



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Gustavo Ruschi Bechara

**Avaliação da morfologia testicular e dos parâmetros espermáticos
em ratos espontaneamente hipertensos e tratados com enalapril**

Rio de Janeiro

2012

Gustavo Ruschi Bechara

**Avaliação da morfologia testicular e dos parâmetros espermáticos em ratos
espontaneamente hipertensos e tratados com enalapril**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Coorientador: Dr. Diogo Benchimol de Souza

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB/A

B391 Bechara, Gustavo Ruschi.
Avaliação da morfologia testicular e dos parâmetros espermáticos
em ratos espontaneamente hipertensos e tratados com enalapril /
Gustavo Ruschi Bechara – 2012.
67 f.

Orientador: Francisco José Barcellos Sampaio
Coorientador: Diogo Benchimol de Souza
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em
Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Hipertensão – Modelos animais - Teses. 2. Espermatogênese
– Teses. 3. Testículos – Teses. 4. Agentes hipotensores – Teses. I.
Sampaio, Francisco José Barcellos. II. Souza, Diogo Benchimol de.
II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências
Médicas. III. Título.

CDU 616.12:611.631

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou
parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Gustavo Ruschi Bechara

**Avaliação da morfologia testicular e dos parâmetros espermáticos em ratos
espontaneamente hipertensos e tratados com enalapril**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital

Aprovada em 19 de dezembro de 2012.

Coorientador:

Diogo Benchimol de Souza

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio (Orientador)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. André Guilherme Cavalcanti
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Bianca Martins Gregório
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Rio de Janeiro
2012

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, José Antônio e Aparecida, exemplos de amor incondicional, que acreditaram em meus sonhos e ajudaram a torná-los possíveis. A minha irmã Alexandra, pela amizade e incentivo constantes. Amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a DEUS, a quem ofereço todas as minhas conquistas, por ter me dado força e perseverança para conseguir alcançar os meus objetivos.

Ao Prof. Dr. Francisco J. B. Sampaio, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas – Área de Concentração Urogenital – da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, agradeço pela dedicada orientação e acolhida em seu serviço, pela oportunidade de ter participado de sessões do mais alto nível científico ao longo desse período de convivência, tendo sido fundamental para a finalização deste trabalho.

Ao Dr. Diogo Benchimol De Souza, meu co-orientador, pelo empenho nas diversas revisões deste trabalho e compreensão a mim dispensadas durante a execução do mesmo, pela total disponibilidade de tempo sempre que necessário, pelos artigos cedidos, de importância fundamental para execução desta pesquisa e pelo estímulo para prosseguir nos momentos mais difíceis.

Ao corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pelos ensinamentos recebidos.

Aos demais colegas da Unidade Urogenital, pelo carinho com que fui recebido e orientado. Que eu possa dar continuidade a esse trabalho, com a mesma dedicação e espírito de união que aqui aprendi.

Aos colegas urologistas do Hospital da Lagoa e do Instituto Nacional do Câncer, pelos conhecimentos transmitidos e confiança em mim depositada e pelo apoio e incentivo na realização deste programa de pós-graduação.

Aos amigos Dr. Hélio Assunção Gouveia e Dr. José Anacleto Dutra de Resende Júnior, que acreditaram em mim, diante da minha determinação profissional e nos estudos.

Aos residentes do Serviço de Urologia do Hospital da Lagoa e Instituto Nacional do Câncer, pela presença diária e amizade que me remetiam a um ambiente familiar.

Aos meus pais José Antônio e Aparecida, pelo estímulo ao estudo desde os primeiros anos de vida escolar, pelos exemplos de caráter, perseverança e

humildade que sempre me transmitiram com todo amor e carinho ao longo de minha vida. Devo o que sou a vocês.

A minha irmã Alexandra e cunhado Felipe pelo ombro amigo nos momentos de saudades e dificuldades, pelo carinho e motivação.

Aos meus tios e amigos Alexandre e Margareth, que como médicos, sempre se dispuseram a conversar, trocar experiências e orientar minhas decisões profissionais. Estou muito feliz em poder dividir esse momento com vocês.

A família e amigos, agradeço pelo apoio e torcida, pelo companheirismo e atenção a mim dedicados.

A Carol, pela amável convivência e pela compreensão nos momentos de ausência.

Agradeço também, a todos aqueles que de forma direta ou indireta, contribuíram para que este trabalho tenha sido realizado.

Desejo externar os meus agradecimentos a todos, lembrando que na vida não caminhamos sozinhos.

A vida é a manutenção de um estado de equilíbrio permanentemente ameaçado.

Jules Bordet

RESUMO

BECHARA, Gustavo Ruschi. *Avaliação da morfologia testicular e dos parâmetros espermáticos em ratos espontaneamente hipertensos e tratados com enalapril*. 2012. 67 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um problema de saúde pública, geralmente associada a outras doenças, como obesidade, diabetes, doença renal, aterosclerose, acidente vascular cerebral (AVC) e identificado como um dos fatores de risco mais prevalentes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Órgãos-alvo, como coração, rins, cérebro e olhos, são comumente afetados em pacientes hipertensos. No entanto, o dano testicular causado pela hipertensão não foi claramente definido. A hipertensão é um fator de risco bem estabelecido para a disfunção erétil, mas sua relação com o dano testicular e a fertilidade masculina não é claramente compreendida. Este estudo avalia a morfologia testicular e alguns parâmetros espermáticos de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), virgem de tratamento e tratados com enalapril. Ratos SHR foram distribuídos em dois grupos, um grupo hipertenso (H), e um grupo tratado com enalapril (HE). Ratos Wistar-Kyoto (WKY) foram utilizados como controles. A pressão arterial sistólica foi medida semanalmente, até o final do experimento. A concentração de espermatozóides, motilidade e viabilidade foram determinadas em amostras coletadas da cauda do epidídimo. Métodos estereológicos foram usados para analisar objetivamente a morfologia testicular macroscopicamente e microscopicamente. Todos os dados foram analisados por ANOVA com pós-teste de Tukey, considerando $p < 0,05$. Ao final do experimento a pressão arterial sistólica no grupo HE ($153,9 \text{ mmHg} \pm 21,03$) foi semelhante a dos animais pertencentes ao grupo WKY ($153,4 \pm 24,41$) e menor que a dos animais H ($205,1 \pm 24,9$). A concentração espermática do grupo H ($1,31 \times 10^7 \text{ spz/ml} \pm 0,27$) foi inferior à do grupo WKY ($2,11 \times 10^7 \text{ spz/ml} \pm 0,34$), entretanto o controle da pressão arterial com o enalapril melhorou este parâmetro e a concentração espermática do grupo HE ($2,46 \times 10^7 \text{ spz/ml} \pm 0,54$) foi semelhante a do WKY. A densidade volumétrica vascular também foi alterada no grupo de hipertensos, enquanto que os animais do grupo HE foram semelhantes aos controles. O epitélio seminífero dos animais HE apresentou a maior densidade volumétrica, indicando um possível efeito protetor indireto do enalapril na espermatogênese. Neste modelo animal, a HAS promoveu alterações morfológicas no testículo, com consequências sobre a produção de espermatozóides. O controle da pressão arterial com o enalapril protegeu o testículo destas alterações, restabelecendo a produção normal dos espermatozóides.

Palavras-chave: Hipertensão. Ratos espontaneamente hipertensos. Testículo. Espermatogênese. Enalapril.

ABSTRACT

Hypertension is a major public health problem, usually associated with other disorders such as obesity, diabetes, kidney disease, atherosclerosis, stroke and identified as one of the most prevalent risk factors for developing cardiovascular diseases. Target organs, such as heart, kidney, brain and eyes, are very commonly affected in hypertensive patients. However the testicular damage caused by hypertension has not been clearly defined. Hypertension is a well-established risk factor for erectile dysfunction, but its relation to testicular damage and male fertility is not clearly understood. This study evaluates the testicular morphology and some spermatozoid parameters of spontaneously hypertensive rats (SHR) untreated and treated with enalapril. SHR rats were assigned into two groups, a hypertensive group (H), and an enalapril treated group (HE). Wistar-Kyoto rats (WKY) were used as controls. Systolic blood pressure was measured weekly until at the end of the experiment. The spermatozoid concentration, motility and viability were determined in epididimal tail collected sample. Stereological methods were used to analyze testicular morphology macroscopically and microscopically. Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's post test, considering $p < 0.05$. At the end of the experiment systolic blood pressure in the HE group ($153,9 \text{ mmHg} \pm 21,03$) was similar to WKY animals ($153,4 \pm 24,41$), and lower than H animals ($205,1 \pm 24,9$). Sperm concentration of the H group ($1,31 \times 10^7 \text{ sptz/ml} \pm 0,27$) was lower than WKY group ($2,11 \times 10^7 \text{ sptz/ml} \pm 0,34$). The blood pressure control with enalapril improved this parameter and HE group ($2,46 \times 10^7 \text{ sptz/ml} \pm 0,54$) was similar to WKY. Testicular vascular volumetric density was also higher in hypertensive group while HE animals were similar to controls. The seminiferous epithelium of HE animals showed the highest volumetric density, indicating a possible positive indirect effect of enalapril in spermatogenesis. In this animal model, hypertension promoted morphological changes in the testicle with consequences on spermatozoid production. The blood pressure control with enalapril protected the testicle from these alterations, restoring normal spermatozoid production.

Keywords: Hypertension. Spontaneously Hypertensive Rats. Testis. Spermatogenesis. Enalapril.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo dos grupos em estudo.....	19
Figura 2 - Esquema representativo da aferição da pressão arterial.....	20
Figura 3 - Determinação do número total de espermatozóides.....	21
Figura 4 - Determinação do número de espermatozoides viáveis através do teste hipo-osmótico.....	22
Figura 5 - Determinação do diâmetro do túbulo seminífero.....	24
Figura 6 - Determinação da altura do epitélio do túbulo seminífero.....	25
Figura 7 - Determinação da densidade das diferentes estruturas do túbulo seminífero.....	26
Figura 8 - Medida da pressão arterial no início do experimento dos rato pertencentes aos diferentes grupos.....	28
Figura 9 - Medida da pressão arterial no final do experimento dos ratos pertencentes aos diferentes grupos.....	29
Figura 10 - Medida da pressão arterial semana-semana dos ratos pertencentes aos diferentes grupos.....	29
Figura 11 - Peso testicular (g) dos ratos pertencentes aos diferentes grupos.....	30
Figura 12 - Volume testicular (cm ³) dos ratos pertencentes aos diferentes grupos.....	30
Figura 13 - Concentração espermática das amostras dos ratos pertencentes aos diferentes grupos.....	31
Figura 14 - Motilidade espermática das amostras dos ratos pertencentes aos diferentes grupos.....	32
Figura 15 - Viabilidade da membrana espermática das amostras coletadas dos ratos pertencentes aos diferentes grupos.....	32
Figura 16 - Altura do epitélio dos túbulos seminíferos dos ratos pertencentes aos diferentes grupos.....	33
Figura 17 - Diâmetro dos túbulos seminíferos dos ratos pertencentes aos diferentes grupos.....	33
Figura 18 - Densidade do lúmen dos túbulos seminíferos dos testículos	

dos ratos pertencentes aos diferentes grupos.....	35
Figura 19 - Densidade do epitélio dos túbulos seminíferos dos ratos pertencentes aos diferentes grupos.....	35
Figura 20 - Densidade da membrana basal dos túbulos seminíferos dos testículos dos ratos pertencentes aos diferentes grupos.....	36
Figura 21 - Densidade vascular dos túbulos seminíferos dos testículos dos ratos pertencentes aos diferentes grupos.....	36
Figura 22 - Fotomicrografia de corte transversal dos túbulos seminíferos dos testículos dos ratos pertencentes aos diferentes grupos. Hematoxylina & eosina (200X).....	37
Figura 23 - Escore de Johnsen do epitélio seminífero dos ratos pertencentes aos diferentes grupos.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação dos espermatozóides de animais normotensos (WKY), hipertensos tratados com enalapril (HE) e não tratados (H).....	38
Tabela 2 - Avaliação da morfologia testicular de animais normotensos (WKY), hipertensos tratados com enalapril (HE) e não tratados (H).....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVC	Acidente vascular cerebral
ECA	Enzima conversora de angiotensina
HAS	Hipertensão arterial sistólica
H	Grupo hipertenso
HE	Grupo enalapril
IECA	Inibidor da enzima conversora de angiotensina
NCHS	National Center for Health Statistics
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
SHR	Rato espontaneamente hipertenso
WKY	Wistar-Kyoto

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	OBJETIVOS	18
2	MATERIAL E MÉTODO	19
2.1	Animais	19
2.2	Aferição da pressão arterial	20
2.3	Eutanásia e coleta de amostras	20
2.4	Avaliação dos espermatozóides	21
2.5	Avaliação biométrica macroscópica	23
2.6	Análises estruturais	23
2.6.1	<u>Diâmetro do túbulo seminífero</u>	23
2.6.2	<u>Altura do epitélio do túbulo seminífero</u>	24
2.6.3	<u>Densidade volumétrica das diferentes estruturas testiculares</u>	25
2.6.4	<u>Volume Total das diferentes estruturas testiculares</u>	26
2.6.5	<u>Escore de Johnsen</u>	27
2.7	Análises estatísticas	27
3	RESULTADOS	28
3.1	Aferição da pressão arterial	28
3.2	Avaliação biométrica macroscópica	30
3.2.1	<u>Peso testicular e teste de Sherle</u>	30
3.3	Análises espermáticas	31
3.4	Análises estruturais	33
3.4.1	<u>Altura do epitélio seminífero</u>	33
3.4.2	<u>Diâmetro do túbulo seminífero</u>	33
3.4.3	Densidade	34
3.4.4	<u>Escore de Johnsen</u>	37
4	DISCUSSÃO	39
5	CONCLUSÕES	42
	REFERÊNCIAS	43
	APÊNDICE A - Soluções utilizadas no experimento.....	46
	APÊNDICE B - Artigo submetido para revista ANDROLOGY.....	48
	ANEXO – Comissão de ética para o cuidado e uso de animais experimentais..	67

INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistólica (HAS) é um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo, geralmente associadas a outros distúrbios tais como obesidade, diabetes mellitus tipo 2, doença renal, aterosclerose, acidente vascular cerebral (AVC) e identificada como um dos mais prevalentes fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (1).

