ensaios clínicos randomizados, ao se comparar os efeitos do treinamento contínuo de intensidade moderada e alta, bem como do treinamento intervalado de alta intensidade, foi verificado que o treinamento contínuo de intensidade moderada foi mais benéfico na melhoria dos marcadores da função reprodutiva masculina (Lunetti *et al.*, 2021).

Os efeitos benéficos dos exercícios na reprodução dependem da intensidade e da frequência dos exercícios (O'Keefe *et al.*, 2012). Exercício de resistência frequentemente diminui os níveis de testosterona séricos (Hackney, 2008) e reduz a qualidade espermática, com diminuição da concentração e da motilidade dos espermatozoides e aumento nos defeitos morfológicos (Gomes; Freitas; Fardilha, 2015; Safarinejad; Azma; Kolahi, 2008; Wise *et al.*, 2011). Vale lembrar que os exercícios físicos aumentam as EROs e com isso há o aumento do estresse oxidativo no sistema reprodutivo masculino que é deletério para este sistema (Lunetti *et al.*, 2021).

## 2.6 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade do organismo de neutralizar ou reparar seus efeitos prejudiciais. Embora as EROs sejam essenciais para vários processos fisiológicos, níveis excessivos podem levar a danos oxidativos e perturbar a homeostase celular. O estresse oxidativo tem sido implicado em inúmeras condições de saúde, incluindo disfunção reprodutiva masculina (Liguori *et al.*, 2018; Walke *et al.*, 2023).

O estresse oxidativo está associado a várias doenças crônicas (Raghu *et al.*, 2021). É sabido que moléculas danificadas por EROs ativam o processo inflamatório e que essa resposta aumenta a produção de radicais livres (Ávila-Escalante *et al.*, 2020). As EROs são produzidas durante o metabolismo aeróbico celular e incluem: superóxido ( $O_2^-$ ); radical hidroxila ( $HO\bullet$ ); peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); peroxinitrito ( $ONOO^-$ ); óxido nítrico ( $NO\bullet$ ); e ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) (Barrows; Ramezani; Raj, 2019).

As EROs contribuem significativamente para a homeostase celular no coração, regulando a proliferação, diferenciação e alternância excitação-contração (Valaei *et al.*, 2021). Pequenas flutuações na concentração das mesmas consistem em sinalizadores intracelulares (Ávila-Escalante *et al.*, 2020), que medeiam a ativação de fatores de transcrição, a indução de genes de resposta imune e a fosforilação de quinases (Barrows; Ramezani; Raj, 2019). Porém, aumentos descontrolados podem provocar danos a macromoléculas como DNA, proteínas e lipídios (Dröge, 2002).

Quando a capacidade de eliminação pelo corpo das EROs é excedida ou quando há a diminuição das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, como a superóxido desmutase (SOD), a catalase (CAT), a glutaciona sintetase (GSS) ou a glutaciona S-transferase (GST), as EROs induzem o estresse oxidativo (Ayad *et al.*, 2022; Moore, 2008). Observou-se em indivíduos hipertensos um aumento na produção de ânions superóxido e peróxido de hidrogênio, diminuição da síntese de óxido nítrico e redução da biodisponibilidade antioxidante (Ayad *et al.*, 2022; Baradaran; Nasri; Rafieian-Kopaei, 2014)

Indivíduos hipertensos têm um aumento na produção de ânions superóxido e peróxido de hidrogênio, diminuição da síntese de óxido nítrico e redução da biodisponibilidade antioxidante (Baradaran; Nasri; Rafieian-Kopaei, 2014; Barrows; Ramezani; Raj, 2019).

O sistema reprodutor masculino é altamente suscetível ao estresse oxidativo devido à sua composição e processos fisiológicos únicos. Os espermatozoides são particularmente vulneráveis ao dano oxidativo, pois possuem mecanismos de defesa antioxidante limitados. O delicado equilíbrio entre a produção de EROs e a proteção antioxidante é crucial para manter a função espermática ideal e a fertilidade (Alahmar, 2019; Mannucci *et al.*, 2022; Walke *et al.*, 2023). A capacidade antioxidante na população masculina infértil idiopática é menor do que a dos homens férteis, com isso, apresentam produção seminal significativamente maior de EROs (Jannatifar *et al.*, 2019).

As células de Sertoli são um dos principais alvos de tóxicos ambientais nas disfunções reprodutivas masculinas. Elas desempenham um papel essencial na espermatogênese, fornecendo suporte e nutrição às células germinativas dos testículos. Eles também são cruciais na função testicular para expressar a proteína de ligação ao andrógeno (ABP) e o receptor do hormônio folículo-estimulante (FSHR), bem como na formação da barreira hemato-testicular. Ao realizar esta tarefa, as células de Sertoli também regulam e mantêm o status das reações de óxido-redução (redox) celular apropriado dos espermatozoides (Petricca *et al.*, 2023).

Durante a espermatogênese, o metabolismo celular é altamente ativado por hormônios esteroides sexuais, indicando que as próprias células germinativas geram altos níveis de EROs. Além disso, as células germinativas têm mecanismos de defesa antioxidante limitados e uma capacidade restrita de detectar e reparar danos

no DNA. Portanto, os espermatozoides são fortemente suscetíveis ao estresse oxidativo e aos danos oxidativos ao DNA. As células de Sertoli desenvolveram muitos mecanismos para suprimir o sistema operacional e minimizar os danos causados pelas EROs. Neste sentido, os seus sistemas antioxidante e redox apoiam e cooperam (função auxiliar) com as células espermatogênicas, fornecendo-lhes GSH e SOD, cooperando assim para compensar o declínio da sua potência (Petricca *et al.*, 2023).

As EROs têm papéis fisiologicamente relevantes na melhoria dos níveis intracelulares de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC<sub>c</sub>) reações acrossômicas, hiperativação, (Zhang *et al.*, 2021) e também capacitação para a fecundação (Jannatifar *et al.*, 2019). A geração descontrolada (ou seja, excessiva) de EROs pode atacar ácidos graxos insaturados (UFAs) na membrana plasmática, alterar o potencial da membrana mitocondrial e induzir a peroxidação de proteínas sulfidrilas, alterando assim a função e estrutura do esperma (Zhang *et al.*, 2021). Além disso, as EROs podem fazer com que o espermatozoide seja incapaz de fertilizar o ovócito (Zhang *et al.*, 2021).

A peroxidação lipídica é um dos principais mecanismos através dos quais o estresse oxidativo afeta a função reprodutiva masculina (Aitken, 2020; Walke *et al.*, 2023). As membranas das células espermáticas contêm ácidos graxos altamente insaturados, tornando-as altamente vulneráveis ao ataque de EROs (Walke *et al.*, 2023). As EROs atacam os ácidos graxos poli-insaturados nas membranas dos espermatozoides, iniciando uma reação em cadeia conhecida como peroxidação lipídica. Este processo leva à produção de peróxidos lipídicos e à ruptura da integridade da membrana. Como resultado, a funcionalidade e a viabilidade dos espermatozoides ficam comprometidas, levando à motilidade prejudicada e à redução da capacidade de fertilização (Aitken, 2020; Walke *et al.*, 2023).

Outro mecanismo pelo qual o estresse oxidativo afeta a função reprodutiva masculina é através da oxidação de proteínas. As EROs podem modificar as proteínas do esperma, levando a alterações estruturais e deficiências funcionais. Este dano oxidativo às proteínas pode afetar vários aspectos da fisiologia do esperma, incluindo motilidade, empacotamento do DNA e capacidade de fertilização (Nowicka-Bauer; Nixon, 2020; Walke *et al.*, 2023).

O estresse oxidativo também pode induzir danos ao DNA nos espermatozoides. O DNA do esperma é altamente compactado e firmemente

embalado dentro do núcleo, tornando-o mais suscetível ao dano oxidativo. As EROs podem atacar diretamente e causar lesões oxidativas na cadeia de DNA, levando à fragmentação do DNA e à integridade genética prejudicada. Esses danos ao DNA nos espermatozoides têm sido associados à redução das taxas de fertilização, diminuição da qualidade do embrião e aumento do risco de anormalidades no desenvolvimento da prole (Walke *et al.*, 2023).

A peroxidação lipídica das membranas das células espermáticas, a oxidação de proteínas e os danos ao DNA contribuem para a motilidade espermática prejudicada, o potencial de fertilidade reduzido e um risco aumentado de infertilidade. Esses mecanismos destacam coletivamente o impacto significativo do estresse oxidativo na função reprodutiva masculina (Walke *et al.*, 2023).

Os antioxidantes são agentes redutores que podem neutralizar as biomoléculas oxidativas (Cepaityte *et al.*, 2023). Nesse sentido, a N-acetilcisteína (NAC) é um antioxidante que desempenha um papel importante na proteção dos constituintes celulares contra o dano oxidativo. A ação do NAC tem origem na sua capacidade de estimular e sustentar os níveis intracelulares de glutathiona reduzida (GSH) e também para desintoxicar as EROs (Jannatifar *et al.*, 2019).

## 2.7 Antioxidante N-acetilcisteína (NAC)

A N-acetilcisteína (NAC) é um derivado sintético do aminoácido endógeno L-cisteína e precursor do tripeptídeo GSH. O NAC não apenas modula o estresse oxidativo, mas também outros processos fisiopatológicos implicados na doença. Estes incluem disfunção mitocondrial, apoptose e inflamação, bem como efeitos indiretos sobre neurotransmissores como glutamato e dopamina (Raghu *et al.*, 2021). Sendo um potente antioxidante, pode diminuir o excesso de EROs e prevenir a apoptose nas células somáticas e germinativas (Chen *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2018).

A NAC é permeável nas células é uma fonte alternativa para aumentar os níveis de GSH e aumentar a defesa contra o estresse oxidativo (Kelly, 1998). A NAC desempenha um papel essencial na regulação do ambiente redox das células (Hsu; Tain, 2020; Ma *et al.*, 2021). O NAC tem efeitos anti-hipóxia, antifibrose e antioxidante, o que foi confirmado em células e órgãos (Ma *et al.*, 2021). O NAC pode ser útil no tratamento de toxinas, pois pode aumentar os níveis de GSH e

prevenir novas lesões causadas pela peroxidação lipídica (Kheradmandi *et al.*, 2019).

Os efeitos protetores do NAC contra a hipertensão induzida pela suramina foi associado ao aumento do nível plasmático de glutatona e restauração na síntese da porção sulfidrilada reduzida nos rins, o que melhora a função renal por reduzir o estresse oxidativo (Cepaityte *et al.*, 2023). A administração de NAC em ratos prenhes com hipertensão preveniu a hipertensão da prole (Tain *et al.*, 2016).

A fisiopatologia das disfunções reprodutivas é difícil de elucidar devido a uma infinidade de vias endógenas interligadas. O estresse oxidativo é atualmente considerado um dos principais eventos subjacentes que contribuem para a etiopatologia de uma ampla variedade de problemas de saúde, incluindo distúrbios reprodutivos, conforme relatado em modelos animais e humanos. O padrão antioxidante endógeno (enzimático e não enzimático) é responsável por garantir o equilíbrio redox adequado em todos os sistemas biológicos. Quando um acúmulo excessivo de EROs não é eliminado porque falta a defesa antioxidante, ocorre o estresse oxidativo (Petricca *et al.*, 2023).

Foi relatado que a NAC protege contra danos e disfunções testiculares pela atenuação do aumento dos níveis de malondialdeído (MDA) testicular e diminuição dos níveis de SOD, CAT, GSH e GST (Hsu; Tain, 2020) resultantes da toxicidade induzida por tetraciclina em ratos (Shittu *et al.*, 2019). Além disso, uma melhora significativa na motilidade e morfologia dos espermatozoides foi observada pelo tratamento com NAC na varicocele e em outros modelos induzidos por drogas sintéticas, como o paracetamol (Kheradmandi *et al.*, 2019). Além disso, o NAC pode proteger o sistema genital masculino contra toxinas fortes, como o trióxido de arsênico (Kheradmandi *et al.*, 2019). A suplementação de ácido alfa-lipóico e NAC também preveniu os distúrbios espermatogênicos e esteroidogênicos induzidos pela natação, diminuindo a geração de EROs (Jana *et al.*, 2014).

A NAC melhorou a qualidade do embrião de camundongos produzidos *in vitro* com redução significativa das EROs, acelerando o desenvolvimento embrionário e aumentando o número de células da massa celular interna e do trofotoderma do embrião (Jannatifar *et al.*, 2019; Truong; Gardner, 2017). Em um estudo recente, a suplementação com NAC por três meses levou a uma melhora significativa nos parâmetros espermáticos como concentração, motilidade e morfologia normal. Além disso, a suplementação com 600 mg/dia de NAC reduziu a fragmentação do DNA e

também melhorou o conteúdo de protamina, que é a nucleoproteína espermática, frequentemente seus baixos níveis são associados com infertilidade masculina (Jannatifar *et al.*, 2019). Provavelmente a ação do NAC nos espermatozoides vem de sua habilidade de aumentar os níveis de GSH e também de diminuir as EROs (Zafarullah *et al.*, 2003).

A NAC tem atividade eliminadora de radicais livres tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Zhang *et al.*, 2021). O tratamento diário com NAC resulta em uma melhora significativa na motilidade espermática em comparação ao placebo e melhora a concentração espermática e a reação acrossômica, ao mesmo tempo que reduz as EROs e a oxidação do DNA do esperma (Jannatifar *et al.*, 2019). Além disso, a suplementação oral pode melhorar os parâmetros espermáticos e o status oxidativo/antioxidante em homens inférteis (Zhang *et al.*, 2021).

Como os indivíduos com hipertensão têm maior produção de EROs e menor quantidade de antioxidantes corporais (Baradaran; Nasri; Rafieian-Kopaei, 2014), a NAC apresenta eficácia no tratamento de hipertensão gestacional em ratas com pré-eclâmpsia (Chang *et al.*, 2005). Quando utilizada durante a gestação de ratas hipertensas preveniu a hipertensão adulta programada nos ratos e aumentou a síntese de GSH nesses animais (Tain *et al.*, 2016).

O tratamento com NAC em ratos com toxicidade testicular provocada foi capaz de restabelecer o peso do testículo, a contagem e motilidade dos espermatozoides e o número de células germinativas. Além disso, a NAC tem também sido efetiva em reduzir a injúria oxidativa testicular em ratos (Kheradmandi *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2023).

### **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A HA provoca estresse oxidativo e dano tecidual em vários órgãos, incluindo os testículos. Como o treinamento físico é recomendado para prevenir e controlar a HA, talvez possa melhorar o prejuízo testicular causado pela hipertensão, mas o quanto o treinamento é benéfico para os órgãos reprodutivos masculinos é bem controverso, dependendo da modalidade e da intensidade do treinamento. O uso de antioxidantes no tratamento da hipertensão é uma possibilidade, por reduzir o estresse oxidativo causado pela HA, nesse sentido a NAC mostra-se promissora como tratamento alternativo ou coadjuvante. A NAC tem se mostrado benéfica para a fertilidade masculina em vários estudos com diferentes agentes indutores de estresse oxidativo tecidual. Verifica-se que o efeito da combinação entre o treinamento físico e a utilização de NAC em indivíduos hipertensos deve ser testado para minimizar os efeitos deletérios da hipertensão nos testículos e na espermatogênese.