A lesão de órgão alvo, como coração, rins, cérebro e olhos, é um fator bem documentado da hipertensão, porém o dano testicular causado pela HAS não foi claramente definido. Há uma falta de dados convincentes que associem especificamente HAS ao comprometimento do potencial reprodutivo do sexo masculino (2).

O desenvolvimento da HAS depende da interação entre fatores genéticos e ambientais. No entanto, a HAS é acompanhada por alterações funcionais do sistema nervoso autônomo simpático, dos rins, do sistema renina angiotensina, além de outros mecanismos humorais e endoteliais. Assim a hipertensão resulta de várias alterações estruturais do sistema cardiovascular que tanto amplificam o estímulo hipertensivo, como causam dano cardiovascular. O Captopril, Enalapril e Lisinopril são fármacos anti-hipertensivos que atuam inibindo a enzima conversora de angiotensina (ECA) e são amplamente utilizados no tratamento de pacientes com HAS, insuficiência cardíaca ou nefropatias diabéticas (3, 4).

Segundo o NHANES (“National Health and Nutrition Examination Survey”), conduzido pela NCHS (“National Center for Health Statistics”), dos Estados Unidos, considerando hipertenso todo indivíduo com média de pressão sistólica de 140 mmHg ou pressão diastólica de 90 mmHg ou em uso de medicação anti-hipertensiva, 28,7% da população americana adulta é hipertensa. Essa estimativa corresponde a aproximadamente 58,4 milhões de indivíduos, pelos dados obtidos entre os anos de 1999 e 2003 (5).

As taxas de prevalência na população brasileira urbana adulta têm variado entre 22,3% e 43,9%. A prevalência da hipertensão aumentou sobretudo entre mulheres, negros e idosos. Constatou-se que mais de 50% dos indivíduos entre 60 e 69 anos e aproximadamente três quartos da população acima de 70 anos são afetados (6).

Apesar dos esforços para diagnosticar e tratar a HAS, cerca de 35% a 83% dos portadores de hipertensão desconhecem sua condição e aproximadamente 75% a 92% daqueles em tratamento não mantêm a hipertensão controlada(7, 8). Na vigência de anti-hipertensivos eficazes para reduzir os níveis pressóricos a valores inferiores a 140/90 mmHg, a não adesão ao tratamento gera um problema de efetividade, variando entre 51% nos Estados Unidos, 43% na China, e 27% em Gâmbia (9, 10)

O tratamento específico da HAS visa reduzir o risco de incidência de doenças cardíacas, que atualmente representam 30% de toda as mortes, bem como diminuir a lesão de órgãos alvo (11).

A linhagem de ratos SHR é a mais utilizada para estudar a hipertensão arterial essencial e outras doenças cardiovasculares associadas (12, 13). Foi obtida durante a década de 1960 por Okamoto e colaboradores, através da reprodução seletiva de ratos Wistar-Kyoto com pressão arterial elevada (14).

A hipertensão arterial no rato espontaneamente hipertenso (SHR) é androgênio dependente. O aumento da pressão arterial começa por volta de 5-6 semanas de idade e mostra uma rápida elevação, superior a 250 mmHg, a partir da décima quinta semana de vida (15). As mudanças vasculares hipertensivas podem ser observadas a partir desse momento e a deficiência espermatogênica é observada a partir da vigésima terceira semana de idade. Assim, foi sugerido que a redução da fertilidade observada nesse grupo de animais esteja relacionada à disfunção das células de Sertoli (16).

Uma melhora significativa da espermatogênese foi observada após o uso de bloqueadores de canais de cálcio (Manidipina), porém não existem até o momento na literatura, estudos que avaliem o efeito do Enalapril, um inibidor da enzima de conversão da angiotensina, anti-hipertensivo amplamente utilizado em nosso meio, na proteção vascular intratesticular (14).

Embora estudos histológicos em humanos sugiram que alterações vasculares intratesticulares estejam relacionadas às alterações da espermatogênese, os verdadeiros responsáveis por esses danos permanecem desconhecidos (14).

1 OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo avaliar a influência da hipertensão arterial sistólica na espermatogênese e na morfologia testicular, bem como avaliar os efeitos do enalapril sobre esses parâmetros em ratos SHR.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados um total de 36 ratos machos com 11 semanas de idade, sendo 28 ratos da linhagem SHR e 08 ratos da linhagem Wistar-Kyoto (WKY). Os animais foram mantidos em caixas apropriadas em condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ \text{C}$) e com ciclo claro-escuro artificial (luzes acesas 07h00 - 19:00) e foram alimentados com ração padrão e água ad libitum.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com a legislação brasileira para o uso científico de animais, e este projeto foi formalmente aprovado pelo Comitê de Ética local (anexo A).

Todos os animais foram submetidos a um período de adaptação da 11ª a 16ª semana, durante o qual foi administrado diariamente água da torneira por gavagem e realizada aferição da pressão arterial semanalmente.

Com 17 semanas de vida os SHRs foram divididos aleatoriamente em dois grupos, não tratados (H, $n = 13$) ou tratado (HE, $n = 15$). Os animais do grupo H receberam dois mililitros de água da torneira por gavagem durante cinco semanas, enquanto os animais do grupo HE foram tratados com 30mg/kg de enalapril (Primordium, Rio de Janeiro, Brasil) diluído em igual volume de água e administrado pela mesma via e período de idade do grupo H (17). Ratos Wistar-Kyoto foram utilizados como controle (WKY, $n = 8$), e receberam exatamente o mesmo protocolo do grupo H (Figura 1).

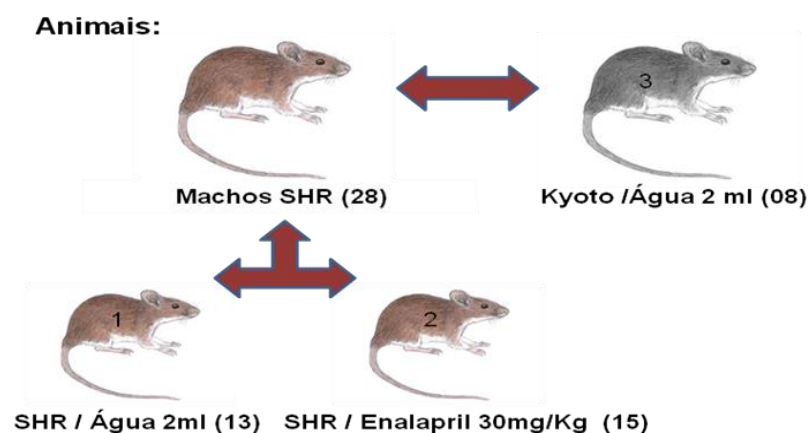


Figura 1. Esquema representativo dos grupos em estudo. (1) SHR não tratado. (2) SHR tratado com enalapril. (3) Grupo controle (WKY).

2.2 Aferição da pressão arterial

A pressão arterial foi aferida semanalmente em ratos conscientes, que foram contidos pelo método não-invasivo de pletismografia (LE 5001 Pressure Meter (PANLAB, Barcelona, Espanha). Antes da aferição, os animais foram aquecidos a 37° C por 15 minutos, promovendo a dilatação da artéria caudal (18). A média das três medidas foi utilizada como a pressão arterial sistólica. Durante o período de adaptação da 11ª a 16ª semana, a pressão arterial foi medida para minimizar o estresse causado pelo procedimento (Figura 2).

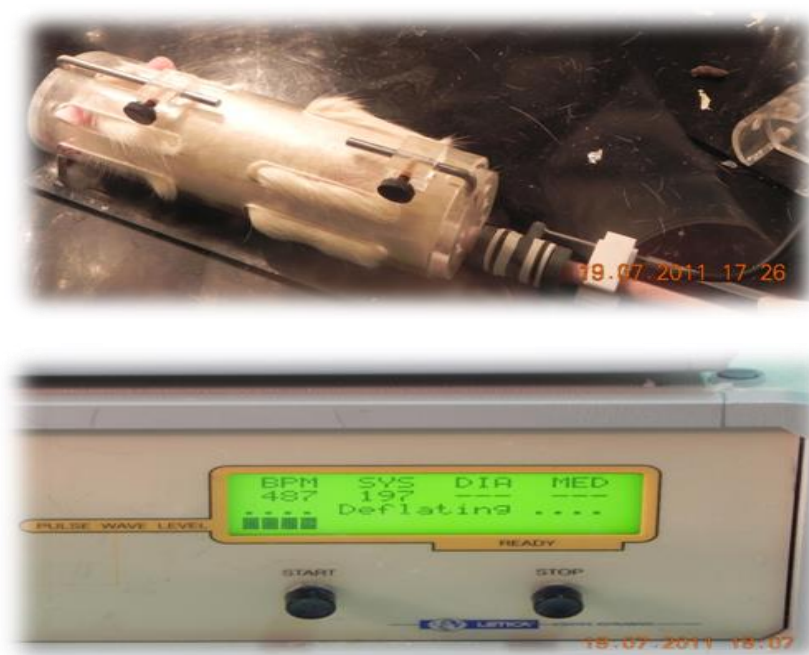


Figura 2. Esquema representativo da aferição da pressão arterial por pletismografia.

2.3 Eutanásia e coleta de amostras

Todos os animais foram submetidos a eutanásia com 22 semanas de idade por sobredose de anestésico Tiopental intraperitoneal (Cristália, São Paulo, Brasil). O epidídimo direito foi prontamente removido e utilizado para a coleta de espermatozóides, enquanto ambos os testículos foram utilizados para a análise morfológica.

2.4 Avaliação dos espermatozóides

Imediatamente após a eutanásia, o epidídimo direito foi coletado e a cauda do mesmo foi então ressecada, seccionada diversas vezes e lavada em 5 ml de tampão PBS-BSA 0,5% (anexo B) para coleta dos espermatozoides (19).

Após diluição, a concentração espermática foi determinada por contagem em Câmara de Neubauer (Figura 3).

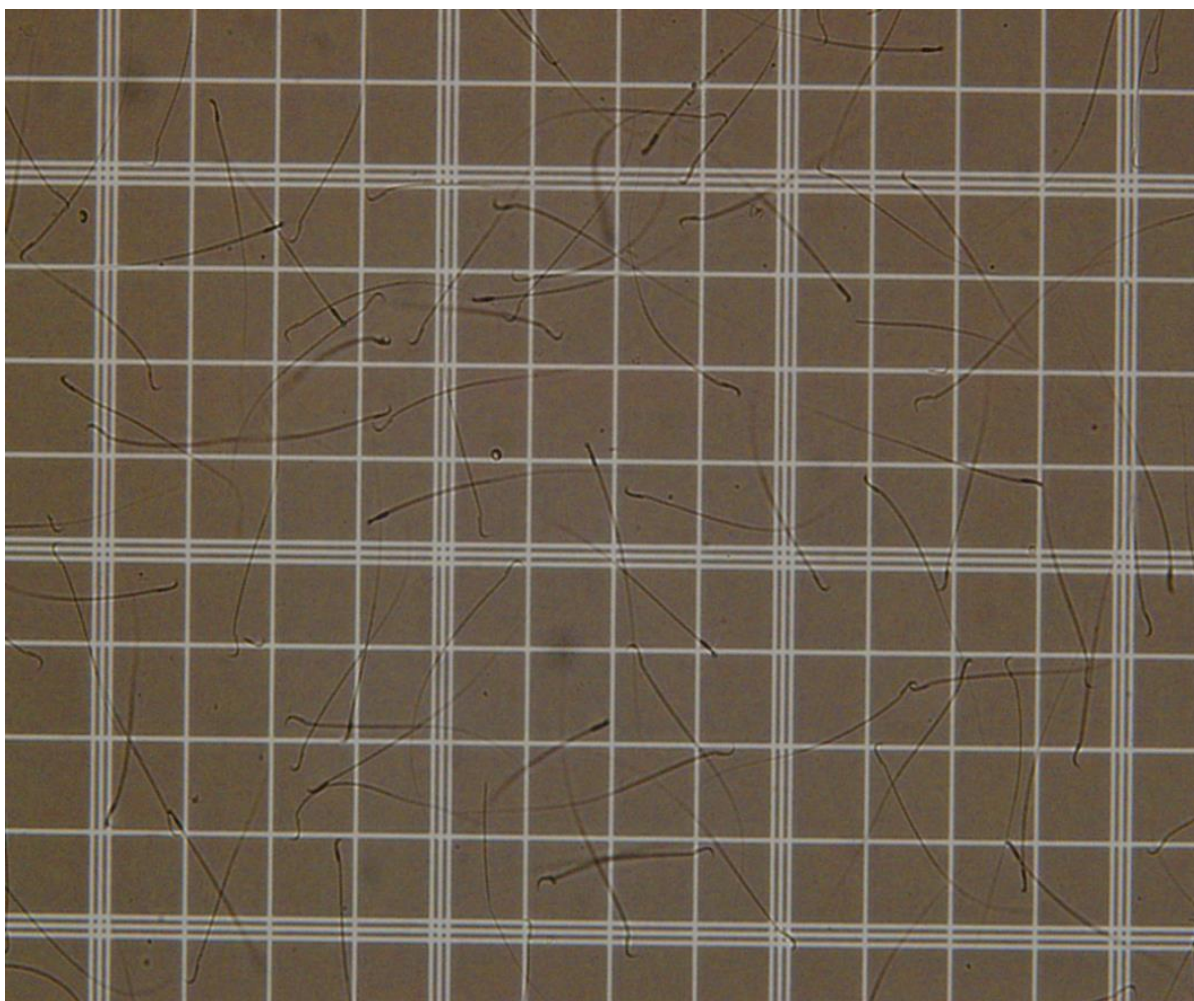


Figura 3. Determinação do número de espermatozóides em câmara de Neubauer.

A motilidade foi determinada como o número de espermatozóides imóveis diminuídos do número total de espermatozóides. Para tanto, foram avaliados não menos que 200 espermatozóides de cada epidídimo.

Realizou-se ainda o teste hipo-osmótico para avaliação da integridade e funcionamento da membrana plasmática (figura 4). Os espermatozóides foram diluídos em solução hipo-osmótica (100 mOsm/L) por 30 minutos à temperatura de 37°C (anexoB). Após este período foi avaliada a porcentagem de espermatozóides apresentando dobramento de cauda, que foram considerados viáveis. Mais uma vez, foram avaliados pelo menos 200 espermatozóides por epidídimo (20).



Figura 4. Determinação do número de espermatozóides viáveis através do teste hipo-osmótico.

2.5 Avaliações biométricas macroscópicas

Após a dissecação dos testículos, cada um destes foi pesado e seu volume determinado pelo teste de Scherle (21).

2.6 Análises estruturais

Cada testículo foi clivado na sua porção proximal e fixado por imersão em solução de Bouin por 12 horas. Após este período o órgão foi clivado em secções transversais de aproximadamente 3 milímetros para pós-fixação em formol tamponado (pH:7,0) a 4% (anexo B).

Os fragmentos fixados em formol foram desidratados em banhos de concentrações crescentes de álcool etílico e clarificados em xilol e posteriormente incluídos em parafina e secções de 5µm obtidas em micrótomo. Tais cortes foram corados com hematoxilina e eosina e fotografados digitalmente com câmera Olympus DP70 (Olympus, Tóquio, Japão) em microscópio óptico Olympus BX51 sob diferentes aumentos para as seguintes análises:

2.6.1 Diâmetro do túbulo seminífero

Com auxílio do software Image J (NIH, Bethesda, Maryland, EUA), o diâmetro de 125 túbulos seminíferos foi mensurado em cada testículo (5 túbulos por campo em 5 campos de 5 cortes), utilizando a função “straight line” previamente calibrada. Para a mensuração foram utilizados os túbulos com contornos mais circulares, traçando uma linha reta da membrana basal de um polo ao outro do túbulo. A linha passa sempre pelo centro do túbulo (Figura 5). Para captura das imagens foi utilizado o microscópio óptico Olympus BX51 fotografadas em aumento de 100x (22).

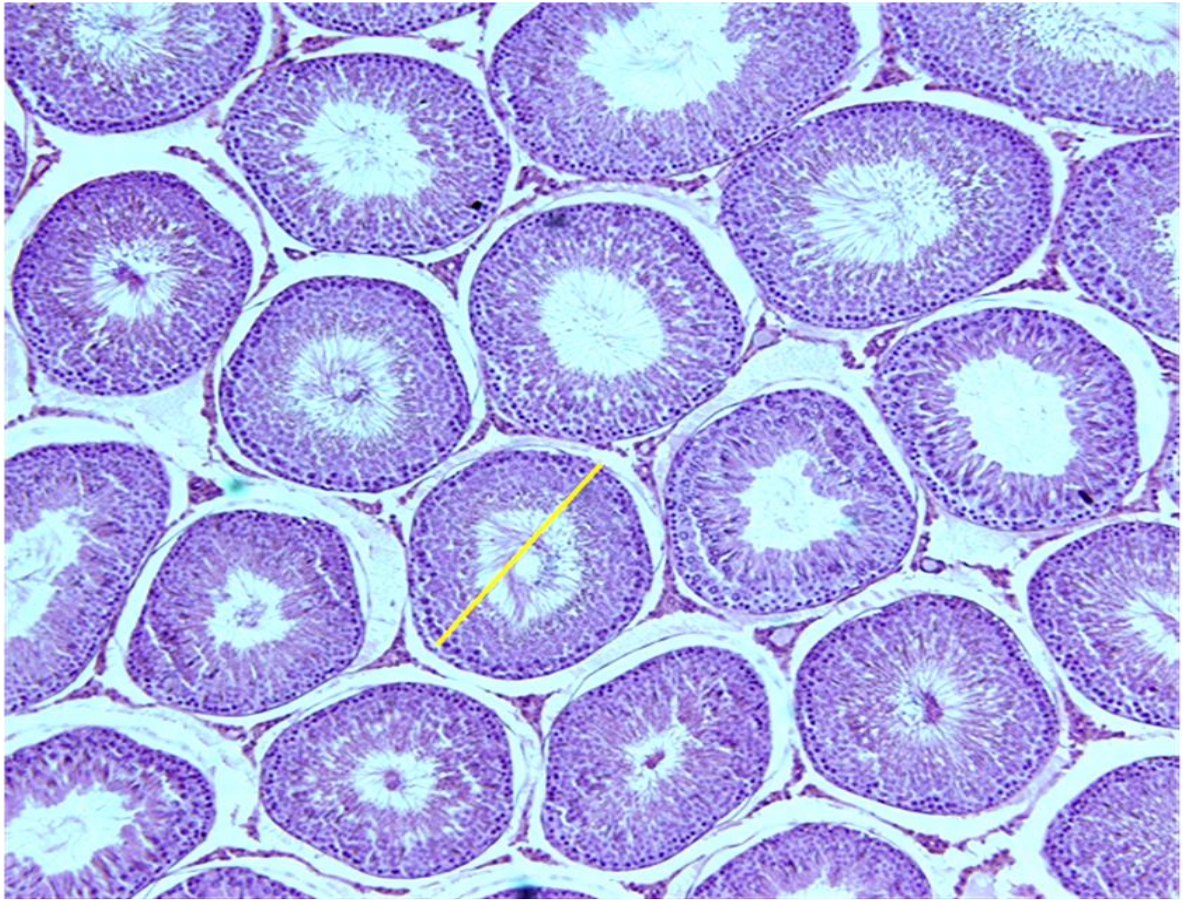


Figura 5. Fotomicrografia de corte transversal dos túbulos seminíferos. A linha reta amarela mostra o traçado para a mensuração do diâmetro em um dos túbulos. HE 100x.

2.6.2 Altura do epitélio do túbulo seminífero

Novamente com auxílio do software Image J, a altura do epitélio de 125 túbulos seminíferos foi mensurado em cada testículo (5 túbulos em 5 campos de 5 cortes), utilizando a função “straight line” previamente calibrada. Foram traçadas três linhas, as quais foram tomadas desde a lâmina basal até a última célula do epitélio seminífero em direção ao lúmen (Figura 6). O valor registrado para cada túbulo resultou da média das três medições. As imagens foram fotografadas em aumento de 200x (22).

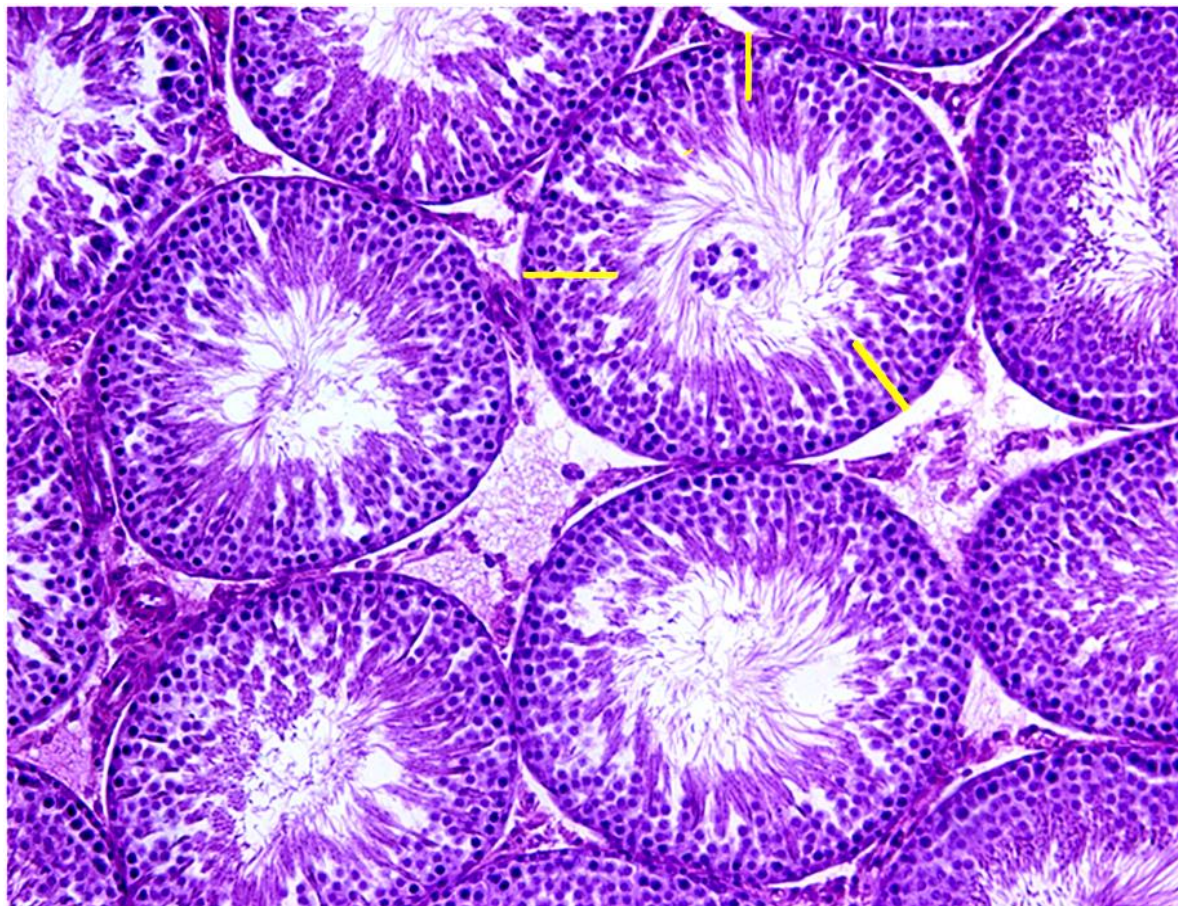


Figura 6. Fotomicrografia de corte transversal dos túbulos seminíferos. As três linhas retas amarelas mostram o traçado e a disposição para a mensuração da altura do epitélio seminífero em um dos túbulos. HE 200x.

2.6.3 Densidade volumétrica das diferentes estruturas testiculares

Tal parâmetro foi avaliado com auxílio do software Image J através da função “cell counter”. Foi usada uma grade de 100 pontos sobreposta às fotomicrografias dos testículo (22). Para cada testículo foram avaliados 10 campos de 5 cortes, num total de 5000 pontos analisados por animal, (Figura 7).

As densidades volumétricas das estruturas avaliadas foram: membrana basal, epitélio seminífero, lúmen, túbulos seminíferos (a soma destas primeiras três estruturas), vasos e compartimento intertubular.