## REFERÊNCIAS

- ABE, H.; SEMBA, H.; TAKEDA, N. The Roles of Hypoxia Signaling in the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. **J Atheroscler Thromb.**, v. 24, n. 9, p. 884-894, 2017. doi: 10.5551/jat.RV17009. Epub 28 Jul 2017.
- AITKEN, R. J. *et al.* Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. **Human Reproduction**, v. 25, n. 10, p. 2415–2426, 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/deq214>.
- AITKEN, R. J. The human spermatozoon: a versatile cell but a vulnerable target. **International Journal of Andrology**, v. 37, n.1, p. 1-12, 2014. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2013.01347.x.
- AITKEN, R. J. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. **Reproduction**, v. 159, n. 4, p. R189–R201, 2020. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/159/4/REP-19-0452.xml>.
- AKAGASHI, K. *et al.* Hypertensive changes in intratesticular arteries impair spermatogenesis of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Journal of Andrology**, v. 17, n. 4, p. 367–374, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8889699>.
- AKAGASHI, K.; KUMAMOTO, Y.; ITO, N. Effects of Intratesticular Hypertensive Vascular Changes on Spermatogenesis in Spontaneously Hypertensive Rat (SHR). **Sapporo Med J**, v. 63, n. 5/6, p. 209–219, 1994.
- ALAHMAR, A. Role of oxidative stress in male infertility: An updated review. **Journal of Human Reproductive Sciences**, v. 12, n. 1, p. 4, 2019. Disponível em: [https://journals.lww.com/10.4103/jhrs.JHRS\\_150\\_18](https://journals.lww.com/10.4103/jhrs.JHRS_150_18).
- ASADI, N. *et al.* The Impact of Oxidative Stress on Testicular Function and the Role of Antioxidants in Improving it: a review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 11, n. 5, p. IE01–IE05, 2017.
- AURINO DE PINHO, R. *et al.* **Coronary heart disease, physical exercise and oxidative stress.** [s. l.], 2010.

ÁVILA-ESCALANTE, M. L. *et al.* The effect of diet on oxidative stress and metabolic diseases—Clinically controlled trials. **Journal of Food Biochemistry**, [s. l.], v. 44, n. 5, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfbc.13191>.

AZU, O. O. Testicular morphology in spontaneously hypertensive rat model: oxidant status and stereological implications. **Andrologia**, v. 47, n. 2, p. 123-37, 2015. doi: 10.1111/and.12233. Epub 28 Jan 2014.

BAOQI, Y. U. *et al.* The role of hypoxia-inducible factors in cardiovascular diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 238, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108186>.

AYAD, B. *et al.* Oxidative stress and male infertility: evidence from a research perspective. **Frontiers in Reproductive Health**, [s. l.], v. 4, p. 822257, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/frph.2022.822257/full>.

BARADARAN, A.; NASRI, H.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. **Journal of Research in Medical Sciences: the Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 358–367, 2014.

BARAZANI, Y. *et al.* Lifestyle, environment, and male reproductive health. **Urologic Clinics of North America**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 55–66, 2014. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0094014313000943>.

BARROSO, W. K. S. *et al.* Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s. l.], v. 116, n. 3, p. 516–658, 2021. Disponível em: <https://abccardiol.org/article/diretrizes-brasileiras-de-hipertensao-arterial-2020/>.

BARROWS, I. R.; RAMEZANI, A.; RAJ, D. S. Inflammation, immunity, and oxidative stress in hypertension—partners in crime?. **Advances in Chronic Kidney Disease**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 122–130, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1548559519300321>.

BEAUDIN AE, W. X.; Hanly, P. J.; Poulin, M. J. Impact of obstructive sleep apnoea and intermittent hypoxia on cardiovascular and cerebrovascular regulation. **Exp Physiol**. 2017 Jul 1;102(7):743-763. doi: 10.1113/EP086051. Epub 27 Jun 2017.

PMID: 28439921.

BELLADELLI, F.; BASRAN, S.; EISENBERG, M. L. Male fertility and physical exercise. **The World Journal of Men's Health**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 482, 2023. Disponível em: <https://wjmh.org/DOIx.php?id=10.5534/wjmh.220199>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico**. Brasília: Vigitel Brasil, 2020.

BRINSON, A. K. *et al.* Impact of physical activity and sedentary behavior on spontaneous female and male fertility: a systematic review. **Journal of Physical Activity and Health**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 600–615, 2023. Disponível em: <https://journals.humankinetics.com/view/journals/jpah/20/7/article-p600.xml>.

CANIFFI, C. *et al.* Cardiac morphological and functional changes induced by C-type natriuretic peptide are different in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, [s. l.], v. 38, n. 11, p. 2305–2317, 2020. Disponível em: <https://journals.lww.com/10.1097/HJH.0000000000002570>.

CEPAITYTE, D. *et al.* N-Acetylcysteine: more than preventing contrast-induced nephropathy in uremic patients—focus on the antioxidant and anti-inflammatory properties. **International Urology and Nephrology**, [s. l.], v. 55, n. 6, p. 1481–1492, 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s11255-022-03455-3>.

CHAN, P. *et al.* Effects of losartan on the sexual behavior of male rats. **Pharmacology**, [s. l.], v. 58, n. 3, 1999.

CHANG, E. Y. *et al.* The use of N-acetylcysteine for the prevention of hypertension in the reduced uterine perfusion pressure model for preeclampsia in Sprague-Dawley rats. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [s. l.], v. 193, n. 3, p. 952–956, 2005. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937805007805>.

CHEN, L. *et al.* Cadmium induction of reactive oxygen species activates the mTOR pathway, leading to neuronal cell death. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 624–632, 2011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584910014644>.

CIFTCI, H. *et al.* Effects of N-acetylcysteine on Semen Parameters and Oxidative/Antioxidant Status. *Urology*, v. 74, p. 73385–76, 2009.

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in man: a review. **International Journal of Andrology**, v. 5, n. 5, p. 520-530, 1972. DOI: 10.1111/j.1365-2605.1972.tb00311.x.

COHEN, J. B.; FUCHS, S. Oxidative stress in hypertension: role and therapeutic implications. **Current Hypertension Reports**, v. 23, n. 5, p. 1-12, 2021. DOI: 10.1007/s11906-021-01155-y.

COLLI, L. G. *et al.* Systemic arterial hypertension leads to decreased semen quality and alterations in the testicular microcirculation in rats. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 11047, 2019. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-47157-w>.

COLLI, M. A. B. *et al.* The impact of hypertension on male fertility. **International Journal of Hyperthermia**, v. 35, n. 2, p. 167-184, p. 2019. DOI: 10.1080/02656736.2018.1522531.

COLLIN, O. *et al.* Control of testicular vasomotion by testosterone and tubular factors in rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, [s. l.], v. 97, n. 1, p. 115–121, 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8464001>.

COLLIN, O.; ZUPP, J. L.; SETCHELL, B. P. Testicular vasomotion in different mammals. **Asian Journal of Andrology**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 297–300, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11202420>.

COMHAIRE, F. H. *et al.* The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 63, n. 3, p. 159-65, 2000. doi: 10.1054/plf.2000.0174. PMID: 10991774.

CUNHA, R. M. C.; CARVALHO, C. A. B. Angiotensin II and the Cardiovascular System. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 54, n. 9, p. e10548, 2021. DOI: 10.1590/1414-431x20214630.

DAHALE, S. *et al.* Cap analysis of gene expression reveals alternative promoter

usage in a rat model of hypertension. **Life Science Alliance**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. e202101234, 2022. Disponível em: <https://www.life-science-alliance.org/lookup/doi/10.26508/lsa.202101234>.

DANIELEWICZ, A. *et al.* Association of the dietary approaches to stop hypertension, physical activity, and their combination with semen quality: a cross-sectional study. **Nutrients**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 39, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/1/39>.

DE KRETZER, D. M.; BURGER, H. G. The endocrine control of male reproduction. *In: The physiology of reproduction*. New York, NY: Raven Press, 1990. p. 1471-1538

DI PALO, K. E.; BARONE, N. J. Hypertension and Heart Failure. **Heart Failure Clinics**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 99–106, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1551713619300996>.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.

DUBOIS-DERUY, E. *et al.* Oxidative stress in cardiovascular diseases. **Antioxidants**, v. 14, n. 9, p. 864, 2020. doi: 10.3390/antiox9090864. PMID: 32937950; PMCID: PMC7554855.

DUCA, Y. *et al.* Erectile dysfunction, physical activity and physical exercise: Recommendations for clinical practice. **Andrologia**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. e13264, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/and.13264>.

DYBIEC, J. *et al.* Advances in the pathogenesis and treatment of resistant hypertension. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 16, p. 12911, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/16/12911>.

EKERBICER, N. *et al.* Statins reduce testicular and ocular VEGF: a potential compromise to microcirculation. **Microvascular Research**, [s. l.], v. 119, p. 60–63, 2018.

ELMARAQBY, A. A.; SULLIVAN, J. C. Sex differences in hypertension: lessons from spontaneously hypertensive rats (SHR). **Clinical Science**, [s. l.], v. 135, n. 15, p.

1791–1804, 2021. Disponível em:  
<https://portlandpress.com/clinsci/article/135/15/1791/229431/Sex-differences-in-hypertension-lessons-from>.

ENGEL, L. E. *et al.* The high-intensity interval training mitigates the cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats. **Life Sciences**, [s. l.], v. 308, p. 120959, 2022. Disponível em:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320522006592>.

FINKEL T, HOLBROOK NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 9, n. 408, p. 239-47, 2000. doi: 10.1038/35041687. PMID: 11089981.

FOGARI, R. *et al.* Effect of antihypertensive treatment with valsartan or atenolol on sexual activity and plasma testosterone in hypertensive men. **European Journal of Clinical Pharmacology**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 177–180, 2002. Disponível em:  
<http://link.springer.com/10.1007/s00228-002-0456-3>.

GOMES, L. H. L. S. *et al.* Thermoregulation in hypertensive rats during exercise: effects of physical training. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s. l.], 2019.

GOMES, M.; FREITAS, M. J.; FARDILHA, M. Physical activity, exercise, and mammalian testis function: emerging preclinical protein biomarker and integrative biology insights. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, [s. l.], v. 19, n. 9, p. 499–511, 2015. Disponível em:  
<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/omi.2015.0065>.

GOREN, M. R. *et al.* Effects of experimental left varicocele repair on hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor expressions and angiogenesis in rat testis. **Andrologia**, [s. l.], 2016. Disponível em:  
<http://doi.wiley.com/10.1111/and.12614>.

GUO, D. *et al.* Hypertension and male fertility. **The world journal of men's health**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 59–64, 2017.

GUZIK, T. J.; TOUYZ, R. M. Oxidative stress, inflammation, and vascular aging in hypertension. **Hypertension**, [s. l.], v. 70, n. 4, p. 660–667, 2017. Disponível em:  
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.07802>.

HACKNEY, A. C. Effects of endurance exercise on the reproductive system of men: The “exercise-hypogonadal male condition”. **Journal of Endocrinological Investigation**, [s. l.], v. 31, n. 10, p. 932–938, 2008. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF03346444>.

HOSSEINI, M. *et al.* Effect of low-intensity endurance training and high-intensity interval training on sperm quality in male rats with fatty liver. **International Journal of Fertility & Sterility**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 141–147, 2021. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33687168>.

HSU, C.-N.; TAIN, Y.-L. Early origins of hypertension: should prevention start before birth using natural antioxidants?. **Antioxidants**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 1034, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/11/1034>.

JANA, K. *et al.* Alpha-lipoic acid and N-acetylcysteine protects intensive swimming exercise-mediated germ-cell depletion, pro-oxidant generation, and alteration of steroidogenesis in rat testis. **Molecular Reproduction and development**, [s. l.], v. 81, n. 9, p. 833–850, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25104294>.

JANNATIFAR, R. *et al.* Effects of N-acetyl-cysteine supplementation on sperm quality, chromatin integrity and level of oxidative stress in infertile men. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 24, 2019. Disponível em: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-019-0468-9>.

Jl, Y. L. *et al.* N-acetylcysteine protects against cadmium-induced germ cell apoptosis by inhibiting endoplasmic reticulum stress in testes. **Asian Journal of Andrology**, [s. l.], 2013.

KEASLEY, J. *et al.* A systematic review of the burden of hypertension, access to services and patient views of hypertension in humanitarian crisis settings. **BMJ Global Health**, [s. l.], v. 5, n. 11, p. e002440, 2020. Disponível em: <https://gh.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjgh-2020-002440>.

KELLY, G. S. Clinical applications of N-acetylcysteine. **Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 114–127, 1998.

KHERADMANDI, R. *et al.* Protective effect of N-Acetyl cysteine on chlorpyrifos-

induced testicular toxicity in mice. **International journal of fertility & sterility**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 51–56, 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30644245>.

KILINC, F. *et al.* p53 Expression and apoptosis in varicocele in the rat testis. **The Journal of Urology**, [s. l.], v. 172, n. 6, p. 2475–2478, 2004. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022534705614401>.

KIM, K. H. *et al.* Effect of N-acetyl-L-cysteine on testicular tissue in busulfan-induced dysfunction in the male reproductive system. **The World Journal of Men's Health**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 882, 2023. Disponível em: <https://wjmh.org/DOIx.php?id=10.5534/wjmh.220100>.

KITT, J. *et al.* New approaches in hypertension management: a review of current and developing technologies and their potential impact on hypertension care. **Current Hypertension Reports**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 44, 2019. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11906-019-0949-4>.

KOIKE, A. *et al.* Anaerobic metabolism as an indicator of aerobic function during exercise in cardiac patients. **Journal of the American College of Cardiology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 120–126, 1992.

KRZESIAK, A. *et al.* High-intensity intermittent training is as effective as moderate continuous training, and not deleterious, in cardiomyocyte remodeling of hypertensive rats. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 126, n. 4, p. 903–915, 2019. Disponível em: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/jappphysiol.00131.2018>.

LEE, D. *et al.* Running and all-cause mortality risk - is more better. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, [s. l.], v. 44, p. 924–924, 2012.

LERMAN, L. O. *et al.* Animal models of hypertension: a scientific statement from the american heart association. **Hypertension**, [s. l.], v. 73, n. 6, 2019. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYP.0000000000000090>.

LIAO, Y.; YANG, C. Nutraceuticals in the control of hypertension: mechanisms of action involving oxidative stress. *Frontiers in Nutrition*, v. 10, p. 654321, 2023. DOI: 10.3389/fnut.2023.654321.

LIGUORI, I. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, [s. l.], v. 13, p. 757–772, 2018. Disponível em: <https://www.dovepress.com/oxidative-stress-aging-and-diseases-peer-reviewed-article-CIA>.

LIU, Y. *et al.* NDUFA4L2 in smooth muscle promotes vascular remodeling in hypoxic pulmonary arterial hypertension. *J Cell Mol Med*. 2021 Jan;25(2):1221-1237. doi: 10.1111/jcmm.16193. Epub 2020 Dec 19.

LOCATELLI, J. *et al.* Swim training attenuates the adverse remodeling of LV structural and mechanical properties in the early compensated phase of hypertension. **Life Sciences**, [s. l.], v. 187, p. 42–49, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320517303983>.

LUNETTI, P. *et al.* Physical activity and male reproductive function: a new role for gamete mitochondria. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 99–106, 2021. Disponível em: <https://journals.lww.com/10.1249/JES.0000000000000245>.

MA, M. *et al.* N-acetylcysteine maintains penile length and erectile function in bilateral cavernous nerve crush rat model by reducing penile fibrosis. **Asian Journal of Andrology**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 215, 2021. Disponível em: [https://journals.lww.com/10.4103/aja.aja\\_17\\_20](https://journals.lww.com/10.4103/aja.aja_17_20).

MALACHIAS, M. *et al.* Capítulo 1 - Conceituação, Epidemiologia e Prevenção Primária. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s. l.], v. 107, n. 3, p. 1–6, 2016.

MANCIA, G. *et al.* ESH Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension: Endorsed by the International Society of Hypertension (ISH) and the European Renal Association (ERA). **Journal of hypertension**, v. 41, n. 12, p. 1874–2071, 2023. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000003480>

MANNUCCI, A. *et al.* The impact of oxidative stress in male infertility. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [s. l.], v. 8, p. 799294, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.799294/full>.

MAAS, J. A.; JANSEN, H. W. The role of oxidative stress in hypertensive end-organ

damage. **Nature Reviews Cardiology**, v. 20, n. 2, p. 132-147, 2023. DOI: 10.1038/s41569-022-00646-5.

MICHAELIDES, A. P. *et al.* Exercise duration as a determinant of vascular function and antioxidant balance in patients with coronary artery disease. **Heart**, [s. l.], v. 97, n. 10, p. 832–837, 2011. Disponível em: <https://heart.bmj.com/lookup/doi/10.1136/hrt.2010.209080>.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Oxidative stress, Noxs, and hypertension: Experimental evidence and clinical controversies. **Annals of Medicine**, [s. l.], v. 44, n. sup1, p. S2–S16, 2012.

MOORE, G. E. Biochemical and cellular mechanisms of aging and degenerative disease: Excessive, poor-quality caloric intake may deplete essential nutrients and interfere with cellular processes to produce degenerative damage. **Medical Hypotheses**, [s. l.], v. 70, n. 4, p. 768–775, 2008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306987707005348>.

MUCIACCIA, B. *et al.* Higher clusterin immunolabeling and sperm DNA damage levels in hypertensive men compared with controls. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 2267–2276, 2012. Disponível em: <http://humrep.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/humrep/des173>.

NAVANEETHABALAKRISHNAN, S. *et al.* Hypertension and reproductive dysfunction: a possible role of inflammation and inflammation-associated lymphangiogenesis in gonads. **Clinical Science**, [s. l.], v. 134, n. 24, p. 3237–3257, 2020. Disponível em: <https://portlandpress.com/clinsci/article/134/24/3237/227400/Hypertension-and-reproductive-dysfunction-a>.

NOWICKA-BAUER, K.; NIXON, B. Molecular changes induced by oxidative stress that impair human sperm motility. **Antioxidants**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 134, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/2/134>.

O'KEEFE, J. H. *et al.* Potential adverse cardiovascular effects from excessive endurance exercise. **Mayo Clinic Proceedings**, [s. l.], v. 87, n. 6, p. 587–595, 2012. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025619612004739>.

OPARIL, S.; CALHOUN, D. A. (2019). Hypertension: pathogenesis and management. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 73, n. 16, p. 1917-1936. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.12.033.

PETRICCA, S. *et al.* Oxidative stress, cytotoxic and inflammatory effects of azoles combinatorial mixtures in sertoli TM4 cells. **Antioxidants**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 1142, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3921/12/6/1142>.

POTTER, S. J.; DEFALCO, T. Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function. **Reproduction**, [s. l.], v. 153, n. 4, p. R151–R162, 2017. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/153/4/R151.xml>.

PRIOR, B. M. *et al.* Exercise-induced vascular remodeling. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 26–33, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12562167>.

QU, M. *et al.* Association of serum testosterone and luteinizing hormone with blood pressure and risk of cardiovascular disease in middle-aged and elderly men. **Journal of the American Heart Association**, [s. l.], v. 10, n. 7, 2021. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/JAHA.120.019559>.

QUIROGA, C. *et al.* Moderate exercise in spontaneously hypertensive rats is unable to activate the expression of genes linked to mitochondrial dynamics and biogenesis in cardiomyocytes. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 11, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2020.00546/full>.

RAGHU, G. *et al.* The multifaceted therapeutic role of N-Acetylcysteine (NAC) in disorders characterized by oxidative stress. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 1202–1224, 2021. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/189647/article>.

REDDY, N. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) transcript and protein in the testis of several vertebrates, including endangered species. **Theriogenology**, [s. l.], v. 77, n. 3, p. 608–614, 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X11004560>.

REY, S.; SEMENZA, G. L. **Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling**. [S. l.: s. n.], 2010.

RICHALET, J. P.; HERMAND, E.; LHUISSIER, F. J. Cardiovascular physiology and pathophysiology at high altitude. **Nat Rev Cardiol.**, v. 21, n. 2, p. 75-88, 2024. doi: 10.1038/s41569-023-00924-9. Epub 2023 Oct 2. PMID: 37783743.

RIVAS, A. M. *et al.* Hypertension and Hyperthyroidism: Association and Pathogenesis. **The American Journal of the Medical Sciences**, [s. l.], v. 361, n. 1, p. 3–7, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002962920303645>.

RIVAS, D. A. *et al.* The role of hypertension in cardiovascular disease: a comprehensive review. **Cardiovascular Journal of Africa**, v. 32, n. 1, p. 1-15, 2021. DOI: 10.5830/CVJA-2020-0374.

ROCHA, N. N. Are wistar rats the most suitable normotensive controls for spontaneously hypertensive rats to assess blood pressure and cardiac structure and function?. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 172–173, 2022. Disponível em: <https://ijcscardiol.org/article/are-wistar-rats-the-most-suitable-normotensive-controls-for-spontaneously-hypertensive-rats-to-assess-blood-pressure-and-cardiac-structure-and-function/>.

RODRIGO, R.; GONZÁLEZ, J.; PAOLETTO, F. The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension. **Hypertens Res.**, v. 34, n. 4, p. 431-40, 2011. doi: 10.1038/hr.2010.264. Epub 2011 Jan 13. PMID: 21228777.

ROQUE, F. R. *et al.* Exercise training and cardiometabolic diseases: focus on the vascular system. **Current Hypertension Reports**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 204–214, 2013. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11906-013-0336-5>.

ROSETY, M. A. *et al.* Exercise improved semen quality and reproductive hormone levels in sedentary obese adults. **Nutricion Hospitalaria**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 608–612, 2017.

ROSS, M. *et al.* Exercise-induced skeletal muscle angiogenesis: impact of age, sex, angiocrines and cellular mediators. **Eur J Appl Physiol.**, v. 123, n. 7, p. 1415-1432, 2023. doi: 10.1007/s00421-022-05128-6. Epub 2023 Jan 30. PMID: 36715739; PMCID: PMC10276083.

RUDOLF, P. E.; KOCIJAN, R.; SIMIC, T. Hypertension and oxidative stress: new

insights into pathophysiology and therapeutic strategies. **Journal of Hypertension**, v. 40, n. 4, p. 704-712, 2022. DOI: 10.1097/HJH.0000000000002862.

RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D. The Sertoli Cell. *In: The physiology of reproduction*. New York, NY: Raven Press, 1993. p. 1253-1299.

SAFARINEJAD, M. R.; AZMA, K.; KOLAH, A. A. The effects of intensive, long-term treadmill running on reproductive hormones, hypothalamus-pituitary-testis axis, and semen quality: a randomized controlled study. **Journal of Endocrinology**, [s. l.], v. 200, n. 3, p. 259–271, 2008. Disponível em: <http://joe.endocrinology-journals.org/cgi/doi/10.1677/JOE-08-0477>.

SAFARINEJAD, M. R.; SAFARINEJAD, S. Efficacy of selenium and/or N-Acetylcysteine for improving semen parameters in infertile men: a double-blind, placebo controlled, randomized Study. **The Journal of Urology**, [s. l.], v. 181, n. 2, p. 741–751, 2009.

SENDOEL, A. *et al.* DEPDC1/LET-99 participates in an evolutionarily conserved pathway for anti-tubulin drug-induced apoptosis. **Nat Cell Biol.**, v. 16, n. 8, p. 812-20, 2014. doi: 10.1038/ncb3010. Epub 2014 Jul 27. PMID: 25064737.

SGRÒ, P. Exercise, training, and the hypothalamic–pituitary–gonadal axis in men. **Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research**, [s. l.], v. 9, p. 86–89, 2019.

SHARMA, R. *et al.* Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 66, 2013. Disponível em: <http://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-11-66>.

SHIRAISHI, K.; MATSUYAMA, H.; TAKIHARA, H. Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. **International Journal of Urology**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 538–550, 2012. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1442-2042.2012.02982.x>.

SHITTU, S. A. *et al.* Protective action of N-acetylcysteine on sperm quality in cyclophosphamide-induced testicular toxicity in male Wistar rats. **JBRA Assisted Reproduction**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 83–90, 2019. Disponível em: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1518-0557.20180079>.

SHOWELL, M. G. *et al.* Antioxidants for male subfertility. *In*: SHOWELL, M. G. (org.). **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2011. p. CD007411.

SUN, Z. Aging, arterial stiffness, and hypertension. **Hypertension**, [s. l.], 2015.

TAIN, Y.-L. *et al.* N-Acetylcysteine prevents programmed hypertension in male rat offspring born to suramin-treated mothers. **Biology of reproduction**, [s. l.], v. 95, n. 1, p. 8, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27251093>.

TELES, M. C. *et al.* Cardiac changes in spontaneously hypertensive rats: modulation by aerobic exercise. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 177, p. 109–124, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079610722001171>.

THANDAVARAYAN, R. A, CHITTURI, K. R.; GUHA, A. Pathophysiology of acute and chronic right heart failure. **Cardiol Clin.**, v. 38, n. 2, p. 149-160, 2020. doi: 10.1016/j.ccl.2020.01.009. Epub 2020 Mar 5. PMID: 32284093.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Angiotensin II and vascular smooth muscle cell hypertrophy and proliferation: roles of oxidative stress and the MAPKs. **Hypertension**, v. 37, n. 5, p. 1037-1045, 2001. DOI: 10.1161/01.HYP.37.5.1037.

TRUONG, T.; GARDNER, D. K. Antioxidants improve IVF outcome and subsequent embryo development in the mouse. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 32, n. 12, p. 2404–2413, 2017. Disponível em: <http://academic.oup.com/humrep/article/32/12/2404/4616530>.

VAAMONDE, D. *et al.* Physically active men show better semen parameters and hormone values than sedentary men. **European Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 112, n. 9, p. 3267–3273, 2012. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00421-011-2304-6>.

VALAEI, K. *et al.* Cardiac oxidative stress and the therapeutic approaches to the intake of antioxidant supplements and physical activity. **Nutrients**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 3483, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/13/10/3483>.

WALKE, G. *et al.* The impact of oxidative stress on male reproductive function:

exploring the role of antioxidant supplementation. **Cureus**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. e42583, 2023. Disponível em: <https://www.cureus.com/articles/169642-the-impact-of-oxidative-stress-on-male-reproductive-function-exploring-the-role-of-antioxidant-supplementation>.

WILLIAMS, B.; JOHNSTON, C. I. The renin-angiotensin-aldosterone system: An important therapeutic target in hypertension. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 21, n. 1, p. 48-54, 2012. DOI: 10.1097/MNH.0b013e32834b09c4.

WILLIAMS, B. *et al.* ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. **European Heart Journal**, [s. l.], v. 39, n. 33, p. 3021–3104, 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/eurheartj/article/39/33/3021/5079119>.

WISE, L. A. *et al.* Physical activity and semen quality among men attending an infertility clinic. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 95, n. 3, p. 1025–1030, 2011. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028210027767>.

WYSS, F. *et al.* Position statement of the Interamerican Society of Cardiology (IASC) on the current guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of arterial hypertension 2017–2020. **International Journal of Cardiology Hypertension**, [s. l.], v. 6, p. 100041, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2590086220300185>.

YU, Y. *et al.* Angiotensin II-mediated vascular remodeling: a critical link to hypertensive end-organ damage. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 80, n. 2, p. 199-211, 2022. DOI: 10.1016/j.jacc.2022.03.022.

XU, Z. *et al.* Effects of moderate-intensity continuous training and high-intensity interval training on testicular oxidative stress, apoptosis and m6A methylation in obese male mice. **Antioxidants**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 1874, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3921/11/10/1874>.

ZAFARULLAH, M. *et al.* Molecular mechanisms of N -acetylcysteine actions. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 6–20, 2003. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s000180300001>.

ZHANG, B. *et al.* Freeze-thawing impairs the motility, plasma membrane integrity and mitochondria function of boar spermatozoa through generating excessive ROS. **BMC**

**Veterinary Research**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 127, 2021. Disponível em: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-021-02804-1>.

ZHAO, S. *et al.* N-acetylcysteine protects against microcystin-LR-induced endoplasmic reticulum stress and germ cell apoptosis in zebrafish testes. **Chemosphere**, [s. l.], v. 204, p. 463–473, 2018.

## CAPÍTULO II

### ARTIGO CIENTÍFICO NAS NORMAS DA REVISTA MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION - FATOR DE IMPACTO 4,0 - QUALIS A1

**N-acetilcisteína associada ao treinamento concorrente melhora angiogênese e estresse oxidativo em testículos de ratos espontaneamente hipertensos**

**Título breve: NAC e treinamento na proteção oxidativa dos testículos de SHR**

Lauren Chrys Soato Marin<sup>1</sup>; Adriana Junqueira<sup>1</sup>; Ana Paula Alves Favareto<sup>1</sup>; Maria Eduarda Almeida Tavares<sup>2</sup>; Giovana Rampazzo Teixeira<sup>2</sup>; Debora Hipólito Quadrelli<sup>3</sup>; Glaura Scantamburlo Alves Fernandes<sup>3</sup>; Katashi Okoshi<sup>4</sup>; Francis Lopes Pacagnelli<sup>1</sup>; Aline de Oliveira Santos<sup>1</sup>; Mayara de Oliveira Vidotto Figueiredo<sup>1</sup>; Caliê Castilho<sup>1</sup>; Rafael Stuani Floriano<sup>1</sup>; Ines Cristina Giometti<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup> UNESP - Universidade Estadual Paulista (Rua Roberto Simonsen, 305 - Centro Educacional - P. Prudente/SP - CEP 19060-900, Brasil

<sup>3</sup> UEL- Universidade Estadual de Londrina (Centro de Ciências Biológicas - Campus Universitário – Caixa Postal 10.011 – Londrina/PR - CEP 86.057-970, Brasil

<sup>4</sup> Universidade Estadual Paulista “ Julio de Mesquita Filho”, UNESP, Departamento de Clínica Médica, Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n, Botucatu/SP, CEP 18618687, Brasil.

\*Autor para correspondência Rodovia Raposo Tavares, km 572, Bairro Limoeiro, Presidente Prudente (SP), Brasil.

e-mail: inesgiometti@unoeste.br, Fone: 55-18-3229-2033 / Fax: 55-18-2007.

#### Resumo

A hipertensão arterial leva ao estresse oxidativo prejudicial a diversos tipos de células, sendo um importante fator de risco para a saúde humana. Um dos sistemas que sofre esses efeitos indesejáveis da hipertensão é o aparelho reprodutor. O treinamento físico melhora a hipertensão e a saúde geral do corpo e a n-acetilcisteína (NAC) tem um efeito antioxidante nas células. O objetivo da pesquisa foi verificar a ação da NAC associada ao treinamento concorrente na angiogênese e no estresse oxidativo testicular de ratos espontaneamente hipertensos

(SHR). A NAC aumentou a quantidade de AR, de VEGF dimérico, de FLT1, de MDA e de GSH nos testículos. O treinamento concorrente aumentou AR, GSH e a atividade de GST e reduziu HIF1 $\alpha$  e caspase 3 testiculares. Houve interação entre NAC e o treinamento no aumento de AR e dos fatores angiogênicos. Nenhuma diferença foi observada na morfologia espermática, no diâmetro dos túbulos seminíferos e na dosagem hormonal. Conclui-se que a NAC associada ao treinamento concorrente aumenta os mediadores angiogênicos, a glutatona e o receptor de andrógeno nos testículos de SHR. Além disso, o treinamento concorrente diminui o estresse oxidativo testicular. Outros parâmetros reprodutivos ainda devem ser estudados, que não foram verificados nesse estudo, como motilidade e concentração espermáticos.