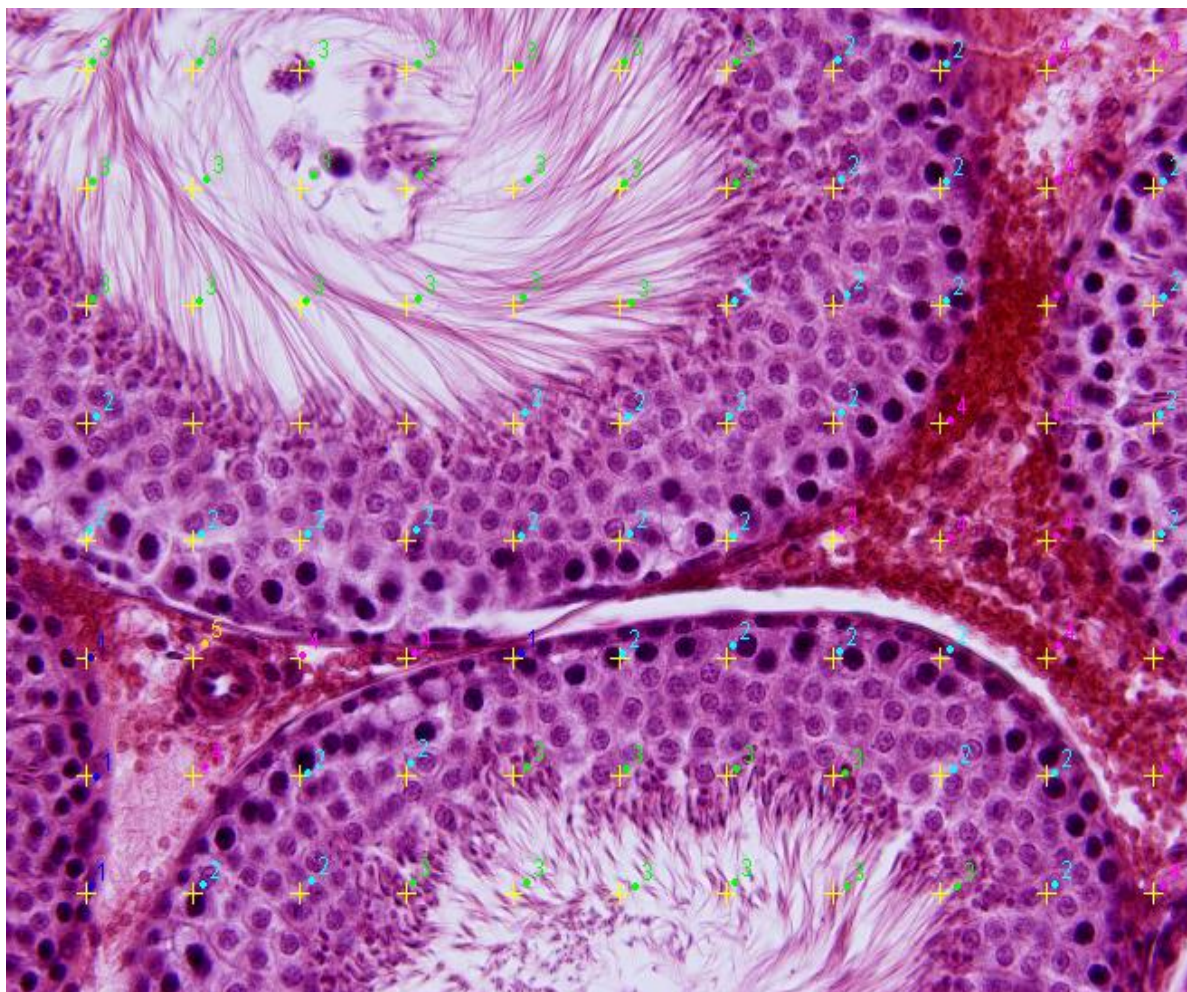


Figura 7. Fotomicrografia de corte transversal dos túbulos seminíferos. As cruzes amarelas são os 100 pontos da grade sobreposta à imagem para quantificação das densidades estruturais do compartimento tubular e intertubular. He 400x.

2.6.4 Volume Total das diferentes estruturas testiculares

O volume total de cada uma das estruturas acima mencionadas, expresso em mililitros, foi calculada pela multiplicação do volume testicular, aferido pelo teste de Sherle, pela densidade volumétrica da estrutura.

2.6.5 Escore de Johnsen

Utilizou-se este escore para avaliação da lesão do epitélio seminífero de pelo em menos 50 túbulos por testículo (23).

Um valor de 1 a 10, é dado a cada um dos túbulos de acordo com a maturação das células germinativas: 10 para espermatogênese completa, com muitos espermatozóides e epitélio germinativo organizado com espessura regular deixando um lúmen aberto; 9 para muitos espermatozóides presentes, mas epitélio germinal desorganizado com descamação ou obliteração do lúmen; 8 para apenas alguns poucos espermatozóides; 7 para nenhum espermatozóide mas muitas espermátides presentes; 6 para nenhum espermatozóide e apenas algumas poucas espermátides (menos de 5-10); 5 para nenhum espermatozóide e espermátide mas vários espermátócitos presentes; 4 para apenas alguns poucos espermátócitos (menos de 5) e nenhuma espermátide ou espermatozóide; 3 para apenas espermatogônias e células germinativas presentes; 2 para ausência de células germinativas mas presença de células de Sertoli; 1 para ausência de células presentes na seção tubular.

2.7 Análise estatística

Os dados foram tabulados e as médias dos grupos foram comparadas por análise de variância one-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todos os resultados foram apresentados como média +/- desvio padrão de cada grupo.

3 RESULTADOS

3.1 Aferição da pressão arterial

A pressão arterial dos ratos SHR com 11 semanas foi superior a 200 mmHg ($239,2 \pm 33,1$) e permaneceu elevada ao longo do experimento até o final da décima sexta semana, quando então, iniciou-se o tratamento com enalapril 30 mg/Kg (figura 8). Em ambos os grupos SHR (H e HE) a pressão arterial foi significativamente mais elevada que o grupo WKY para cada semana. Após o início do tratamento com enalapril, os níveis pressóricos no grupo HE diminuíram para valores inferiores a 160 mmHg, enquanto que no grupo H mantiveram-se elevados (figura 9). Na 21ª semana a pressão arterial de animais HE foi de $153,9 \text{ mmHg} \pm 21,03$ significativamente menor do que os animais H ($205,1 \pm 24,9$), e estatisticamente semelhante aos animais WKY ($153,4 \pm 24,41$). A pressão sanguínea de ratos WKY permaneceu cerca de 150 mmHg, durante todo o experimento (figura 10).

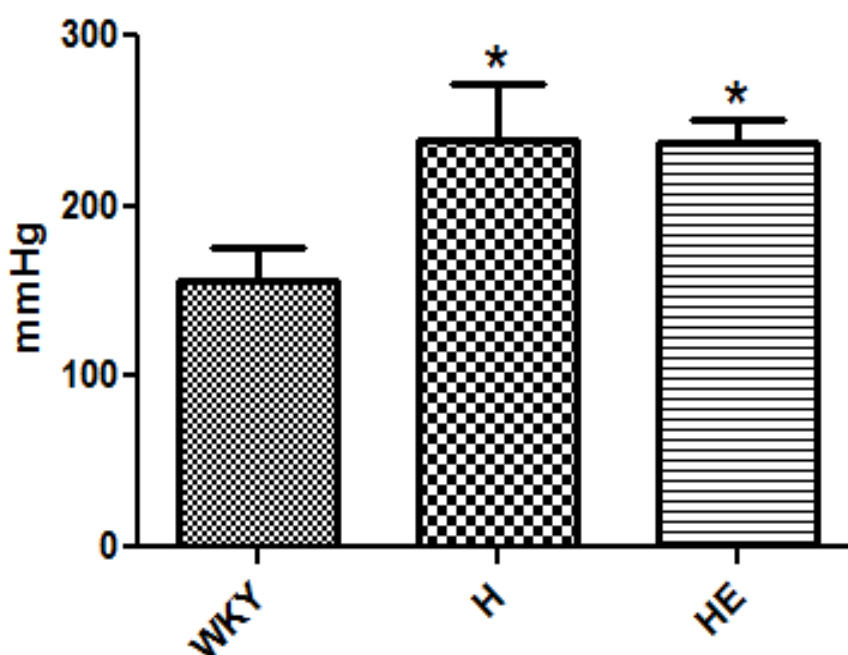


Figura 8. Medida da pressão arterial sistólica no início do experimento (17ª semana) dos ratos pertencentes aos grupos: WKY, H e HE. * $p < 0,05$.

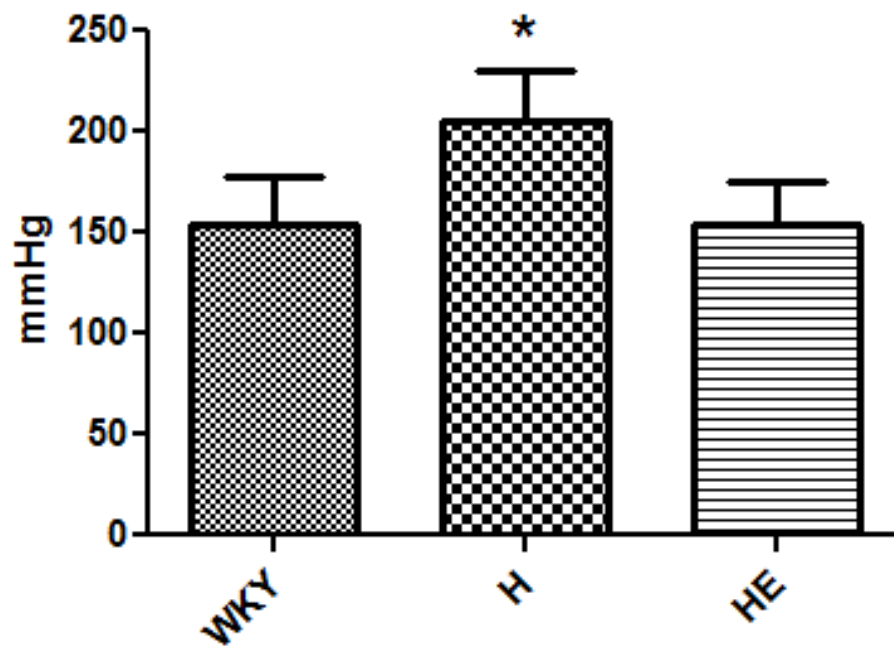


Figura 9. Medida da pressão arterial sistólica no final do experimento (21ª semana) dos ratos pertencentes aos grupos: WKY, H e HE. * $p < 0,05$.

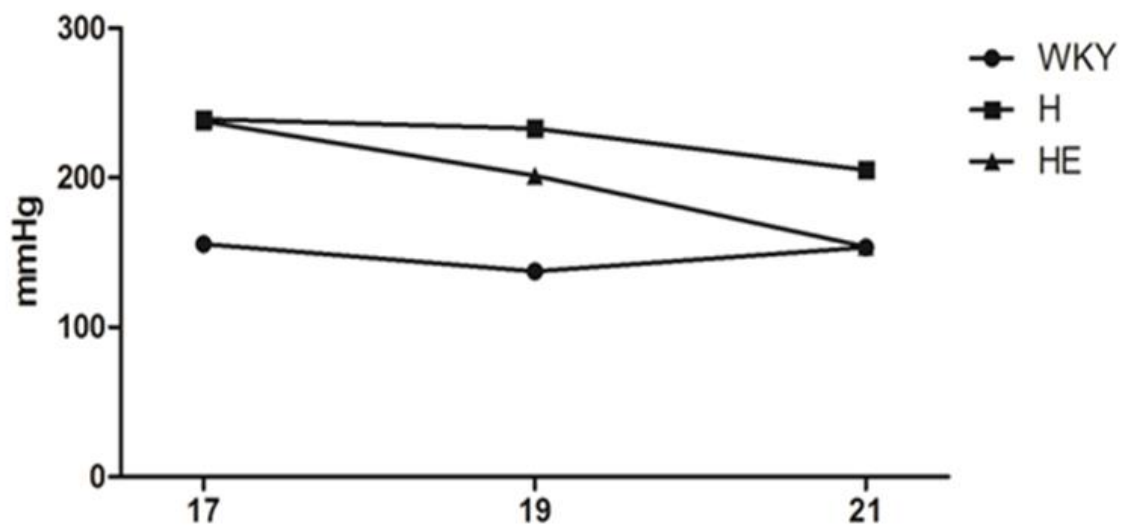


Figura 10. Medida da pressão arterial semana-semana (17ª - 21ª semana) dos ratos pertencentes aos grupos: WKY, H e HE.

3.2 Avaliação biométrica

3.2.1 Peso Testicular e Teste de Scherle

O peso e volume testicular dos grupos H e HE foram maiores do que nos animais WKY, mas nenhuma diferença foi encontrada na comparação entre os dois grupos SHR (figura 11 e 12).

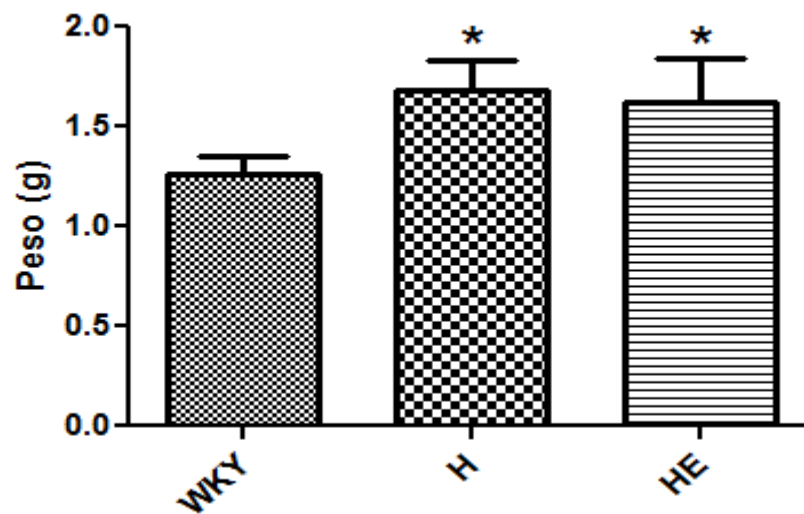


Figura 11. Peso testicular (g) dos ratos pertencentes aos grupos: WKY, H e HE. * $p < 0,05$.