**Palavras-chave:** Estresse oxidativo, espermatozoides, glutatona, hipertensão, NAC, SHR, treinamento, VEGF

## Introdução

A hipertensão é a doença crônica mais comum no mundo e produz morbidade e mortalidade substanciais (Lerman *et al.*, 2019). Estudos clínicos relataram que o risco de mortalidade dobra com o aumento da pressão arterial sistólica de 120 mmHg para 140 mmHg e de 140 mmHg para 160 mmHg em todas as faixas etárias (Barrows *et al.*, 2019; Rivas *et al.*, 2021; Dybiec *et al.*, 2023). Indivíduos hipertensos apresentam aumento da produção de ânions superóxido e peróxido de hidrogênio, diminuição da síntese de óxido nítrico e redução da biodisponibilidade antioxidante (Barrows *et al.*, 2019).

A hipertensão arterial leva a alterações sistêmicas importantes e prejudica drasticamente o funcionamento normal dos órgãos ao longo do tempo (Colli *et al.*, 2019). A hipertensão afeta cerca de 700 milhões de homens em idade reprodutiva, e os homens hipertensos apresentam risco aumentado de distúrbios reprodutivos, como a disfunção erétil (Colli *et al.*, 2019). A hipertensão é associada a uma menor qualidade do sêmen, menor volume seminal e menores motilidade e quantidade de espermatozoides (Guo *et al.*, 2017).

O estresse oxidativo é um fator significativo na infertilidade masculina devido à alta taxa de divisão celular e consumo de oxigênio mitocondrial no tecido testicular (Asadi *et al.*, 2017). As espécies reativas de oxigênio podem ter origem endógena ou exógena e podem causar defeitos na espermatogênese e infertilidade masculina (Aitken, 2020). Showell e colaboradores (Showell *et al.*, 2011) em sua revisão sistemática da literatura, concluíram que, em humanos, o sistema antioxidante do organismo por si só não é capaz de prevenir complicações prejudiciais do estresse oxidativo, e, portanto, o uso de antioxidantes pode melhorar o processo de espermatogênese. Há evidências de que o uso de NAC por três meses melhora a motilidade e concentração espermática quando comparado ao placebo (Ciftci *et al.*, 2009; Jannatifar *et al.*, 2019).

Os antioxidantes são agentes redutores que podem neutralizar biomoléculas oxidativas (Cepaityte *et al.*, 2023). Assim, muitos autores têm direcionado suas pesquisas para terapias antioxidantes para prevenir ou tratar diferentes tipos de doenças (Bjelakovic *et al.*, 2012; Cepaityte *et al.*, 2023). A NAC é um composto tiol (contendo sulfidril) com um poderoso efeito antioxidante por combater diretamente os radicais livres através da interação com o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio (Cepaityte *et al.*, 2023).

Parte dos efeitos induzidos pelo treinamento físico (melhora do sistema cardiovascular, aumento da massa muscular, redução da incidência de doenças e infecções e outros) se deve às adaptações induzidas em diversos sistemas corporais, incluindo o endógeno sistema antioxidante (Radak *et al.*, 2001). Há aumento na expressão de enzimas antioxidantes em diversos tecidos, após treinamento aeróbio ou anaeróbio (Aurino De Pinho *et al.*, 2010) e redução na expressão de enzimas pró-oxidantes. Assim, reforçando a indicação do treinamento físico para o tratamento não medicamentoso da hipertensão arterial (Malachias *et al.*, 2016).

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação de NAC associada ao treinamento concorrente na angiogênese e no estresse oxidativo de testículos em SHR. A hipótese desse estudo era que a NAC associada ao treinamento concorrente reduziria o estresse oxidativo provocado pela hipertensão e melhoraria a angiogênese nos testículos de SHR, melhorando parâmetros reprodutivos.

## **Material e Métodos**

### Grupos Experimentais

Os protocolos experimentais seguiram os princípios estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e estão de acordo com o Care and Use of Laboratory Animals publicado pela National Research Council e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente (SP), número de protocolo 8060.

Foram utilizados 48 ratos machos espontaneamente hipertensos (SHR), com idade de seis meses, o que corresponde à idade adulta (Andreollo *et al.*, 2012). Os SHR pesavam  $370,84 \pm 20,39$  gramas e foram alojados em caixas (quatro animais/caixa), sendo mantidos em ambiente com temperatura controlada ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), fotoperíodo (com ciclos de luz invertidos de 12 horas claro-escuro) e umidade relativa do ar de 50% a 60% e receberam comida e água *ad libitum*.

Os ratos foram divididos em quatro grupos (n=12): S = SHR sedentários (controle); SNAC = SHR sedentários que receberam NAC (N-Acetil-L-Cisteína, SigmaAldrich, Brasil) na dose de 120mg/kg/dia por via oral durante oito semanas (Rogerio *et al.*, 2019); T = SHR submetidos ao protocolo de treinamento concorrente combinando treinamento resistido de escalada com carga seguido por treinamento aeróbio em esteira; e TNAC = SHR que receberam NAC e foram exercitados pelo protocolo de treinamento concorrente (Rogerio *et al.*, 2019).

### Testes de capacidade física e treinamento concorrente

O treinamento concorrente era composto de um treinamento resistido de escalada seguido de um treinamento aeróbico em esteira, três/vezes por semana, em dias alternados, por 8 semanas (Figura 1).

O treinamento de resistência foi realizado em uma escada especialmente construída para os ratos (110 cm de altura por 18 cm de largura, degraus de 2 cm e  $80^\circ$  de inclinação). O treinamento resistido foi realizado 3 vezes por semana, com aumento gradual de intensidade. Inicialmente foi o período de adaptação à escada, sem

sobrepeso no primeiro dia, com 15% de sobrepeso no segundo dia e com 30% de sobrepeso no terceiro dia, os ratos foram estimulados a subir as escadas até subirem as escadas 3 vezes sem necessidade de estimulação. Depois dessa semana de adaptação, o máximo de capacidade de cada animal foi avaliado, com aumento de carga progressiva, começando com 75% do peso corporal e adicionando 15% até os ratos falharem em subir as escadas. A capacidade máxima do animal foi considerada a maior carga que o animal conseguiu subir completamente as escadas.

Na segunda semana, as sessões de treinamento resistido consistiam de quatro subidas com sobrepeso correspondente a 50%, 75%, 90% e 100% da capacidade máxima de cada rato, com um período de recuperação de dois minutos entre cada subida. O treinamento foi mantido até o final do período experimental (8 semanas) (Rogerio *et al.*, 2019).

A capacidade aeróbica foi avaliada pelo teste de tolerância ao esforço físico e verificado no começo e no final do treinamento. O teste consistiu de corrida em esteira, começando a uma velocidade de 6 m/min, com incremento de 3 m/min a cada 3 minutos até o animal atingir a exaustão. A velocidade máxima da corrida foi anotada e a distância total percorrida foi calculada. Os animais passaram por um período de adaptação de uma semana antes das avaliações, por 10 min/dia.

O treinamento aeróbico foi realizado em esteira, três vezes por semana, em dia alternados. Inicialmente, os ratos sofreram um período de adaptação de 4 semanas, nas quais houve progressão semanal da velocidade (de 5 m/min até 17 m/min) e de tempo (de 10 até 40 min). Ao final da quinta semana, as corridas em esteira foram realizadas com 60% da capacidade máxima de exaustão, equivalente a 18 m/min em 40 minutos, até o final do período experimental (Rogerio *et al.*, 2019).

#### Colheita de material

Os animais foram submetidos a jejum de 12 horas antes da eutanásia. Foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, intraperitoneal), seguido de decapitação, 24 horas após a última sessão de treinamento concorrente. Após a decapitação dos animais, o sangue (2 mL) foi colhido em tubos com anticoagulante EDTA e o plasma foi armazenado em freezer a -30°C para a dosagem hormonal, os órgãos reprodutivos pesados, os testículos direitos fixados em Methacarn e os testículos esquerdos foram cortados, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C. Os espermatozoides foram colhidos dos ductos deferentes em formol salina a 10% e armazenados em geladeira.

#### Morfologia espermática

Para a análise da morfologia espermática, os espermatozoides foram liberados com ajuda de uma seringa e fixados em formol-salina a 10% e refrigerados. Foram realizados esfregaços com os espermatozoides em lâminas histológicas, que foram observados em microscópio (aumento de 400X). Foram analisados 200 espermatozoides por animal e as anormalidades morfológicas encontradas classificadas em duas categorias: a)

anormalidades da cabeça (sem curvatura característica, em forma de alfinete, sem curvatura ou isolada); e b) anormalidades da cauda (enrolada, quebrada, dobrada e isolada) (Vieira *et al.*, 2019).

#### Morfometria dos túbulos seminíferos

Os testículos direitos foram inclusos em Paraplast e realizados cortes de 3µm de espessura e as lâminas foram confeccionadas utilizando micrótomo. Então as lâminas foram submetidas à coloração de hematoxilina-eosina. As lâminas foram fotografadas por uma câmera acoplada ao microscópio de luz em aumento de 40X (Figura 2). As lâminas foram então fotografadas e avaliadas utilizando o software MOTIC Image plus 2.0®. A área do lúmen seminífero, do epitélio germinativo e do túbulo seminífero foram avaliadas. A média das áreas foram verificadas em 10 cortes por animal contando 10 medidas por corte.

#### Dosagens hormonais

As dosagens hormonais plasmáticas foram realizadas em duplicatas. O radioimunoensaio para testosterona direta foi realizado em um único ensaio com o kit (Immunotech - Beckman Coulter, 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).

#### Expressão gênica

As amostras de aproximadamente 100 mg de testículos esquerdos armazenados foram triturados em homogeneizador de tecidos e submetidos ao protocolo de extração total TRIzol® (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific Inc., Carlsbad, California, EUA). A concentração do RNA total recuperado foi mensurada por espectrofotometria por NanoDrop™ Lite (Fischer Scientific™, ThermoFisher Scientific Inc., Wilmington, Delaware, EUA). 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™ ThermoFisher Scientific, Foster City, Califórnia, EUA).

A RT foi realizada utilizando o protocolo da High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific, Vilnius, Lituânia), seguindo protocolo do fabricante com oligonucleotídeos iniciadores randômicos.

A qPCR foi realizada no termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems®, Foster City, California, EUA) 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 FAM-MGB TaqMan® (Applied Biosystems®, Foster City, Califórnia, EUA), já padronizados conforme descrição a seguir, para os gene-alvos: fator de crescimento endotelial vascular (*Vegf*): Rn00582935\_m1, produto: 75 pb; receptor de domínio de inserção de quinase (*Kdr*): Rn00564986\_m1, produto: 75 pb; receptor de tirosina quinase semelhante a Fms (*Flt1*): Rn01409533\_m1, produto: 69pb; Fator de indução por hipóxia 1 alfa (*Hif1α*): Rn01472831\_m1, produto: 90pb; catalase (*Cat*): Rn00560930\_m1, produto: 107 pb; superóxido dismutase 2 (*Sod2*): Rn00690588\_g1, produto: 64pb; e glutatona sintetase (*Gss*): Rn01536324\_m1, produto: 134 pb.

Como controle interno das reações de qPCR foram testados 3 genes referência para os seguintes ensaios TaqMan®: proteína ribossomal S18 (*Rps18*): Rn01428913\_gH, Produto: 62 pb; gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*): Rn017775763\_g1, produto: 174 pb; e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1(*Hprt1*): Rn01527840\_m1, produto: 64 pb. O gene referência escolhido foi o mais estável utilizando o programa NormFinder™ Software (<https://moma.dk/normfinder-software>, MOMA, Dinamarca).

As reações de 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 (2001), considerando a média aritmética do  $\Delta Ct$  do grupo controle como calibrador de reação.

### Western Blotting

Outras amostras dos testículos esquerdos de cada grupo experimental foram homogeneizadas com tampão RIPA com adição de 10% do tampão inibidor de protease e centrifugadas a 14.000 rpm a 4°C por 20 min. A quantificação proteica foi realizada usando o método Bradford e analisada em ELISA. A eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada na concentração de 30 mg de proteína total para depois ser transferida do gel para a membrana de nitrocelulose. A eficácia da transferência foi verificada por meio do corante vermelho Ponceau. Subsequentemente, a membrana foi incubada com o anticorpo primário para as seguintes proteínas: receptor de andrógeno (AR, sc-7305), Caspase 3 (sc-56053), proteína X associada ao BCL2 (BAX, sc-7480), VEGF (sc-7269), receptores de VEGF (FLT1, sc-271789 e KDR, sc-6251), o fator induzível por hipóxia 1 alfa (HIF1 $\alpha$ , sc-13515) e  $\beta$ -actina (sc-47778). Após isso, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário m-IgG (BP-HRP, sc-516102, HRP conjugado) e então revelada usando Cytiva Amersham™ ECL™ Prime no C-Digit Digital Western Blot Imaging. A expressão das bandas (animais/grupo) foi quantificada pelo Image Studio software. Os valores de cada proteína foram normalizados pelos valores da  $\beta$ -actina e os resultados expressos em médias e erros padrões da média.

### Análise do perfil oxidativo

Amostras de testículos congelados no freezer a  $-80^{\circ}$  também foram utilizados para a análise do perfil oxidativo pelos níveis de malondialdeído (MDA) e atividade das enzimas envolvidas no estresse oxidativo. Para tanto, a concentração de substratos reativos de ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi avaliada para determinar a peroxidação lipídica dos testículos, desde que a decomposição dos peróxidos lipídicos resulta na formação de TBARS. Os níveis de MDA, um produto intermediário da peroxidação lipídica, foram determinados por espectrofotometria pela diferença entre a absorvância em 535 e 572 nm (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, USA). Os resultados são expressos em nmol de MDA por miligrama de proteína (Souza *et al.*, 2023).

A atividade enzimática da catalase (CAT) foi determinada pela degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Após a determinação da concentração de proteínas (normalizadas 1,0 mg/ml em PBS), 297  $\mu$ l de meio de reação foi colocado em microplaca de UVvis e a leitura feita a 240nm por 15 segundos durante 1 minuto (Aebi, 1984). A atividade da Glutathione-S-transferase (GST) foi avaliada por espectrofotometria com CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), com base na respectiva conjugação com a glutathione (Keen *et al.*, 1976).

A concentração de glutathione reduzida (GSH) foi determinada de acordo com o método proposto por Rahman *et al.* (2006), com algumas modificações, utilizando ácido 5,5'-ditiobis 20-nitrobenzoico no homogeneizado, evidenciado pela formação da cor amarela. Os níveis de GSH foram medidos a 412 nm e os resultados serão expressos em  $\mu$ mol/mg de proteína. Os níveis de GSSG e índice de estresse oxidativo (IEO) foram calculados, levando em consideração a estequiometria da reação (Carrara *et al.*, 2019). Os valores de GSSG e IEO foram determinados, respectivamente, pelas equações:  $GSSG (\mu M) = (GT - GSH)/2$ ;  $IEO (\%) = (GSSG/GSH) \times 100$ . Os resultados foram expressos em  $\mu$ M/mg proteína.

A concentração de glutathione total (GT) foi determinada utilizando ácido 5,5'-ditiobis 20-nitrobenzoico (DTNB), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e a glutathione redutase sobre a amostra. As concentrações de GT foram medidas a 412 nm após 15 minutos de incubação das amostras com o meio de reação.

### Análise Estatística

Todos os resultados foram analisados segundo o pressuposto de normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. As variáveis com distribuição paramétrica foram submetidas ao teste de Two-way ANOVA para comparação das médias dos quatro grupos, seguido do pós-teste de Bonferroni. As variáveis que não atenderam aos pressupostos de normalidade foram testadas por meio do teste de Kruskal-Wallis para comparação das médias entre os grupos. O nível de significância adotado para todas as comparações foi de 5%.

## **Resultados**

### Pesos, morfologia espermática e morfometria dos túbulos seminíferos

Os pesos dos ratos e dos órgãos reprodutivos (testículos, epidídimos e ductos deferentes) dos SHR estão apresentados na tabela 1. Nenhuma diferença estatística ( $P > 0,05$ ) foi encontrada entre os grupos estudados. Também não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na morfologia espermática, nem na morfometria dos túbulos seminíferos entre os grupos experimentais (tabela 1).

#### Dosagens hormonais

Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos nas dosagens dos hormônios plasmáticos: corticosterona, prolactina e testosterona (figura 3).

#### Expressão gênica

Entre os três genes referência testados, o que apresentou a maior estabilidade foi o gene *Hprt1*, que foi utilizado para a padronização das amostras. Genes com valores menores que 0,5 são aceitáveis para a padronização da expressão gênica relativa pelo NormFinder<sup>TM</sup>, todos os endógenos testados tiveram valores inferiores a 0,5 e poderiam ser utilizados para a análise de expressão gênica quantitativa em testículos de SHR no nosso modelo experimental (*Gapdh* = 0,155; *Rps18* = 0,092; *Hprt1* = 0,056), porém o que foi mais estável foi o *Hprt1*, por isso foi utilizado na padronização das amostras. Não houve diferença significativa na expressão dos genes angiogênicos e de estresse oxidativo nos testículos dos SHR (figura 4).

#### Western Blotting

As expressões proteicas dos testículos estão apresentadas na figura 5. Houve interação entre NAC e o treinamento concorrente para AR, o dímero de VEGF e KDR. Tanto o treinamento concorrente ( $P < 0,05$ ) quanto o NAC ( $P < 0,001$ ) aumentaram a expressão de AR (figura 5A), o TNAC teve maior expressão de AR que os demais grupos ( $P < 0,0001$ ). O treinamento concorrente reduziu ( $P < 0,05$ ) a expressão da enzima caspase 3 (figura 5B). A NAC aumentou a quantidade de dímeros de VEGF (Figura 5C). A associação de NAC ao treinamento concorrente aumentou a expressão de KDR (figura 5E) e a suplementação de NAC aumentou a expressão de FLT1 (figura 5F). O treinamento concorrente foi capaz de diminuir HIF1 $\alpha$  e o SNAC apresentou maior expressão de HIF1 $\alpha$  que S (figura 5G). Nenhuma diferença estatística foi encontrada na proteína BAX e no monômero de VEGF.

#### Análise do perfil oxidativo

Com relação ao estresse oxidativo (figura 6), nenhuma interação entre NAC e treinamento foi verificada, porém tanto o NAC quanto o treinamento concorrente aumentaram a concentração de MDA e GSH.

Somente o treinamento concorrente aumentou a atividade específica de GST. Porém, os grupos experimentais não diferiram quanto à atividade de CAT, nem quanto à concentração de GSSG e o IEO% ( $P > 0,05$ ).

## Discussão

A hipertensão é uma doença crônica que afeta a saúde de homens no mundo inteiro (Lerman *et al.*, 2019). A elevada pressão arterial causa dano vascular e estresse oxidativo causado em vários órgãos (Rivas *et al.*, 2021), incluindo os órgãos reprodutivos (Colli *et al.*, 2019). Como esperado, houve interação entre a suplementação com NAC e o treinamento concorrente nos mediadores angiogênicos, com aumento dos receptores, KDR e AR. NAC também aumentou o VEGF dimérico e FLT1 e o treinamento concorrente diminuiu o HIF1 $\alpha$ . Os efeitos no estresse oxidativo foram menos acentuados, porém NAC e o treinamento concorrente aumentaram a GSH e o treinamento concorrente aumentou a atividade de GST.

Embora a NAC e o treinamento concorrente não tenham alterado a expressão dos genes angiogênicos testados (*Vegf*, *Kdr*, *Ftl1* e *Hif1 $\alpha$* ) nos testículos de SHR, houve uma maior quantificação da proteína VEGF dimérica quando houve suplementação com NAC. A dimerização covalente do VEGF é necessária para a sua ligação ao domínio extracelular de seu receptor tirosina-quinase KDR e sua posterior ação angiogênica (Stuttfield and Ballmer-Hofer, 2009), indicando maior ativação do fator angiogênico nos testículos após a ingestão de NAC. A expressão proteica do KDR aumentou com o uso de NAC associado ao treinamento concorrente, o que é também um maior indicativo angiogênico nos testículos. O KDR é o mediador de quase todos os efeitos do VEGF-A, enquanto o FLT1 atua como um modulador das ações do VEGF-A (Porta and Striglia, 2020). A ligação do dímero de VEGF ao KDR promove sua ativação, dimerização com posterior fosforilação do resíduo tirosina no domínio quinase intracelular e, então, a ativação de segundos-mensageiros que sinalizam diferentes vias celulares (Stuttfield and Ballmer-Hofer, 2009). As ações mediadas por VEGF e KDR incluem angiogênese, vasculogênese e sobrevivência e migração das células endoteliais (Porta and Striglia, 2020).

O treinamento concorrente reduziu a expressão proteica de HIF1 $\alpha$  nos testículos dos SHR. A hipóxia é a maior indutora de angiogênese tecidual, e um dos fatores responsáveis pela hipóxia tecidual é a hipertensão (Melincovici *et al.*, 2018). A hipóxia tecidual provoca a liberação de HIF1 $\alpha$ , que ativa os fatores angiogênicos, entre eles, o VEGF (Melincovici *et al.*, 2018). Durante os treinamentos físicos, o fluxo sanguíneo é direcionado para o músculo ativo e reduzido em outros órgãos, provocando hipóxia tecidual, porém após o treinamento, os órgãos em hipóxia entram em reperfusão tecidual e recebem um maior aporte de O<sub>2</sub> (Petry *et al.*, 2010). A reperfusão sanguínea representa potencial para provocar estresse oxidativo, já que o aumento do fluxo sanguíneo leva a um maior aporte de oxigênio para o tecido e, conseqüentemente, um maior metabolismo celular com potencial para formar as espécies reativas de oxigênio na mitocôndria, já que o oxigênio é o aceptor final de elétrons da cadeia respiratória (Petry *et al.*, 2010).

Foi verificado um aumento no MDA no grupo TNAC, tanto o treinamento concorrente quanto a suplementação com NAC causaram o aumento de MDA. O MDA é detectado por espectrometria por sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), método conhecido como TBARS, o MDA é um dos produtos finais da peroxidação lipídica e por isso utilizado como um biomarcador de estresse oxidativo em sistemas biológicos

(Grotto *et al.*, 2008). Maiores níveis de MDA plasmáticos foram associados a homens que praticavam atividades físicas mais intensas (Bouزيد *et al.*, 2015), mas os estudos mostram que qualquer modalidade de treinamento físico leva ao aumento de MDA (Petry *et al.*, 2010; Bouزيد *et al.*, 2015). O NAC associado ao treinamento concorrente pode ter gerado um maior fluxo sanguíneo nos testículos pelo efeito do sistema VEGF com maior aporte de O<sub>2</sub>, o que pode ter gerado uma maior peroxidação dos fosfolípidos de membrana devido ao aumento dos oxigênios reativos produzidos na mitocôndria.

O TBARS apesar de muito utilizado para determinar peroxidação lipídica, não é um método fidedigno, pois outros parâmetros devem ser analisados, como os danos ao DNA provocados pela peroxidação lipídica e a apoptose (Petry *et al.*, 2010). Apesar do treinamento físico provocar estresse oxidativo em muitos tecidos, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos do nosso estudo no IEO%. Além disso, o treinamento físico é um método eficaz de provocar o aumento de enzimas antioxidantes (Petry *et al.*, 2010). A atividade física é um dos melhores métodos para tratamento de doenças relacionadas à idade que causam estresse oxidativo e na prevenção de mudanças no balanço oxidantes/antioxidantes associados à idade.

Nesse estudo, nenhuma diferença foi encontrada na expressão de genes antioxidantes avaliados (*Cat*, *Gss* e *Sod2*) nem na atividade de CAT, mas tanto o treinamento concorrente quanto a suplementação com NAC foram eficazes para aumentar as concentrações de GSH. Sabe-se que o NAC pode induzir a síntese de GSH, cuja principal função é a remoção de radicais livres e proteção contra o estresse oxidativo (Sceneay *et al.*, 2013; Cepaityte *et al.*, 2023). O treinamento concorrente também aumentou a atividade específica de GST, essa enzima tem a função catalisar reações de conjugação da GSH com os metabólitos produzidos, facilitando assim sua excreção (Atkinson and Babbitt, 2009). Não houve alteração no BAX e o treinamento reduziu a caspase 3, importantes indicadores de apoptose, o que demonstra que o equilíbrio oxidativo foi favorável no TNAC, pois o MDA aumentado não resultou em morte celular.

Os grupos não diferiram em relação aos hormônios plasmáticos, porém tanto NAC quanto o treinamento concorrente aumentaram a concentração de AR, indicando uma maior ação androgênica nos testículos nesse grupo. A testosterona plasmática não foi modificada pelos tratamentos, porém a testosterona é produzida nos testículos e a testosterona intra-testicular não foi dosada, altas concentração de testosterona intra-testicular são consideradas essenciais para a espermatogênese (Thirumalai and Page, 2022). A testosterona é fundamental para a completa espermatogênese, age nas células de Sertoli por meio da sua ligação ao AR e depois a migração do complexo para o núcleo para ativar a expressão gênica ou então pela ação indireta via ativação do receptor de fator de crescimento epidermal na membrana plasmática, gerando resposta intracelular (Edelsztein and Rey, 2019). Apesar dos sinais moleculares indicando uma melhor função testicular com o uso do NAC associado ao treinamento concorrente, os parâmetros reprodutivos analisados de diâmetro de túbulo seminífero e de morfologia espermática não indicaram diferença entre os grupos, porém outros parâmetros funcionais ainda devem ser estudados, como motilidade e concentração espermáticos.

Conclui-se que a NAC associada ao treinamento concorrente aumenta os mediadores angiogênicos, a glutatona e o receptor de andrógeno nos testículos de SHR. Além disso, o treinamento concorrente diminui o estresse oxidativo testicular.

### Participação no artigo

LCSM, AJ, APAF, GRT, GSAF, KO, FLP, CC, RSF e ICG contribuição substancial para a concepção e o projeto experimental; LCSM, AJ, MEAT, DHQ, AOS e MOVF aquisição dos dados; LCSM, AJ, APAF, GRT, GSAF, KO, FLP, CC, RSF e ICG análise e interpretação dos dados; LCSM, AJ, APAF, MEAT, GRT, DHQ, GSAF, KO, FLP, AOS, MOVF, CC, RSF e ICG redigir o artigo ou revisá-lo criticamente; LCSM, AJ, APAF, MEAT, GRT, DHQ, GSAF, KO, FLP, AOS, MOVF, CC, RSF e ICG aprovação final da versão a ser publicada; LCSM, AJ, APAF, MEAT, GRT, DHQ, GSAF, KO, FLP, AOS, MOVF, CC, RSF e ICG concordam em ser responsabilizados por todos os aspectos do trabalho como garantia que questões relacionadas à exatidão ou integridade de qualquer parte do trabalho sejam investigadas e resolvidas.

### Apoio financeiro

Bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

### Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

### Disponibilidade de dados

Os dados gerados no artigo estão disponíveis mediante solicitação ao autor correspondente.

### Referências

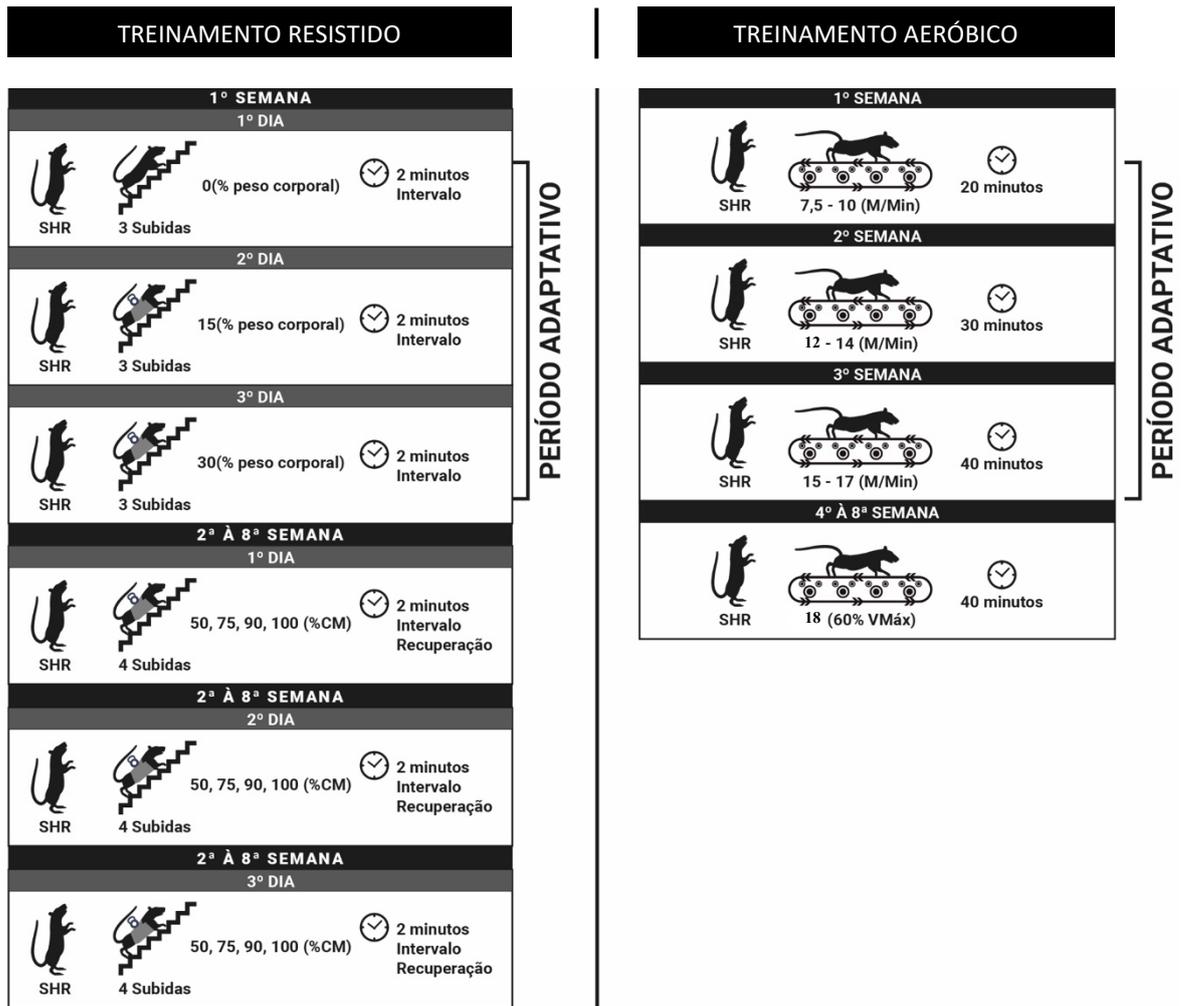
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. Pp. 121–126.
- Aitken, R.J. (2020). Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction*, **159**, R189–R201.
- Andreollo, N.A., Santos, E.F. dos, Araújo, M.R. & Lopes, L.R. (2012). Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva: ABCD = Brazilian archives of digestive surgery*, **25**, 49–51.
- Asadi, N., Bahmani, M., Kheradmand, A. & Rafieian-Kopaei, M. (2017). The Impact of Oxidative Stress on Testicular Function and the Role of Antioxidants in Improving it: A Review. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*, **11**, IE01–IE05.
- Atkinson, H.J. & Babbitt, P.C. (2009). Glutathione Transferases Are Structural and Functional Outliers in the Thioredoxin Fold. *Biochemistry*, **48**, 11108–11116.
- Aurino De Pinho, R., Araújo, M.C. De, Lima De Melo Ghisi, G. & Benetti, M. (2010). Coronary Heart Disease,