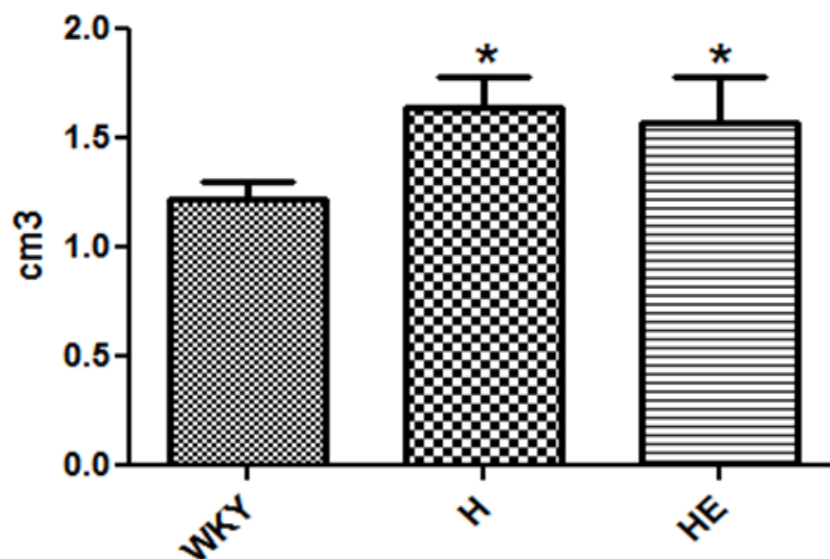


Figura 12. Volume testicular (cm³) dos ratos pertencentes aos grupos: WKY, H e HE. * $p < 0,05$.

3.3 Análises espermáticas

A análise da concentração de espermatozóides mostrou uma redução de 38% nos ratos hipertensos (H) quando comparados ao grupo tratado (HE). O tratamento com enalapril foi eficaz em evitar a diminuição da concentração de espermatozoides, já que não foi encontrada diferença entre o grupo HE e os animais WKY neste parâmetro (figura 13).

Quanto à motilidade e à viabilidade dos espermatozóides, não foi encontrada diferença entre os grupos (figura 14 e 15). Os resultados numéricos da avaliação dos espermatozóides são apresentados na tabela 1.

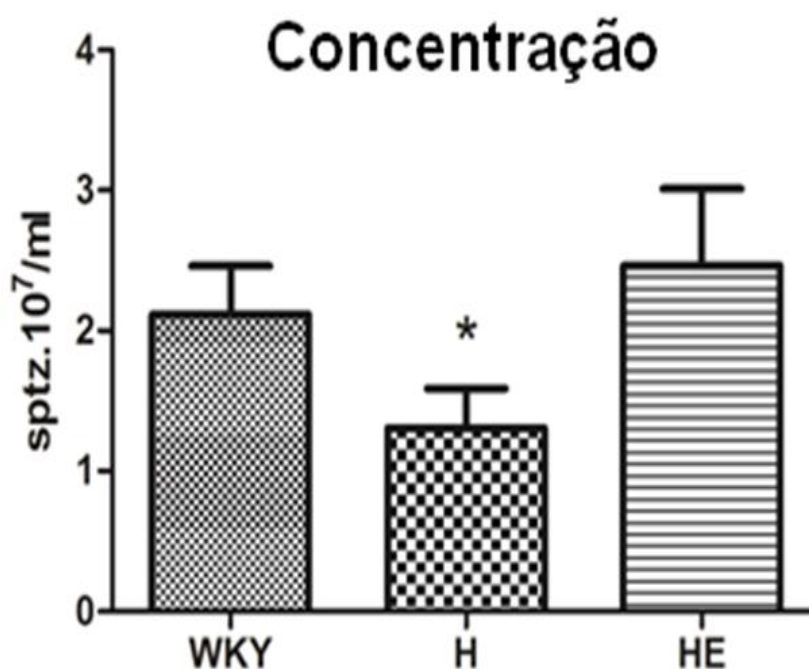


Figura 13. Concentração espermática das amostras coletadas da cauda dos epidídimos dos ratos pertencentes aos grupos: WKY, H e HE. * $p < 0,05$.

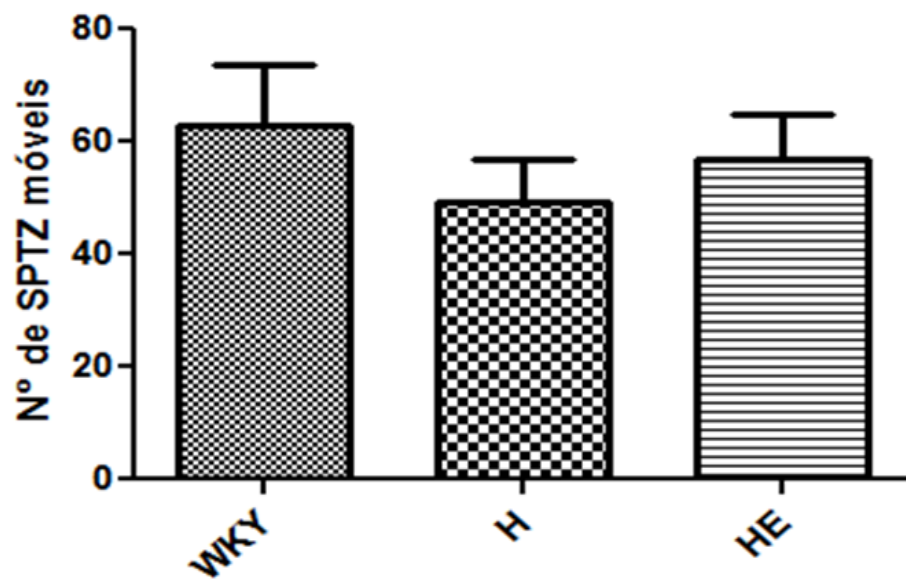


Figura 14. Motilidade espermática das amostras coletadas da cauda dos epidídimos dos ratos pertencentes aos grupos: WKY, H e HE.

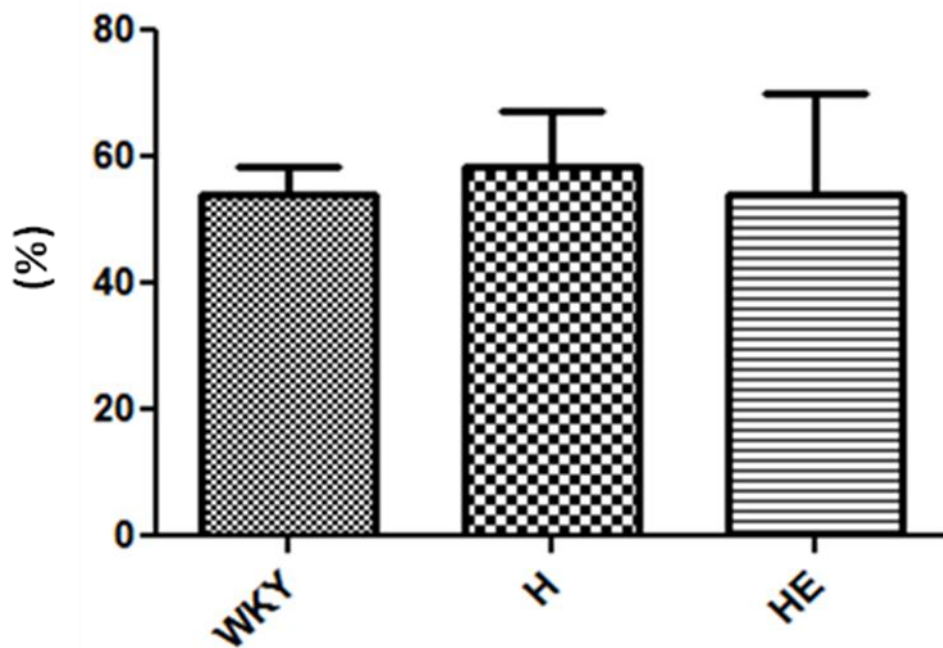


Figura 15. Viabilidade da membrana espermática das amostras coletadas da cauda dos epidídimos dos ratos pertencentes aos grupos: WKY, H e HE.

3.4 Análises estruturais

3.4.1 Altura do epitélio seminífero

O exame microscópico da altura do epitélio seminífero não revelou alteração significativa entre os grupos WKY, H e HE (figura 16).

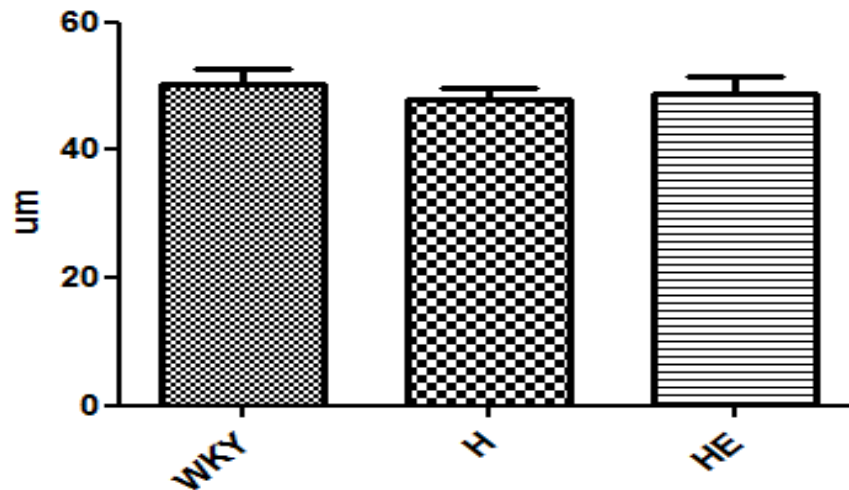


Figura 16. Altura do epitélio dos túbulos seminíferos dos ratos pertencentes aos grupos: WKY, H e HE.

3.4.2 Diâmetro do túbulo seminífero

A análise morfométrica do diâmetro do túbulo seminífero também não revelou diferença significativa entre os respectivos grupos: WKY, H e HE (figura 17).

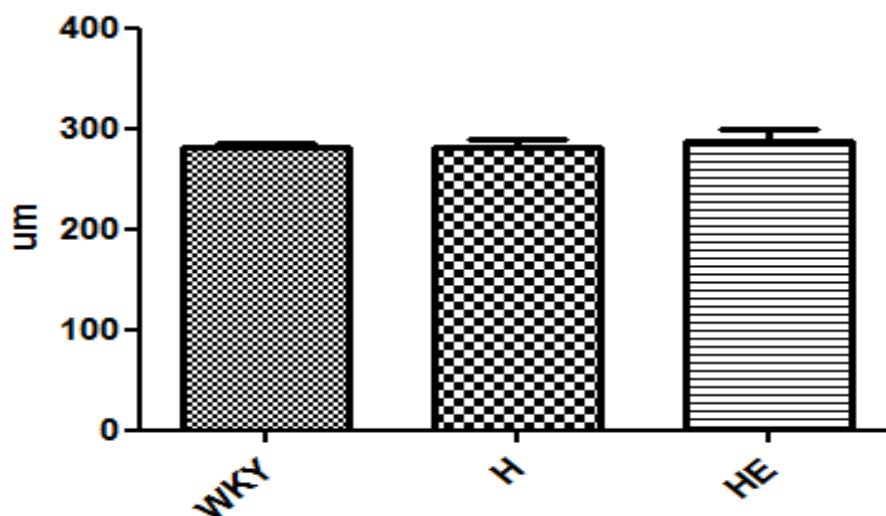


Figura 17. Diâmetro dos túbulos seminíferos dos ratos pertencentes aos grupos: WKY, H e HE.

3.4.3 Densidade volumétrica e volume absoluto

A densidade volumétrica e o volume absoluto das estruturas testiculares foram os parâmetros mais afetados. A densidade volumétrica do túbulo seminífero e o volume absoluto do grupo HE foi aumentado em relação aos animais WKY.

Ao analisar a morfologia do túbulo seminífero, verificou-se que os animais do grupo HE e WKY apresentaram uma densidade volumétrica do lúmen reduzida, em comparação com os animais do grupo H. Quando o volume absoluto é comparado, os três grupos experimentais apresentaram médias estatisticamente diferentes. Nesta análise, o grupo H teve o maior volume da luz, enquanto o WKY teve os valores mais baixos e o HE ficou com valores intermediários (figura 18).

No entanto, em relação ao epitélio seminífero, a estrutura mais importante no parênquima aqui analisada, o grupo HE apresentou a maior densidade volumétrica (figura 19 e 22) e o volume absoluto como pode ser visto na tabela 2.

A densidade volumétrica e volume absolutos da membrana basal foram superiores nos animais WKY quando comparado com ambos os grupos H e HE (figura 20).

No que se refere ao compartimento intertubular, animais WKY tiveram a maior densidade volumétrica em relação aos grupos H e HE que foram 21% e 16% menores, respectivamente. No entanto, quando se analisa o volume absoluto do compartimento intertubular, não foi encontrada diferença entre os grupos.