## Physical Exercise and Oxidative Stress.

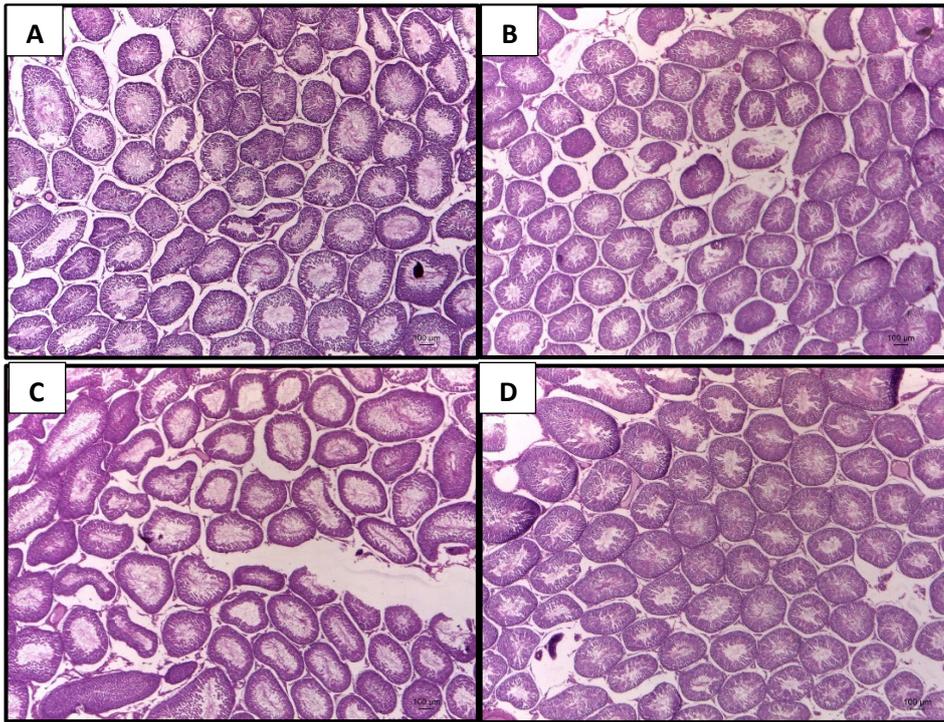
- Barrows, I.R., Ramezani, A. & Raj, D.S. (2019). Inflammation, Immunity, and Oxidative Stress in Hypertension—Partners in Crime? *Advances in Chronic Kidney Disease*, **26**, 122–130.
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Li, G., Rg, S., Gluud, C., Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L.L., Simonetti, R.G. & Gluud, C. (2012). Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases ( Review ) Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Trial*, 3–5.
- Bouza, M.A., Hammouda, O., Matran, R., Robin, S. & Fabre, C. (2015). Influence of physical fitness on antioxidant activity and malondialdehyde level in healthy older adults. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, **40**, 582–589.
- Carrara, I.M., Melo, G.P., Bernardes, S.S., Neto, F.S., Ramalho, L.N.Z., Marinello, P.C., Luiz, R.C., Cecchini, R. & Cecchini, A.L. (2019). Looking beyond the skin: Cutaneous and systemic oxidative stress in UVB-induced squamous cell carcinoma in hairless mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **195**, 17–26.
- Cepaityte, D., Leivaditis, K., Varouktsi, G., Roumeliotis, A., Roumeliotis, S. & Liakopoulos, V. (2023). N-Acetylcysteine: more than preventing contrast-induced nephropathy in uremic patients—focus on the antioxidant and anti-inflammatory properties. *International Urology and Nephrology*, **55**, 1481–1492.
- Ciftci, H., Verit, A., Savas, M., Yeni, E. & Erel, O. (2009). Effects of N-acetylcysteine on Semen Parameters and Oxidative/Antioxidant Status. *Urology*, **74**, 73–76.
- Colli, L.G., Belardin, L.B., Echem, C., Akamine, E.H., Antoniassi, M.P., Andretta, R.R., Mathias, L.S., Rodrigues, S.F. de P., Bertolla, R.P. & Carvalho, M.H.C. de. (2019). Systemic arterial hypertension leads to decreased semen quality and alterations in the testicular microcirculation in rats. *Scientific Reports*, **9**, 11047.
- Dybiec, J., Krzemińska, J., Radzioch, E., Szlagor, M., Wronka, M., Młynarska, E., Rysz, J. & Franczyk, B. (2023). Advances in the Pathogenesis and Treatment of Resistant Hypertension. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, 12911.
- Edelstein, N.Y. & Rey, R.A. (2019). Importance of the Androgen Receptor Signaling in Gene Transactivation and Transrepression for Pubertal Maturation of the Testis. *Cells*, **8**, 861.
- Grotto, D., Valentini, J., Boeira, S., Paniz, C., Maria, L.S., Vicentini, J., Moro, A., Charão, M., Garcia, S.C. & Cardoso, S.G. (2008). Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo: malondialdeído. *Química Nova*, **31**, 275–279.
- Guo, D., Li, S., Behr, B. & Eisenberg, M.L. (2017). Hypertension and Male Fertility. *The world journal of men's health*, **35**, 59–64.
- Jannatifar, R., Parivar, K., Roodbari, N.H. & Nasr-Esfahani, M.H. (2019). Effects of N-acetyl-cysteine supplementation on sperm quality, chromatin integrity and level of oxidative stress in infertile men. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **17**, 24.
- Keen, J.H., Habig, W.H. & Jakoby, W.B. (1976). Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, **251**, 6183–6188.
- Lerman, L.O., Kurtz, T.W., Touyz, R.M., Ellison, D.H., Chade, A.R., Crowley, S.D., Mattson, D.L., Mullins, J.J., Osborn, J., Eirin, A., Reckelhoff, J.F., Iadecola, C. & Coffman, T.M. (2019). Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension*, **73**.

- Malachias, M., Souza, W., Plavnik, F., Rodrigues, C., Brandão, A., Neves, M., Bortolotto, L., Franco, R., Figueiredo, C., Jardim, P., Amodeo, C., Barbosa, E., Koch, V., Gomes, M., Paula, R., Póvoa, R., Colombo, F., Ferreira Filho, S., Miranda, R., Machado, C., Nobre, F., Nogueira, A., Mion Júnior, D., Kaiser, S., Forjaz, C., Almeida, F., Martim, J., Sass, N., Drager, L., Muxfeldt, E., Bodanese, L., Feitosa, A., Malta, D., Fuchs, S., Magalhães, M., Oigman, W., Gomes, O., Pierin, A., Feitosa, G., Bortolotto, M., Magalhães, L., Silva, A., Ribeiro, J., Borelli, F., Gus, M., Passarelli Júnior, O., Toledo, J., Salles, G., Martins, L., Jardim, T., Guimarães, I., Antonello, I., Lima Júnior, E., Matsudo, V., Silva, G., Costa, L., Alessi, A., Scala, L., Coelho, E., Souza, D., Lopes, H., Gowdak, M., Cordeiro Júnior, A., Torloni, M., Klein, M., Nogueira, P., Lotaif, L., Rosito, G. & Moreno Júnior, H. (2016). Capítulo 1 - Conceituação, Epidemiologia e Prevenção Primária. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, **107**.
- Melincovici, C.S., Boşca, A.B., Şuşman, S., Mărginean, M., Mişu, C., Istrate, M., Moldovan, I.M., Roman, A.L. & Mişu, C.M. (2018). Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*, **59**, 455–467.
- Petry, É.R., Cruzat, V.F., Alvarenga, M.L. & Tirapegui, J.O. (2010). Exercise and oxidative stress: mechanisms and effects. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*, **18**, 90–99.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, **29**, e45.
- Porta, M. & Striglia, E. (2020). Intravitreal anti-VEGF agents and cardiovascular risk. *Internal and Emergency Medicine*, **15**, 199–210.
- Radak, Z., Taylor, A.W., Ohno, H. & Goto, S. (2001). Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exercise immunology review*, **7**, 90–107.
- Rahman, I., Kode, A. & Biswas, S.K. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, **1**, 3159–3165.
- Rivas, A.M., Pena, C., Kopel, J., Dennis, J.A. & Nugent, K. (2021). Hypertension and Hyperthyroidism: Association and Pathogenesis. *The American Journal of the Medical Sciences*, **361**, 3–7.
- Rogerio, M.M., Santos, L.S., Garcia, T.A., Ozaki, G.A.T., Fernandes, R.A., Castoldi, R.C., Louzada, M.J.Q., Okoshi, K. & Junqueira, A. (2019). Effects of concurrent training associated with N-acetylcysteine on bone density of spontaneously hypertensive rats. *Motriz: Revista de Educação Física*, **25**.
- Sceneay, J., Liu, M.C.P., Chen, A., Wong, C.S.F., Bowtell, D.D.L. & Möller, A. (2013). The Antioxidant N-Acetylcysteine Prevents HIF-1 Stabilization under Hypoxia In Vitro but Does Not Affect Tumorigenesis in Multiple Breast Cancer Models In Vivo. *PLoS ONE*, **8**, e66388.
- Showell, M.G., Brown, J., Yazdani, A., Stankiewicz, M.T. & Hart, R.J. (2011). Antioxidants for male subfertility. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews* (edited by M.G. Showell). P. CD007411. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Souza, A.C. de, Silva, D.G. da, Jezuino, J. da S., Ferreira, A.R.O., Ribeiro, M.V.G., Vidigal, C.B., Moura, K.F., Erthal, R.P., Mathias, P.C. de F., Fernandes, G.S.A., Palma-Rigo, K. & Ceravolo, G.S. (2023). Protein restriction during peripubertal period impairs endothelial aortic function in adult male Wistar rats. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 1–8.
- Stuttfield, E. & Ballmer-Hofer, K. (2009). Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life*, **61**, 915–922.
- Thirumalai, A. & Page, S.T. (2022). Androgens in male contraception. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **36**, 101627.

Vieira, K.C. de M.T., Fernandes, A.Á., Silva, K.M., Pereira, V.R., Pereira, D.R. & Favareto, A.P.A. (2019). Experimental exposure to gasohol impairs sperm quality with recognition of the classification pattern of exposure groups by machine learning algorithms. *Environmental Science and Pollution Research*, **26**, 3921–3931.



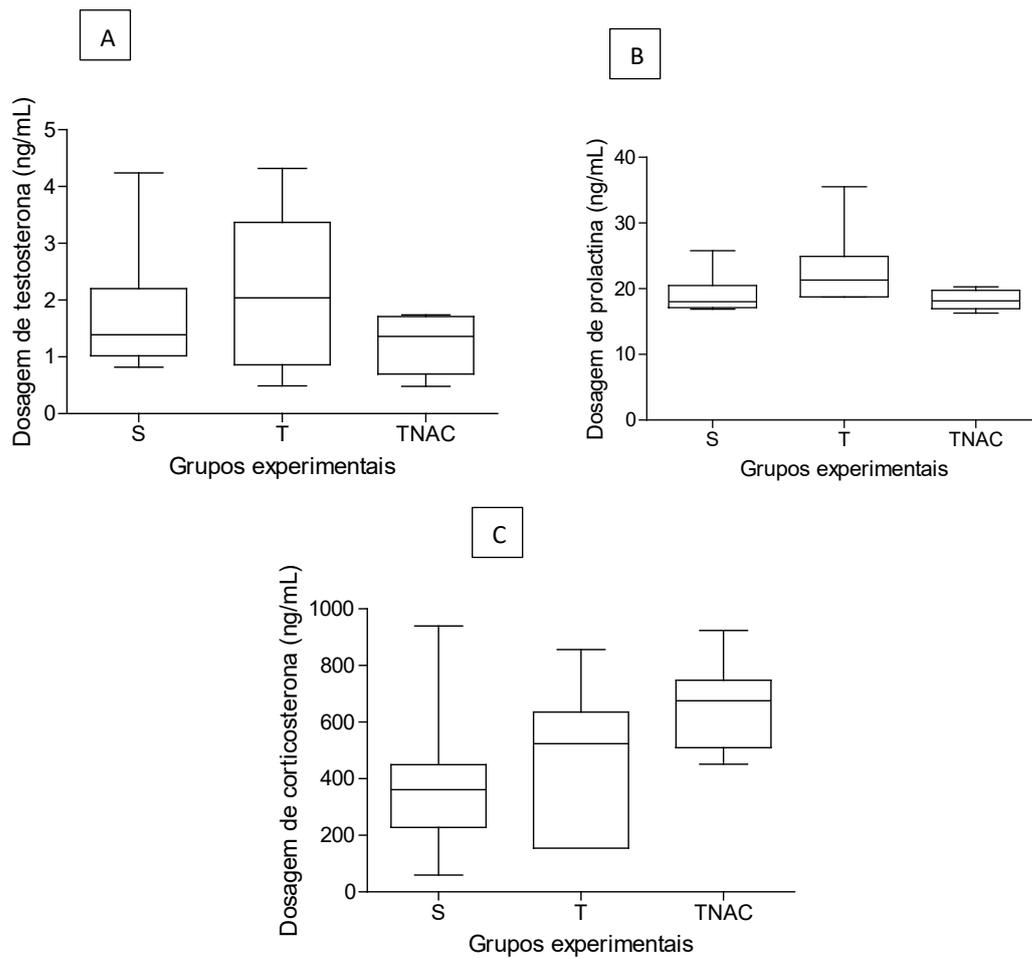
**Figura 1:** Treinamento concorrente (treinamento resistido de escalada seguido pelo treinamento aeróbico em esteira, três vezes/semana, por 8 semanas) nos grupos experimentais T (SHR submetidos ao treinamento concorrente) e TNAC (SHR submetidos ao treinamento concorrente e NAC).



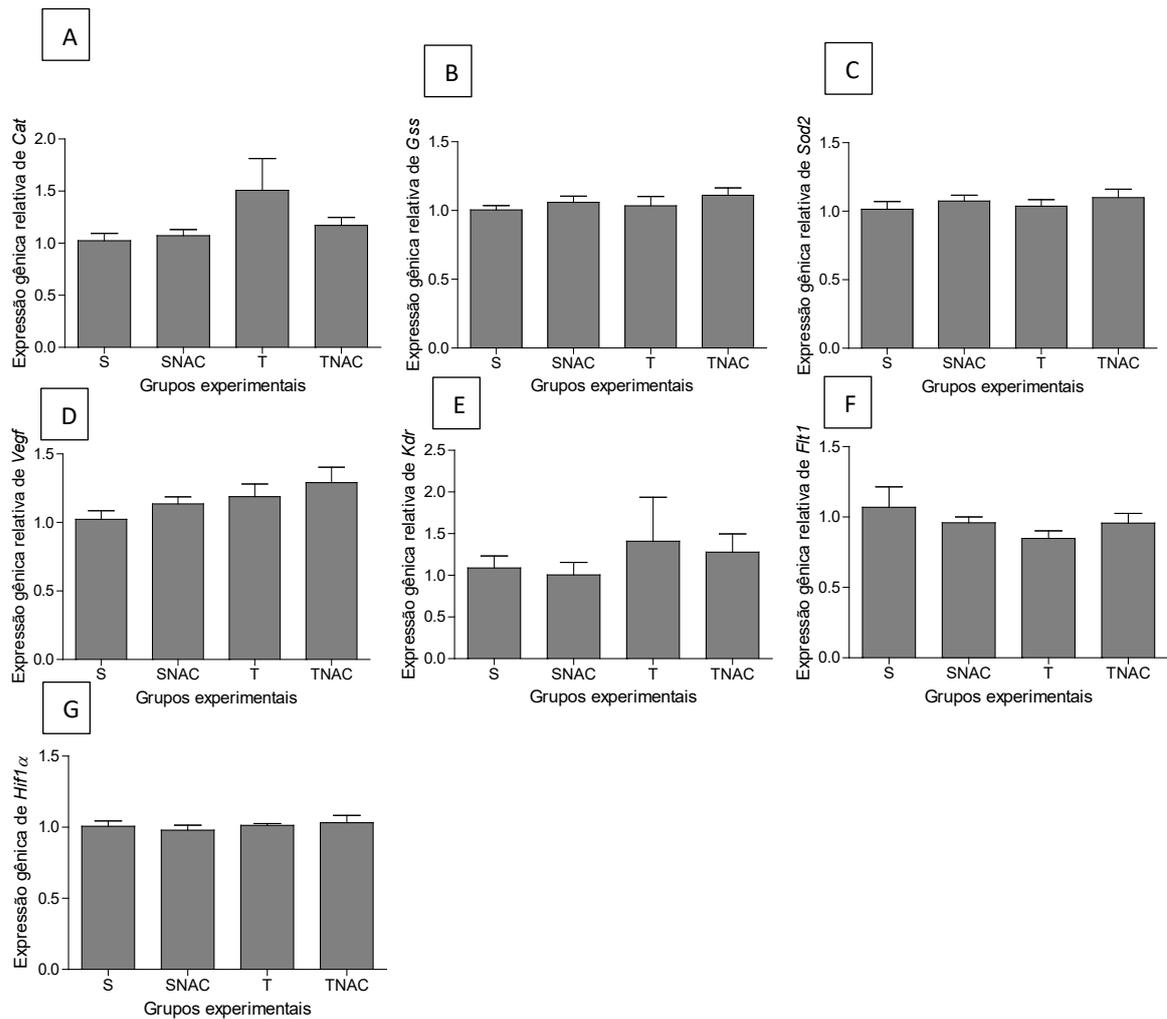
**Figura 2:** Lâminas dos túbulos seminíferos dos testículos de SHR coradas com hematoxilina-eosina em aumento de 40x. A – S (grupo controle sedentário); B – SNAC (grupo de SHR sedentário que receberam NAC diariamente); C – T (grupo de SHR submetidos ao treinamento concorrente de esteira e escalada, três vezes/semana); e D - TNAC (grupo de SHR submetidos ao treinamento concorrente e NAC).

**Tabela 1:** Média  $\pm$  erros padrões da média dos pesos corporais (g) e dos pesos dos testículos, epidídimos, ductos deferentes (mg); da morfologia espermática (porcentagem de espermatozoides com defeito de cauda, defeito de cabeça e sem defeitos); e da morfometria testicular (diâmetros do túbulo seminífero, do lúmen do túbulo e do epitélio germinativo) dos SHR dos seguintes grupos experimentais (n=12): S (controle sedentários); SNAC (SHR sedentários que receberam NAC diariamente); T (SHR submetidos ao treinamento concorrente de esteira e escalada, três vezes/semana); e TNAC (grupo de SHR submetidos ao treinamento concorrente e NAC). Não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais ( $P>0,05$ ), two-way ANOVA.

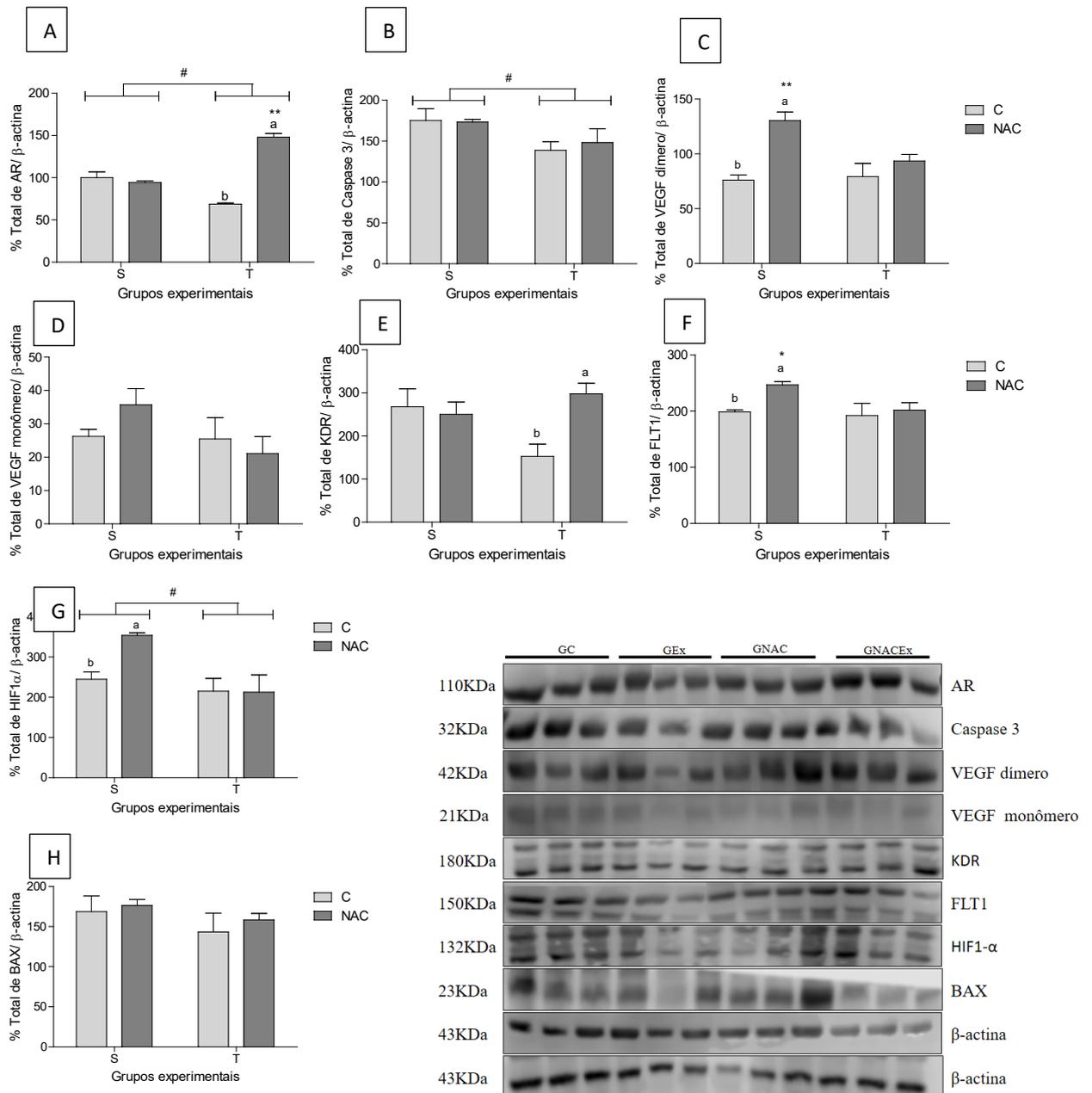
	Grupos Experimentais			
	S	SNAC	T	TNAC
<b>Pesos</b>				
Corporais (g)	373,10 $\pm$ 4,67	375,51 $\pm$ 4,92	369,71 $\pm$ 5,75	365,05 $\pm$ 7,95
Testículos (mg)	1650,68 $\pm$ 67,44	1638,93 $\pm$ 15,17	1677,57 $\pm$ 17,22	1664,58 $\pm$ 31,14
Epidídimos (mg)	637,67 $\pm$ 16,66	624,08 $\pm$ 13,75	615,11 $\pm$ 11,36	648,38 $\pm$ 15,16
Ductos deferentes (mg)	126,83 $\pm$ 9,30	187,42 $\pm$ 69,45	119,33 $\pm$ 4,41	129,75 $\pm$ 4,49
<b>Espermatozoides (%)</b>				
Defeito de cauda	2,73 $\pm$ 0,85	1,41 $\pm$ 0,42	2,05 $\pm$ 0,50	0,91 $\pm$ 0,22
Defeito de cabeça	7,27 $\pm$ 1,13	7,50 $\pm$ 0,68	4,91 $\pm$ 0,57	4,86 $\pm$ 0,41
Sem defeitos	85,95 $\pm$ 4,58	91,09 $\pm$ 0,94	93,09 $\pm$ 0,79	94,18 $\pm$ 0,51
<b>Áreas (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>				
Túbulo seminífero	64621,11 $\pm$ 2941,26	65374,41 $\pm$ 2569,89	65760,24 $\pm$ 2509,89	61074,48 $\pm$ 1739,00
Lúmen do túbulo	12462,24 $\pm$ 2266,41	10616,43 $\pm$ 951,02	11809,89 $\pm$ 746,33	9518,70 $\pm$ 738,86
Epitélio germinativo	52158,87 $\pm$ 890,71	54757,98 $\pm$ 1792,51	53950,34 $\pm$ 1995,36	51555,77 $\pm$ 1596,17



**Figura 3:** Dosagens de testosterona (A), prolactina (B) e corticosterona (C) plasmáticas em SHR dos seguintes grupos experimentais (n=7): S (controle sedentário); T (SHR submetidos ao treinamento concorrente de esteira e escalada, três vezes/semana); e TNAC (grupo de SHR submetidos ao treinamento concorrente e NAC). Não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ), Kruskal-Wallis.

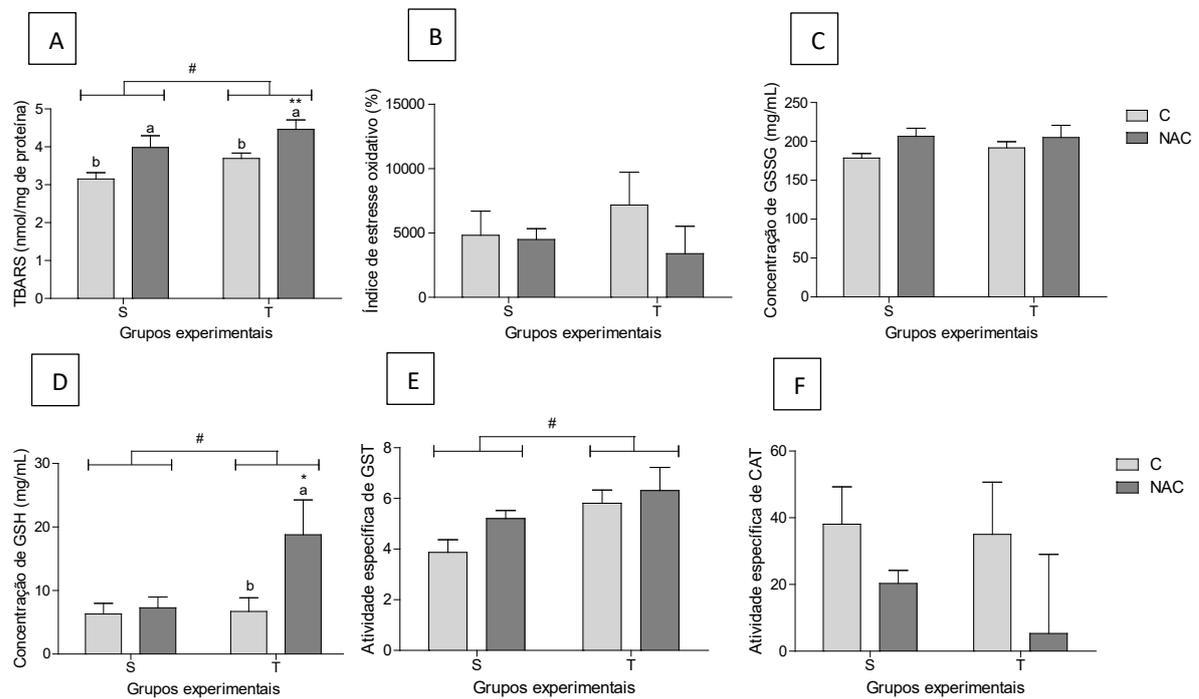


**Figura 4:** Expressão gênica relativa de *Cat* (A), *Gss* (B), *Sod2* (C), *Vegf* (D), *Kdr* (E), *Flt1* (F) e *Hif1 $\alpha$*  (G) nos testículos de SHR dos seguintes grupos experimentais (n=12): S (controle sedentário); SNAC (SHR sedentários que receberam NAC diariamente); T (SHR submetidos ao treinamento concorrente de esteira e escalada, três vezes/semana); e TNAC (grupo de SHR submetidos ao treinamento concorrente e NAC). O gene referência utilizado para normalizar a reação foi o *Hprt1*. Não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais, nem interação entre os grupos ( $P > 0,05$ ), two-way ANOVA.



**Figura 5:** Western Blotting das proteínas AR (gráfico A), Caspase 3 (gráfico B), dímero de VEGF (gráfico C), monômero de VEGF (gráfico D), KDR (gráfico E), FLT1 (gráfico F), HIF1 $\alpha$  (gráfico G) e BAX (gráfico H) nos testículos de SHR dos seguintes grupos experimentais (n=4): S (controle sedentário); SNAC (SHR sedentários que receberam NAC diariamente); T (SHR submetidos ao treinamento concorrente de esteira e escalada, três vezes/semana); e TNAC (grupo de SHR submetidos ao treinamento concorrente e NAC). Todas as proteínas foram normalizadas pela  $\beta$ -actina. As letras (a/b) diferentes representam diferenças significativas em relação à suplementação com NAC, entre grupos que receberam NAC (NAC) e os que não receberam (C) dentro dos grupos S e T separadamente ( $P < 0,05$ ). \* Indicam diferenças significativas entre a suplementação de NAC, C x NAC, independente dos grupos S e T ( $P < 0,05$ ). # Indicam diferença estatística significativa em relação ao treinamento, sedentário (S) x treinado (T), independente da suplementação com NAC ( $P < 0,05$ ). Two-way ANOVA e Bonferroni. Interação entre o treinamento e a suplementação com NAC foi observada para AR

( $P < 0,0001$ ), dímero de VEGF ( $P = 0,0290$ ) e KDR ( $P = 0,0235$ ).



**Figura 6:** Média  $\pm$  erro padrão da média do estresse oxidativo: TBARS - quantidade de MDA (A); Índice de estresse oxidativo (B); GSSG (C); GSH (D); as atividades específicas das enzimas GST (E); CAT (F) em testículos de SHR dos seguintes grupos experimentais ( $n=12$ ): S (controle sedentário); SNAC (SHR sedentários que receberam NAC diariamente); T (SHR submetidos ao treinamento concorrente de esteira e escalada, três vezes/semana); e TNAC (grupo de SHR submetidos ao treinamento concorrente e NAC). As letras (a/b) diferentes representam diferenças significativas em relação à suplementação com NAC, entre grupos que receberam NAC (NAC) e os que não receberam (C) dentro dos grupos S e T separadamente ( $P < 0,05$ ). \* Indicam diferenças significativas entre a suplementação de NAC, C x NAC, independente dos grupos S e T ( $P < 0,05$ ). # Indicam diferença estatística significativa em relação ao treinamento, sedentário (S) x treinado (T), independente da suplementação com NAC ( $P < 0,05$ ). Two-way ANOVA e Bonferroni.