Finalmente, a densidade volumétrica vascular foi maior nos animais hipertensos (grupo H), em comparação com ratos WKY e HE animais que não apresentaram diferença entre eles (figura 21 e 22). Ao estudar os valores absolutos dos vasos, verificou-se que os animais do grupo H tinham um volume maior também neste parâmetro.

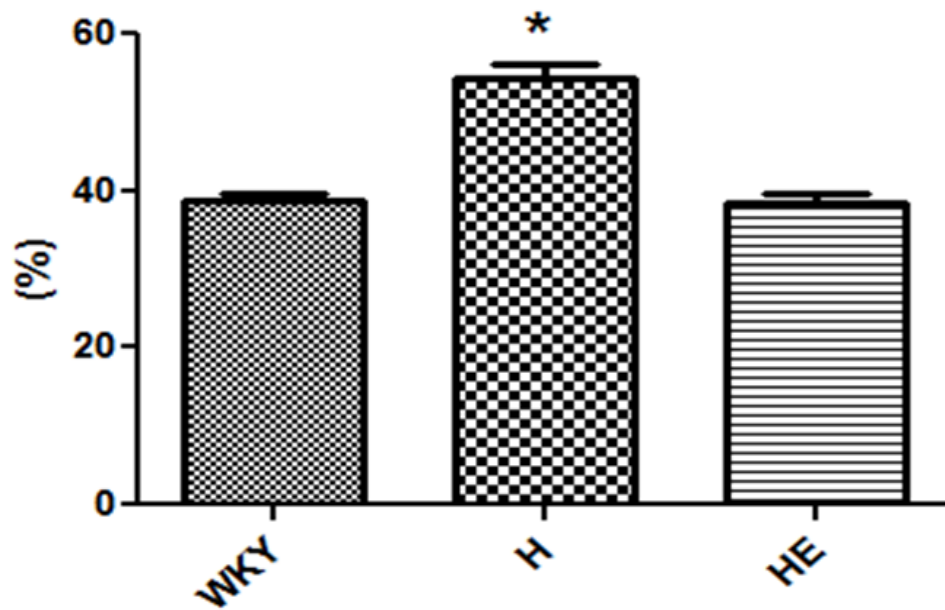


Figura 18. Área do lúmen dos túbulos seminíferos dos ratos pertencentes aos grupos: WKY, H e HE. * $p < 0,05$.

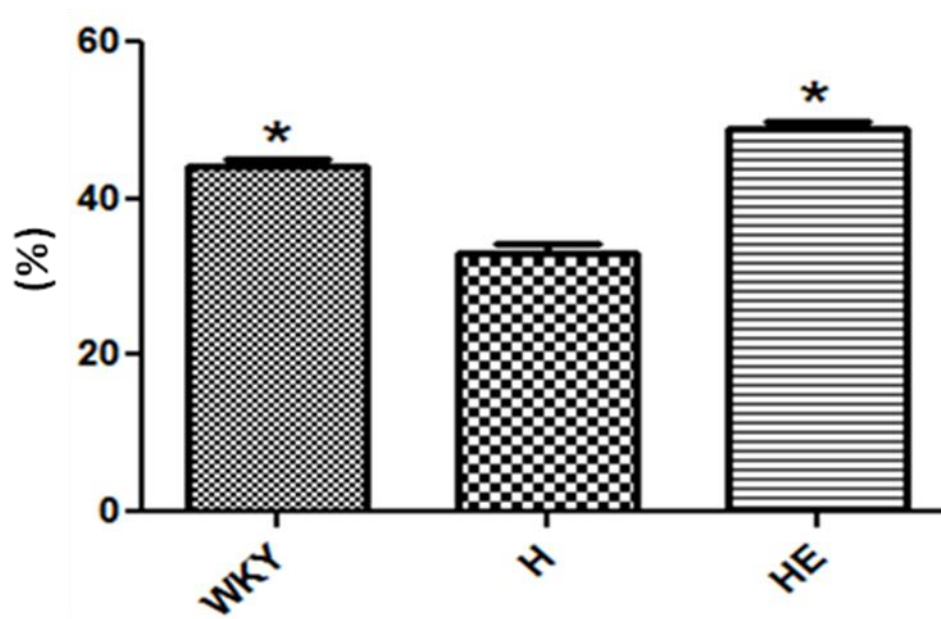


Figura 19. Densidade volumétrica do epitélio dos túbulos seminíferos dos testículos dos ratos pertencentes aos grupos: WKY, H e HE. * $p < 0,05$.

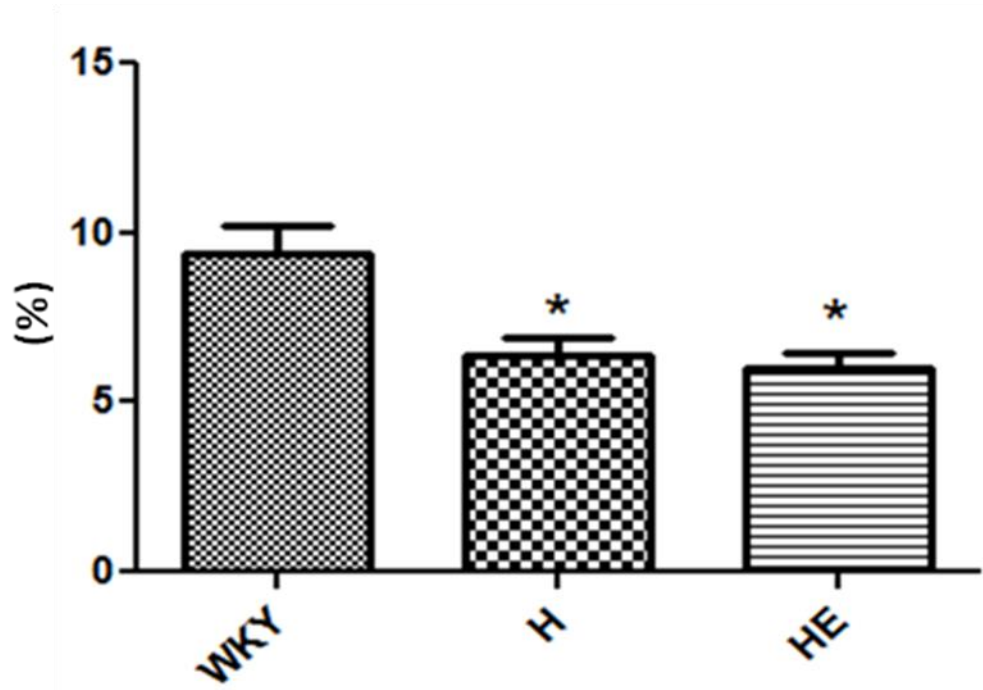


Figura 20. Densidade volumétrica da membrana basal dos túbulos seminíferos dos testículos dos ratos pertencentes aos grupos: WKY, H e HE. * $p < 0,05$.

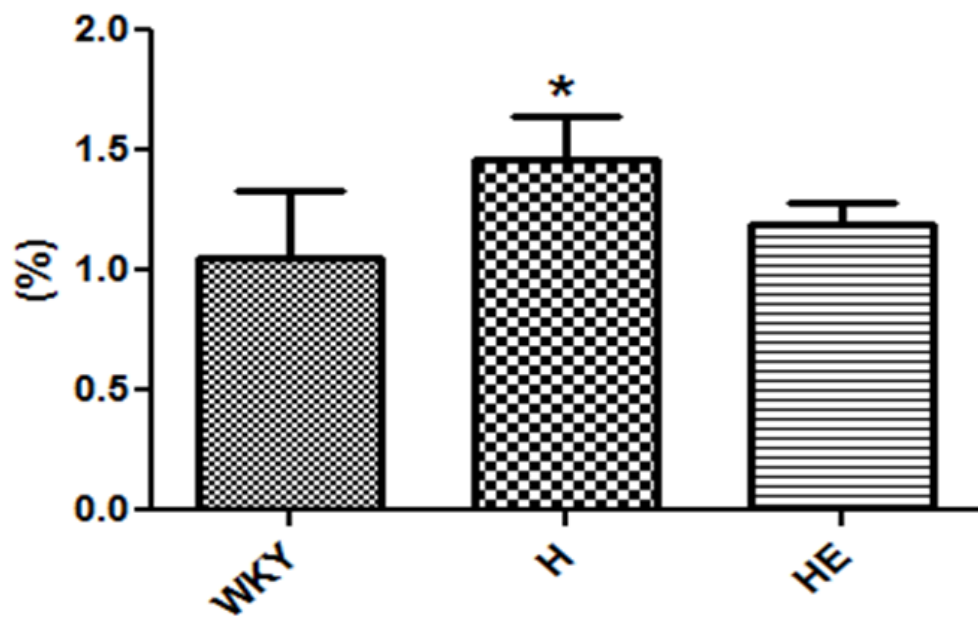


Figura 21. Densidade volumétrica vascular dos túbulos seminíferos dos testículos dos ratos pertencentes aos grupos: WKY, H e HE. * $p < 0,05$.

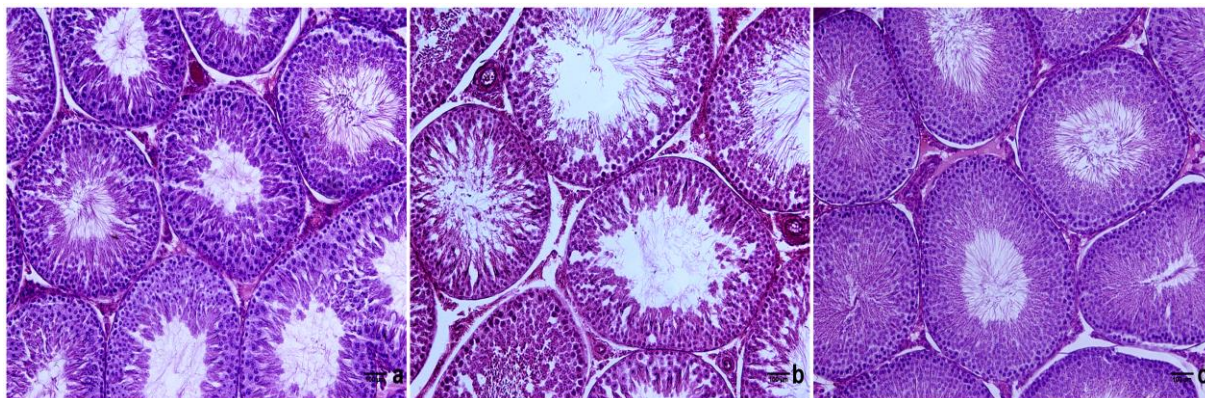


Figure 22. Fotomicrografia de corte transversal dos túbulos seminíferos dos testículos dos ratos pertencentes aos grupos WKY (a), H (b) and HE (c), demonstrando uma diminuição do epitélio seminífero e um aumento da densidade volumétrica vascular nos animais hipertensos. Hematoxylina & eosina (200X).

3.4.4 Escore de Johnsen

A análise semiquantitativa do Escore de Johnsen (figura 23) não revelou diferença estatística entre os grupos, em relação ao grau de lesão no epitélio seminífero.

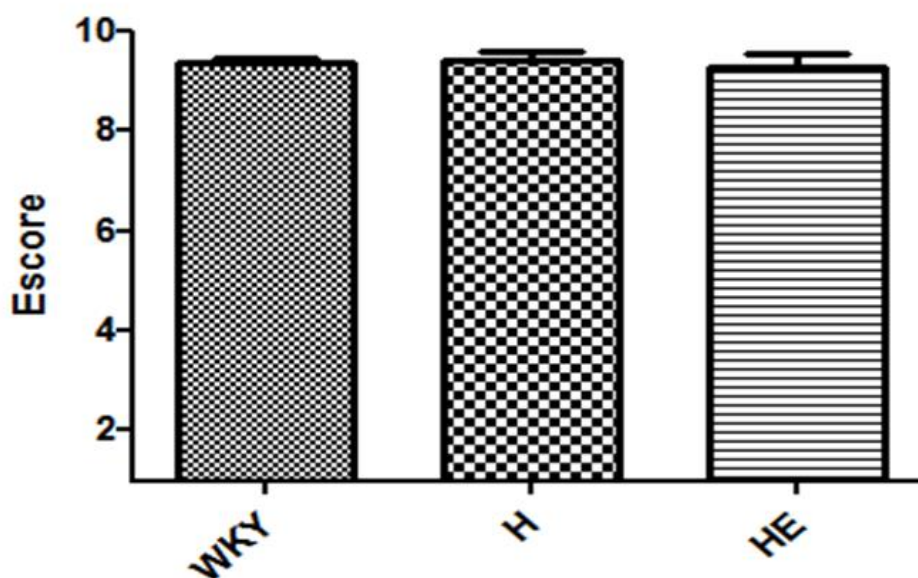


Figura 23. Escore de Johnsen do epitélio seminífero dos ratos pertencentes aos grupos: WKY, H e HE.

Os resultados numéricos de todos os estudos morfológicos são apresentados na tabela 2.

Tabela 1 – Avaliação do espermatozoides de animais normotensos (WKY), hipertensos tratados com enalapril (HE) e não tratados (H). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

	WKY	H	HE	Valor de p
Concentração espermática (sptz. 10^7 /ml)	$2,11 \pm 0,34$	$1,31 \pm 0,27$	$2,46 \pm 0,54$	0,0009
Motilidade espermática (%)	$60,8 \pm 15,1$	$49,3 \pm 7,4$	$56,9 \pm 7,9$	0,2224
Viabilidade espermática (%)	$54,1 \pm 4,4$	$58,4 \pm 8,7$	$54,0 \pm 15,9$	0,7507

Tabela 2 - Avaliação da morfologia testicular de animais WKY (a), H (b) e HE (c). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

	WKY	H	HE	Valor de p
Peso testicular (g)	$1,26^a \pm 0,08$	$1,68 \pm 0,14$	$1,62 \pm 0,21$	$< 0,0001$
Volume testicular (ml)	$1,22^a \pm 0,08$	$1,63 \pm 0,14$	$1,57 \pm 0,21$	$< 0,0001$
Vv [túbulo seminífero] (%)	$92,2^a \pm 0,4$	$93,8 \pm 0,4$	$93,4 \pm 0,3$	$< 0,0001$
Volume do túbulo seminífero (ml)	$1,12^a \pm 0,07$	$1,53 \pm 0,01$	$1,46 \pm 0,20$	$< 0,0001$
Vv [Lúmen tubular] (%)	$38,6 \pm 0,9$	$54,4^a \pm 1,6$	$38,4 \pm 1,0$	$< 0,0001$
Volume do lumen tubular (ml)	$0,47^a \pm 0,02$	$0,89^b \pm 0,02$	$0,60^c \pm 0,09$	$< 0,0001$
Vv [Epitélio seminífero] (%)	$44,1^a \pm 0,7$	$33,0^b \pm 1,1$	$48,9^c \pm 0,8$	$< 0,0001$
Volume do epitélio seminífero (ml)	$0,53 \pm 0,03$	$0,54 \pm 0,02$	$0,76^a \pm 0,09$	$< 0,0001$
Vv [Membrana basal] (%)	$9,40^a \pm 0,82$	$6,38 \pm 0,51$	$6,00 \pm 0,48$	$< 0,0001$
Volume da membrana basal (ml)	$0,11^a \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	0,0080
Vv [compartimento intertubular] (%)	$7,79^a \pm 0,44$	$6,15 \pm 0,48$	$6,55 \pm 0,31$	$< 0,0001$
Volume do compart. intertubular (ml)	$0,09 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	0,3810
Vv [vascular] (%)	$1,05 \pm 0,27$	$1,46^a \pm 0,18$	$1,19 \pm 0,08$	0,0007
Volume vascular (ml. 10^2)	$1,3^a \pm 0,3$	$2,4^b \pm 0,3$	$1,8^c \pm 0,2$	$< 0,0001$
Diâmetro do túbulo seminífero (μ m)	296 ± 7	292 ± 7	297 ± 10	0,4928
Altura do epitélio (μ m)	$50,3 \pm 2,3$	$47,8 \pm 1,8$	$48,9 \pm 2,4$	0,0884
Escore de Johnsen	$9,3 \pm 0,1$	$9,4 \pm 0,1$	$9,2 \pm 0,2$	0,2523

4 DISCUSSÃO

Neste estudo foi confirmada a HAS em cada um dos animais SHR antes do início do tratamento. Além disso, o enalapril, como esperado, foi capaz de reduzir a pressão arterial sistólica no grupo tratado (HE).

Considerando que as alterações vasculares da hipertensão estão bem correlacionadas com diferentes lesões orgânicas, que levam a doenças como a disfunção erétil, é altamente presumível que o epitélio germinativo também possa ser afetado por esta doença sistêmica (24).

Akagashi e colaboradores (16) mostraram que as artérias testiculares, de um modelo animal semelhante (o SHR propenso a infarto) apresentavam degeneração hialina e fibrinóide a partir da décima quinta semana de vida. Estas alterações foram descritas como causadoras da atrofia dos túbulos seminíferos, possivelmente por hipo-perfusão e prejuízo da nutrição do órgão. Na nossa análise, os animais SHR sem tratamento, apresentaram um maior volume vascular, quase o dobro do que os controles normotensos, confirmando que algumas alterações vasculares testiculares ocorrem de forma secundária à hipertensão neste modelo de rato.

Os resultados encontrados no grupo HE indicaram que as alterações vasculares podem ser impedidas pelo inibidor da enzima de conversão da angiotensina (enalapril) ao controlar a pressão arterial nesses animais. Foi relatado que o enalapril previne parcialmente a remodelação vascular na aorta torácica de ratos hipertensos (25), no entanto na vasculatura testicular, o mesmo não foi anteriormente demonstrado. Especificamente sobre as artérias testiculares, o bloqueador do canal de cálcio manidipina também provou evitar danos por redução da pressão arterial (14).

Foi previamente cogitado que as alterações vasculares do testículo resultem em alterações na espermatogênese por uma insuficiência das células de Sertoli. Essas células produzem e segregam várias proteínas que atuam sobre o processo de proliferação e diferenciação de células germinativas através de um mecanismo parácrino (14, 16). Embora esta teoria não tenha sido testada no presente estudo, a mesma pode explicar as alterações promovidas pela hipertensão em animais do grupo H.

É bem conhecido que as células do epitélio seminífero são sensíveis à isquemia. No entanto, o mecanismo pelo qual o dano isquêmico ocorre permanece

pouco claro (26). Os efeitos da hipoxemia no epitélio seminífero foram avaliados por ligação ou oclusão das artérias espermáticas. No entanto, estes procedimentos experimentais produzem um ambiente isquêmico agudo (27). Assim, seria de grande interesse ter um modelo experimental que permita avaliar o efeito de diferentes graus de hipoperfusão na espermatogênese.

Neste modelo de ratos hipertensos, alterações testiculares foram encontradas, incluindo um maior peso e volume dos testículos. No entanto, a linhagem SHR é conhecida por ter um elevado peso testicular em comparação com o seu controle Wistar Kyoto (28). Outras particularidades do SHR são o aumento dos níveis séricos de prolactina e hormônio foliculo estimulante e testosterona diminuída, hormônios importantes na regulação da função reprodutiva (29). Não se sabe se a alteração hormonal nesta linhagem é causada pela seleção endogâmica destes animais ou pelas alterações vasculares anteriormente mencionadas (28).

Nesta experiência, através da redução da pressão arterial, restaurando-se um ambiente testicular normal, o enalapril foi eficaz na prevenção das alterações tubulares promovidas pela hipertensão.

Ambos os grupos SHR tiveram maior volume dos túbulos seminíferos. No entanto, enquanto nos animais hipertensos não tratados a estrutura principal do túbulo foi o lúmen, nos animais tratados com enalapril, o epitélio foi a estrutura predominante, semelhante ao observado no grupo controle.

Este elevado volume de epitélio seminífero observado no grupo HE foi possivelmente o responsável pela concentração normal de espermatozoides visto nesses animais. Analisando-se os resultados da avaliação espermática, pode-se notar que o enalapril ao controlar a pressão arterial promoveu a maior concentração de espermatozóides, com uma motilidade intermediária entre os grupos H e WKY, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa.

O método estereológico aplicado neste estudo foi utilizado para acessar objetivamente as diferentes estruturas do testículo com uma alta reprodutibilidade (30). Neste estudo, isso permitiu detectar alterações na morfologia dos testículos, que não foram descritas por métodos histopatológicos subjetivos ou semi-quantitativos em análises testiculares anteriores de animais hipertensos (14, 16). Embora a análise descritiva traga informações mais detalhadas das alterações de cada estrutura, a inconstância dessas variações, por vezes, faz com que o método descritivo seja muito subjetivo e falho.

Este é o primeiro estudo sobre os efeitos benéficos do enalapril sobre a morfologia dos testículos e a produção espermática. O Lisinopril, também um inibidor da enzima de conversão da angiotensina, foi associado a uma melhora da concentração e motilidade dos espermatozóides, quando administrado até 5 mg / Kg, em ratos não-hipertensos (31). Em contraste, este mesmo agente na dose 10 ou 20 mg / kg reduziu a densidade de espermatozóides, motilidade e penetração na zona pelúcida, também em ratos normotensos (32). Uma vez que esses agentes, quando administrados a animais normotensos, reduzem a pressão arterial abaixo dos níveis do grupo controle, acredita-se que níveis muito baixos de pressão possam resultar em alterações no ambiente testicular com impacto na produção de espermatozóides, assim como na hipertensão (31).

Outros anti-hipertensivos quando usados em animais normotensos também reduziram a qualidade e quantidade de espermatozóides (33, 34). Nestes estudos, os bloqueadores de canais de cálcio verapamil e nimodipina foram utilizados. De acordo com Juneja e colaboradores, o verapamil pode promover uma redução na produção de por um excesso de cálcio intracelular, que influenciaria negativamente o sistema de acoplamento mitocondrial de energia (33). No entanto, quando a nimodipina, também um bloqueador do canal de cálcio, foi utilizado em animais hipertensos, a histologia testicular foi preservada (20).

Isso reforça a hipótese de que o ambiente testicular exige condições muito perfeitas para produção dos gametas. De acordo com este conceito, os agentes anti-hipertensivos podem indiretamente melhorar a função reprodutora em animais hipertensos, por regulação da pressão sanguínea, como parte deste ambiente testicular adequado.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo, pode ser concluído que a hipertensão arterial do modelo animal SHR induz alterações morfológicas nos testículos, tanto no túbulo seminífero quanto nos vasos testiculares. Estas alterações resultaram em baixa concentração de espermatozoides. O inibidor da ECA, enalapril, ao controlar a pressão arterial, protegeu o testículo das alterações morfológicas induzidas pela hipertensão, restabelecendo a produção normal dos espermatozoides.

REFERÊNCIAS

1. Ibrahim MM, Damasceno A. Hypertension in developing countries. *Lancet*. 2012 Aug 11;380(9841):611-9.
2. Kasturi SS, Tannir J, Brannigan RE. The metabolic syndrome and male infertility. *J Androl*. 2008 May-Jun;29(3):251-9.
3. FitzGerald RJ, Murray BA, Walsh DJ. Hypotensive peptides from milk proteins. *J Nutr*. 2004 Apr;134(4):980S-8S.
4. Daemen MJ, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res*. 1991 Feb;68(2):450-6.
5. Burt VL, Whelton P, Roccella EJ *et al*. Prevalence of hypertension in the US adult population. *Hypertension*. 1995;(25):305–313.
6. Martins IS, Marucci MFN, Velásquez-Meléndez G, Coelho LT, Cervato AM. Doenças cardiovasculares ateroscleróticas, dislipidemias, hipertensão, obesidade e diabetes melito em população da área metropolitana da região Sudeste do Brasil. III – Hipertensão. *Rev Saúde Pública* 1997; 31(5):466-71.
7. Prencipe M, Casini AR, Santini M, Ferretti C, Scaldaferri N, Culasso F. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in the elderly. *J Hum Hypertens*. 2000;(14):825–830.
8. Jo I, Ahn Y, Lee J, Shin KR, Lee HK, Shin C. Prevalence, awareness, treatment, control and risk factors of hypertension in Korea. *J Hypertens*, 2001;(19):1523–1532.
9. Kalavathy MC, Thankappan KR, Sarma PS, Vasan RS. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in an elderly communitybased sample in Kerala, India. *Natl Med J India*. 2000;(13):9–15.
10. Stein AD, Stoyanovsky V, Mincheva V, Dimitrov E, Hodjeva D, Petkov A *et al*. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in a working Bulgarian population. *Eur J Epidemiol*. 2000;(16):265–270.
11. Murray CJ, Lopez AD. Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science*. 1996 Nov 1;274(5288):740-3.
12. Pinto YM, Paul M, Ganten D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res*. 1998 Jul;39(1):77-88.
13. Thandapilly SJ, Lemaistre JL, Louis XL, Anderson CM, Netticadan T, Anderson HD. Vascular and cardiac effects of grape powder in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens*. 2012 Oct;25(10):1070-6.

14. Akagashi K, Kumamoto Y, Itoh N, Tsukamoto T, Suzuki T, Ohta Y. Manidipine improves spermatogenesis in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *J Androl.* 1997 Mar-Apr;18(2):210-6.
15. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J.* 1963 Mar;27:282-93.
16. Akagashi K, Itoh N, Kumamoto Y, Tsukamoto T, Suzuki T, Ohta Y. Hypertensive changes in intratesticular arteries impair spermatogenesis of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *J Androl.* 1996 Jul-Aug;17(4):367-74.
17. Gomez RA, Lynch KR, Chevalier RL, Everett AD, Johns DW, Wilfong N, Peach MJ, Carey RM. Renin and angiotensinogen gene expression and intrarenal renin distribution during ACE inhibition. *The American journal of physiology.* 1988;254:F900-6.
18. Burla AK, Neves MF, Oigman W, Mandarim-de-Lacerda CA. Eplerenone offsets cardiac and aortic adverse remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Int J Cardiol.* 2007 Jan 2;114(1):64-70.
19. Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation. *Reprod Toxicol.* 1996 May-Jun;10(3):237-44.
20. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil.* 1984 Jan;70(1):219-28.
21. Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie.* 1970 Jun;26(1):57-60.
22. Silva RC, Costa GM, Andrade LM, Franca LR. Testis stereology, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Theriogenology.* 2010 Jan 15;73(2):157-67.
23. Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones.* 1970;1(1):2-25.
24. Javaroni V, Neves MF. Erectile dysfunction and hypertension: impact on cardiovascular risk and treatment. *Int J Hypertens.* 2012;2012:627278.
25. Pereira LM, Bezerra DG, Mandarim-de-Lacerda CA. Aortic wall remodeling in rats with nitric oxide deficiency treated by enalapril or verapamil. *Pathol Res Pract.* 2004;200(3):211-7.