## ANEXO I – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO CEUA

### UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PIBIC - Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

### Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "Expressão de genes associados ao estresse oxidativo nos testículos de ratos espontaneamente hipertensos suplementados com N-acetilcisteína e submetidos ao exercício concorrente", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o nº 8064 e tendo como participante(s) SAMARA CRISTINA CARVALHO LUIZ (discente), ISADORA MARAFON DOS SANTOS (discente bolsista), LAUREN CHRYS SOATO MARIN (discente), ALINE DE OLIVEIRA SANTOS (discente), MAYARA DE OLIVEIRA VIDOTTO FIGUEIREDO (técnico), ADRIANA JUNQUEIRA (docente colaborador), INES CRISTINA GIOMETTI CEDA (docente responsável), foi avaliado e Apr. com recomendação por avaliadores ad hoc externos e pelo Comitê Assessor de Pesquisa Institucional (CAPI), Comissão de Ética Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

O Termo de Concessão e Aceitação foi registrado no CNPq pelo número de processo 124605/2023-0

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 14/06/2023 00:00:00.

#### MATERIAL ARMAZENADO/DOADO COM ORIGEM EM PESQUISA

Protocolo(s)	Data Aprovação	Armazenado (local)	É doação	Detalhes armazenamento
5309	10/04/2019 00:00:00	Unoeste	NÃO	freezer a -80C, Laboratório de Genética Molecular, Bloco Q, UNOESTE

Presidente Prudente, quarta-feira, 5 de junho de 2024.

Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.  
Docente Responsável pela CPDI

Prof. Dr. Felipe Rydygier de Ruedige  
Coordenador da CEUA - UNOESTE

## ANEXO II – NORMAS DA REVISTA MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION

### Original research Articles

\*\*\*\*\*

#### Format free submission:

MHR will accept initial submissions in any format, as long as it contains the core elements of a full article: a title, authors' affiliation, abstract, introduction, materials and methods, results and discussion (results and discussion can be combined), bibliography, figures with legends and tables.

Following favourable first review, authors would then be expected to reformat their manuscript prior to full acceptance, according to the detailed style of the journal.

\*\*\*\*\*

### Structure

---

*(listed in order of appearance in the published manuscript)*

#### 1. Title Page

*Title.* The title should not exceed 25 words and should be specific and informative. Trademarks, proprietary terms and any abbreviations are not allowed in the title.

*Running Title.* The running title should not exceed 50 characters.

*Authors.* Initials and family name of all authors should be given. A superscript identifier and footnote declaring joint first authorship is allowed. The joint first authors should be the first names in the list of authors. A footnote containing the statement: "These authors contributed equally to this work" should be added.

*Authors and Affiliations.* The department, institution, city and country should be given with post code for each author. An email address will be published for the corresponding author who should be clearly identified with an asterisk. Current addresses should be provided for all authors. ORCID ID will be published for each author that has one.

Note: Changes to authorship (order or addition or removal of an author) after initial submission must be agreed by all authors in writing with signatures provided.

#### 2. Abstract

The limit is 300 words. The abstract should be clearly structured. The first few sentences need to include essential background information on the topic and go on to state the research question being addressed in the present article. Essential methodology should be outlined, especially stating what species was being studied. The main research findings need to be summarised. Authors should conclude their Abstract with some reflection as to the limitations of the study or where to next. The wider implications of the findings also need to be clearly articulated.

The abstract should not contain subheadings, referencing and any abbreviations.

### 3. Key words

Up to ten key words must be supplied. They should be specific and relevant to the paper.

### 4. Introduction

Should be limited to the specific background necessary to show the importance and context of the current study. The objective of the study should be clearly stated in the final paragraph of the Introduction.

### 5. Materials and methods

Subheadings should be used. The names of all suppliers, and their country of origin, should be included.

*Animals and human studies.* Studies involving animals should be reported according to the [ARRIVE](#) (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments) guidelines. The relevant ethical review permissions, relevant licences (e.g. Animal [Scientific Procedures] Act 1986), and national or institutional guidelines for the care and use of animals must be stated. Studies involving human material should have appropriate ethical approval and, where relevant, the patients' written informed consent. For any paper that has used humans/animals, there must be an "ethics statement" in the Materials and Methods (first subheading) that details the appropriate approvals/licences.

*Statistics.* Where appropriate there must be a subheading describing the statistical analyses. The statistical tests used must be identified unambiguously e.g. t-test with one or two tails, linear correlation in the parametric (Pearson) or non-parametric (Spearman) method. P values should be given in full e.g.  $p=0.0006$  instead of  $p<0.05$ . The number of replicates, whether technical or biological, must be given. Where appropriate, authors should seek advice from a professional statistician before the manuscript is submitted.

*Antibodies.* These should be accompanied by a proof of specificity if non-commercially available (e.g. western blot and/or immunocytochemistry on panel of multiple tissues), or by a catalogue/lot number and by references, if the antibody is commercially available.

*Cell lines.* Unless cell lines are directly acquired from certified sources (e.g. ATCC and other official repositories) for the purpose of the study, verification of the identity of the cell lines used in experiments (confirming that cell lines are derived from the correct species and donor, and that they are contamination-free) is required. In addition, evidence must be provided to show that the molecular pathways the cell line is supposed to model are indeed present and active. Authors should include this evidence in the Supplementary Information (as supplementary figures).

*Large Scale Data.* Authors must supply 'omics' data processed (not raw) data as Supplementary material at the time of submission, in the compact form of e.g. a .csv, .txt or Excel file. By 'processed data' we mean the final, user-ready, normalized results as opposed to the raw data. Transcriptomics i.e. microarray or RNA sequencing data must also be submitted to the GEO, SRA, ArrayExpress or equivalent databases, with accession numbers, by or at the time of submission. Proteomics data i.e. mass

spectrometry data must also be submitted to the PRIDE Archive via ProteomeXchange, or equivalent databases, with accession numbers, by or at the time of submission.

## 6. Results

Subheadings should be used for different sections.

Reference figures in the text in the order they appear and use the notation Figure 1, Figure 2 etc in parenthesis. Figures may contain multiple parts, and are labelled a, b, c and so on. Authors are encouraged to use Supplementary data for figures that are confirmatory (e.g. showing full lane Western blots that may be cropped in the main Figure) or that contain a larger dataset than that displayed in the main Figure.

## 7. Discussion

The discussion should begin with a succinct statement of the principal findings, outlining the strengths and weaknesses of the study, discussing the findings in relation to other studies and the wider relevance of the findings, provide possible explanations and indicate questions which remain to be answered in future research.

## 8. Data Availability statement

A Data Availability Statements is required, providing a standardised format for readers to understand the availability of data underlying the research results described in the article. The statement may refer to original data generated in the course of the study or to third-party data analysed in the article. The statement should describe and provide means of access, where possible, by linking to the data or providing the required unique identifier.

## 9. Acknowledgements

Personal acknowledgements should precede those of institutions or agencies.

## 10. Authors' roles

Manuscripts must include details for the contributions of each of the authors, including participation in study design, execution, analysis, manuscript drafting and critical discussion. Signatures from each author should agree to their inclusion in the list of authors in order of appearance on the manuscript and to a brief description of each author's role in the study. MHR adheres strictly to the [International Committee of Medical Journal Editors \(ICMJE\) guidelines regarding 'Authorship and Contributorship'](#). All authors must indicate their individual contribution to the paper. Justification of authorship includes:

1. substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data;
2. drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and
3. final approval of the version to be published; and
4. agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

All authors must meet contributions (1), (2), (3) and (4).

### 11. Funding

Fully declare all funding and sponsorship, and the roles played by sponsors in the research as well as institutional affiliations and relevant financial ties. These should be listed in the manuscript in the Funding section. Grant numbers should be given. Where no specific funding was sought for the study, and departmental funds were used to support the authors throughout the study period and manuscript preparation, this should be acknowledged, giving department names.

### 12. Conflict of interest

Authors should include a conflict of interest statement on the manuscript detailing any potential conflicts of interest of any of the authors due to relationships with commercial/corporate interests, or stating that they have none to declare. Please refer to the section 'To accompany a manuscript at submission' for more details regarding conflicts of interest.

### 13. Reference citations within the text

Each reference should be cited by author and date. If there are two authors please list both, if more than two please use first author then et al. Permission to cite personal communications (J. Smith, personal communication) should be obtained by the corresponding author. Unpublished data should be cited as '(unpublished data)' and should not be included in the reference list. Either of the above should be used only when essential.

References to papers accepted for publication, but not yet published, should be cited as such in the reference list e.g. Smith A (2018) In-vitro fertilization. *Mol Hum Reprod.* In press.

### 14. Reference list

References should be listed alphabetically. Please use the following style. Note that correct punctuation and journal abbreviations must be used in order to run the search programs used to edit the manuscript. Incorrectly typed references take a lot of time to correct, for which we reserve the right to charge. Up to 10 authors should be included after which et al. should be used. Refer to the following examples.

Authors. Title. *Journal.* Date; issue: pg-pg

Boiani M, Cibelli JB. What we can learn from single-cell analysis in development. *Mol Hum Reprod.* 2016; 22(6): 160-171

Wang Y, Lumbers ER, Arthurs AL, Corbisier de Meaultsart C, Mathe A, Avery-Kiejda KA, Roberts CT, Pipkin FB, Marques FZ, Morris BJ et al. Regulation of the human placental (pro)renin receptor-prorenin-angiotensin system by microRNAs. *Mol Hum Reprod.* 2018; 24(9):453-464.

Elliot WH, Elliot DC. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2nd edn, 2001. Oxford University Press, Oxford, UK.

### *15. Tables*

Tables should be uploaded as a separate document in an editable format.

Each table should be numbered consecutively with Arabic numerals. Please avoid complex constructions. Each item of data should be in a separate cell and should be produced using Word or Excel format. Each table should be self-explanatory and include a brief descriptive title. Footnotes to the table indicated by superscript lowercase letters are acceptable but should not include extensive experimental detail. Reference to the tables in the text should be sequential (i.e. Table 1, 2 etc).

Do not include more tables than is absolutely necessary - non-essential tables may be judged as being suitable for online-only publication.

### *16. Figure legends*

Each legend must be self-contained, with all symbols and abbreviations used in the figure defined.

### *17. Figures*

Figures should be uploaded as a separate file (or files) as .jpg or .tif files.

Full instructions on preparing the figures are available as part of the online submission instructions. Please follow these instructions carefully as failure to do so will delay publication of your manuscript (please note: the editors reserve the right to charge for extensive changes).

In preparing graphs authors should avoid background tints and 3D effects and maintain a consistent label size and aspect ratio (the x/y axis ratio) throughout a paper. Figure and axes titles should be clear and NOT in bold text. Do not include more figures than is absolutely necessary - non-essential figures may be judged as being suitable for online-only publication.

### *18. Graphical Abstract*

Graphical abstracts are optional in MHR articles.

In addition to the text abstract, authors can choose to submit a graphical abstract (a concise and visually engaging image that clearly represents the article). The graphical abstract should be provided as a separate file, in addition to the main manuscript text file (please select the file-type designation 'Graphical Abstract' in the online system during the submission process). The graphical abstract file should be clearly named (e.g., graphical\_abstract.tif). It will be peer reviewed alongside the manuscript and revisions may be requested. If accepted for publication, the graphical abstract will be published within the article (beneath the text abstract) and will also be included in the journal issue's Table of Contents. In addition, graphical abstracts from published articles may be shared on the journal's social media platforms.

The graphical abstract should be self-explanatory and easy for readers to follow (with a clear sequence and makes logical sense without needing to read the article title or accompanying short legend). It should consist of a single-panel image that has been created by the authors for the purpose of the article (i.e. is entirely original) and is distinct from any figure already provided in the article. Text should be used sparingly throughout, ensuring that the style is consistent with that used in the title and body of the article. Please avoid using overly technical language and try to avoid abbreviations where possible (except for gene symbols and well-established reproductive terminology e.g., ART, FSH, hCG, IVF, LH, PCOS). A very short legend / title for the graphical abstract should also be provided (around 25 words in length); this should be placed in the main manuscript text file (after the figure legends). All abbreviations included within the graphical abstract should also be defined within this.

The formatting requirements for graphical abstracts are as follows:

- Size: 12.5 cm x 18.0 cm (height x width);
- The use of colour is encouraged;
- the minimum resolution is 300dpi (the dpi of an image can be found by right-clicking the image file and selecting 'Properties');
- Use text sparingly, mainly for labels; text should be 10–12 points, but no smaller than 8 points.

#### *19. Videos*

MHR publishes videos that are playable within the online article with a still image of the video appearing in the PDF version. A maximum of 3 videos can be displayed inline; additional videos should be included as supplementary material.

Videos should be succinct with a maximum length of 2 minutes. They should demonstrate a specific feature described in the text of the manuscript. Any personally identifying elements must be removed from videos prior to submission. Videos will be peer reviewed; the Editors reserve the right to request video editing or to redesignate them as supplementary data. Videos should be submitted as MP4 or AVI files with the highest resolution possible and should be labelled with Arabic numerals (i.e. Video 1, Video 2 etc.). All videos should have an accompanying short title and legend; this information should be included in the main manuscript immediately after the figure legends. Videos must be cited in the main article text in numerical order. Each video must be accompanied by a still jpeg image to be used in the print/PDF article; stills should be labelled as Video Still 1, Video Still 2 etc.

#### *20. Supplementary data*

Data that support but which are not essential to the main body of the paper should be incorporated into 'Supplementary Information' (SI). These data are reviewed in the same way as all other data appearing in the main body and will be published alongside articles accepted for publication by the journal. Please note that any cropped or partial blot or gel (e.g., agarose gels, western blots, etc) in the main manuscript must be displayed in full within the Supplementary Information.

Supplementary material can include videos, figures and tables ONLY. Large files (10Mb or greater) or files needing non-standard software to run will not be accepted. Large datasets should be submitted to a suitable online repository, the data identifier should be provided in the manuscript, and should be made accessible for review (e.g. reviewer-access token). If no specialized repository is available, then data supplements can be deposited in a generalist repository with assigned DOI (e.g. Figshare).

All SI, including video titles and their legends and links to repositories, should be combined into a single PDF file. Exceptions to this are video files, which are submitted individually, and any large tables, which should be submitted as separate Microsoft Excel files. Tables containing details of oligonucleotide primers, antibodies or strains may be provided as part of the single PDF file.

Begin your PDF with a Contents Page that lists all the titles of the figures and tables contained within the PDF, then any video titles for videos submitted and table titles for any separately submitted Microsoft Excel files. This contents page at its very top must contain the full list of authors and the title of the manuscript.

Following the contents page of SI, include each individual figure or table with its associated legend for figures or title for tables. Therefore, subsequent pages contain sequential figures and tables (Supplementary Fig S1, Supplementary Fig S2, Supplementary Fig S3, Supplementary Table S1, Supplementary Table S2 and so on). For each Supplementary Figure, include a Figure legend on the same page (below the figure). For each Supplementary Table, include a title on the same page (above the table). It is important to have a legend for each figure and a title for each table. Do not compose supplementary figures that span more than one side of paper.

Each supplementary Figure, Table or Video must be cited at the appropriate point in the main body of text.

Please note that supplementary data files are not edited by the journal and should be formatted in the same style as the journal.

#### *20. Additional material to accompany the submission*

- ARRIVE [checklist](#) (for research using animals)
- Covering letter

Most Read	Most Cited
<p>Cellular senescence of granulosa cells in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome</p> <hr/>	
<p><i>In vivo</i> effect of vaginal seminal plasma application on the human endometrial transcriptome: a randomized controlled trial</p> <hr/>	
<p>Preconception paternal alcohol exposure decreases IVF embryo survival and pregnancy success rates in a mouse model</p> <hr/>	
<p>Maternal age and gonadotrophin elevation cooperatively decrease viable ovulated oocytes and increase ootoxicity, chromosome-, and spindle-misalignments: '2-Hit' and 'FSH-OoToxicity' mechanisms as new reproductive aging hypotheses</p> <hr/>	
<p>Paxillin regulates androgen receptor expression associated with granulosa cell focal adhesions</p>	