26. Tamamura M, Saito M, Kinoshita Y, Shimizu S, Satoh I, Shomori K, et al. Protective effect of edaravone, a free-radical scavenger, on ischaemia-reperfusion injury in the rat testis. *BJU Int.* 2010 Mar;105(6):870-6.
27. Turkmen S, Mentese A, Karaguzel E, Karaca Y, Kucuk A, Uzun A, et al. A comparison of the effects of N-acetylcysteine and ethyl pyruvate on experimental testicular ischemia-reperfusion injury. *Fertil Steril.* 2012 Sep;98(3):626-31.
28. Amador A, Steger RW, Bartke A, Johns A, Hayashi RH, Stallings MH. Pituitary and testicular function in spontaneously hypertensive rats. *J Androl.* 1983 Jan-Feb;4(1):67-70.
29. Safarinejad MR, Azma K, Kolahi AA. The effects of intensive, long-term treadmill running on reproductive hormones, hypothalamus-pituitary-testis axis, and semen quality: a randomized controlled study. *J Endocrinol.* 2009 Mar;200(3):259-71.
30. Johnson L, Neaves WB. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *Biol Reprod.* 1981 Apr;24(3):703-12.
31. Okeahialam BN, Amadi K, Ameh AS. Effect of lisinopril, an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor on spermatogenesis in rats. *Arch Androl.* 2006 May-Jun;52(3):209-13.
32. Saha L, Garg SK, Bhargava VK, Mazumdar S. Role of angiotensin-converting enzyme inhibitor, lisinopril, on spermatozoal functions in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2000 Apr;22(3):159-62.
33. Juneja R, Gupta I, Wali A, Sanyal SN, Chakravarti RN, Majumdar S. Effect of verapamil on different spermatozoal functions in guinea pigs--a preliminary study. *Contraception.* 1990 Feb;41(2):179-87.
34. Saha L, Bhargava VK, Garg SK, Majumdar S. Effect of nimodipine on male reproductive functions in rats. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2000 Oct;44(4):449-55.

APÊNDICE A – Soluções utilizadas no experimento

Formalina Tamponada

Formalina tamponada neutral (pH=7,0) de Lillie

- Formaldeído pa (40%) 100ml
- Na_2HPO_4 (Fosfato de sódio bibásico anidro pa)..... 6,5g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ (Fosfato de sódio monobásico, pa)..... 4,0g
- Água destilada..... 900ml

* Gotejar NaOH ou HCl na solução até conseguir o pH desejado

Solução de Bouin

- 70% Saturated picric acid 3000.0 ml
- 25% Formaldehyde 1000.0 ml
- 5% Glacial acetic acid 200.0 ml

PBS

PBS – solução estoque – PH 7,2

- NaCl (Cloreto de sódio) 40,0g
- KCl (cloreto de potássio) 1,0g
- NaH_2PO_4 1,0g
- Na_2HPO_4 5,75g
- Água destilada 1L

* Diluir 1:10 para solução de trabalho

PBS / BSA

- 0,5 g de Albumina Sérica Bovina
- 100 ml PBS – Solução trabalho

Solução hipo-osmótica

- Citrato de sódio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,735g
- Frutose..... 1,351 g
- Água destilada..... 1000ml

APÊNDICE B – Artigo submetido para revista ANDROLOGY

ANDROLOGY
American Society of Andrology

AS-A

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

SCHOLARONETM
Manuscripts

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Diogo de Souza

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Andrology*.

Manuscript ID:	ANDR-2012-0237
Title:	EVALUATION OF TESTICULAR MORPHOLOGY AND SPERMATOZOID PARAMETERS IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS TREATED OR NOT WITH ENALAPRIL
Authors:	Bechara, Gustavo Simões, Michele Felix-Patricio, Bruno Medeiros Jr., Jorge de Souza, Diogo Costa, Waldemar Sampaio, Francisco
Date Submitted:	13-Nov-2012

 Print  Return to Dashboard

ScholarOne ManuscriptsTM v4.10.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2012. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

 Follow ScholarOne on Twitter

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

EVALUATION OF TESTICULAR MORPHOLOGY AND SPERMATOZOID PARAMETERS IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS TREATED OR NOT WITH ENALAPRIL

Gustavo R. Bechara¹; Michele Simões¹; Bruno Felix-Patrício^{1, 2}; Jorge L. Medeiros Jr.¹; Diogo B. de Souza¹; Waldemar S. Costa¹; Francisco J. Sampaio¹

1 – Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, Brazil

2 – Dept. of Morphology, Fluminense Federal University, Rio das Ostras, Brazil

Running head: HYPERTENSION, ENALAPRIL & SPERMATOGENESIS

This work was conducted at Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

This study was received grants from the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil.

Correspondence to:

Diogo Benchimol de Souza, D.V.M., Ph.D.

Urogenital Research Unit – UERJ

Av. 28 de Setembro, 87, Fundos, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

ZIP-CODE: 20551-030

Phone: +55 21 2868-8399

e-mail: diogobenchimol@gmail.com

ABSTRACT

Objective: The target organ damage is well documented in arterial hypertension, but testicular and spermatozoid damage are not clearly defined. This study evaluates the testicular morphology and spermatozoid parameters of spontaneously hypertensive rats (SHR) with or without enalapril treatment.

Materials and Methods: SHR rats were assigned into two groups, a hypertensive group (H), and an enalapril treated group (HE). Wistar-Kyoto rats (WKY) were used as controls. Systolic blood pressure was measured weekly until the end of the experiment. The spermatozoid concentration, motility and viability were determined in epididimal tail collected sample. Stereological methods were used to objectively analyze testicular morphology macroscopically and microscopically. All data was compared by ANOVA with Tukey's post test, considering $p < 0.05$ as significant.

Results: Systolic blood pressure in the HE group were similar WKY animals, and lower than H animals. Sperm concentration of the H group was lower than WKY. Enalapril improved this parameter and HE was similar to WKY. Testicular vascular volumetric density was also altered in hypertensive group while HE animals were similar to controls. The seminiferous epithelium of HE animals showed the highest volumetric density, indicating a possible positive effect of enalapril in spermatogenesis.

Conclusion: In this animal model, hypertension promoted morphological changes in the testicle with consequences on spermatozoid production. Enalapril treatment partially protected the testicle from these alterations, restoring normal spermatozoid production.

Keywords: Testis; Spermatogenesis; Sperm quality parameters; Animal models, rat.

INTRODUCTION

Arterial hypertension is a major public health problem, usually associated with other disorders such as obesity, diabetes, kidney disease, atherosclerosis, stroke and identified as one of the most prevalent risk factors for developing cardiovascular diseases (Ibrahim and Damasceno, 2012).

Target organs, such as heart, kidney, brain and eyes, are very commonly affected in hypertensive patients. However the testicular damage caused by hypertension has not been clearly defined (Kasturi, et al., 2008). Hypertension is a well-established risk factor for erectile dysfunction, but its relation to testicular damage and male fertility is not clearly understood (Kasturi, Tannir and Brannigan, 2008).

Both testosterone and sex hormone-binding globulin are diminished in adult and elderly hypertensive patients (Fogari, et al., 2002, Fogari, et al., 2005, Fogari, et al., 2002, Svartberg, et al., 2004), and thus one should imagine that testicular morphology and reproductive function may be also altered. In a hypertensive animal model, some morphological changes were found both in arterial vessels and in seminiferous tubule (Akagashi, et al., 1996). However, the impact of hypertension on spermatozoid analysis is still unknown. Also, an objective assessment of the different testicular structures in a hypertensive animal model with morphometrical and stereological methods are lacking not known.

Antihypertensive agents may also be implicated in the role of reproduction and sexuality. Some of these drugs decrease serum testosterone (Fogari, Zoppi, Preti, Rinaldi, Marasi, Vanasia and Mugellini, 2002, Koshida, et al., 1998, Suzuki, et al., 1988) in humans, and, in a controversial manner, decrease (Juneja, et al., 1990, Saha, et al., 2000, Saha, et al., 2000) or increase (Akagashi, et al., 1997, Okeahialam, et al., 2006) semen quality and testicular morphology in animal models. Thereby, according to Okeahialam (Okeahialam, Amadi and Ameh, 2006) angiotensin converting enzyme inhibitors would be the appropriate first line treatment for hypertension when fertility is a relevant concern.

This study aims to evaluate the influence of hypertension untreated or treated with enalapril, an angiotensin converting enzyme inhibitor, on reproductive function and testicular morphology in spontaneously hypertensive rats (SHR).

MATERIALS AND METHODS

Animals and procedures

We used 36 twelve-weeks-old male rats, 28 of SHR strain and 08 of Wistar-Kyoto strain, created in our laboratory. The rats were kept in a room with controlled temperature (25 ± 1 °C) and with artificial dark–light cycle (lights on from 7:00 am to 7:00 pm) and were fed standard rat food and water *ad libitum*. All experiments were done according to the Brazilian law for scientific use of animals, and this project was formally approved by the local Ethics Committee.

All animals underwent to a period of adaptation from the 12th to the 16th week when tap water were daily administered by *gavage* and blood pressure was weekly assessed.

With 17th weeks of life SHRs were randomly assigned into two groups, untreated (H, n=13) or treated (HE, n=15). Animals of group H received two milliliters of tap water daily by *gavage* during five weeks, while HE rats were treated with 30mg/Kg of enalapril (Gomez, et al., 1988) (Primordium, Rio de Janeiro, Brazil) diluted in the same volume of water and administered by the same route and period of group H. Age matched Wistar-Kyoto rats were employed as a control group (WKY, n=8) and received exactly the same protocol as group H.

Arterial systolic pressure was measured in conscious rats by the non-invasive method of tail-cuff plethysmography (Filgueira, et al., 2012). The mean of three recordings was used as the systolic blood pressure. During the period of adaptation, blood pressure was measured to minimize the stress caused by the procedure.

All animals were killed with 22 weeks of age by anesthetic overdose. The right epididymis was promptly removed and used for spermatozoid collection while both testicles were used for morphological analysis.

Spermatozoid evaluation

The epididimal tail were dissected, sectioned several times and immersed in 5 ml of 0.5% PBS-BSA for spermatozoid collection (Seed, et al., 1996). After this dilution, the spermatozoid concentration and motility were assessed in a Neubauer chamber. For this purpose, at least 200 spermatozooids were evaluated per animal. Both progressive and nonprogressive cells were considered motile. All manipulation of spermatozoid was carried under 37°C.

Also, spermatozoid viability was assessed by the hypo-osmotic test as described elsewhere (Jeyendran, et al., 1984). Briefly, the cells were maintained in a hypo-osmotic solution (100 mOsm / L) during 30 min, after which normal spermatozoid (with cellular membrane permeability) presents folding tail. The results were expressed in percentage of viable spermatozoids. Again, no less than 200 cells were examined per animal (Jeyendran, Van der Ven, Perez-Pelaez, Crabo and Zaneveld, 1984).

Morphological evaluations

After euthanasia, the right testicles were dissected from its appendices, weighed and their volume measured using the Scherle's method (Scherle, 1970). Subsequently the organ was cleaved at its proximal pole and fixed by immersion in Bouin's solution during 12 hours. After this period, testicles were cleaved in nearly 3 millimeters transversal sections and immersed in 4% buffered formaldehyde.

These fragments were processed for paraffin embedding for obtaining 5 μ m thickness histological sections. Morphometric and semi-quantitative analysis were performed in hematoxylin & eosin stained slices captured in an Olympus BX51 microscope with a coupled DP70 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan).

The volumetric density of testicular structures was assessed by the point-counting-method (Benchimol de Souza, et al., 2011). Using the ImageJ software (NIH, Bethesda, Maryland, USA), a test grid with 100 points was superimposed to the testicular photomicrographs. Every point-touched structure was counted and its density was expressed in percentage of the analyzed field (de Souza, et al., 2012). For each animal, 50 fields were evaluated under 400x magnification. The volumetric densities of the following structures were assessed: basement membrane, seminiferous epithelium, tubular lumen, seminiferous tubule (the sum of these first three structures), vessels and intertubular compartment (including vessels) (Johnson and Neaves, 1981).

The absolute volume of each of the above mentioned structure, expressed in milliliters, was calculated by dividing the testicular volume by the volumetric density of the structure.

The diameter of 125 seminiferous tubules per animal was measured in each testis by applying a straight line crossing the tubule. For this purpose we used the ImageJ software, previously calibrated for the magnification of 100X. The line was

applied in a manner that it always passes through the center of the tubule. For this analysis tubules with irregular shapes were excluded.

Also with the ImageJ software, the seminiferous epithelium height of randomly picked tubules was measured in each testis. Three equidistant straight lines were drawn from the basement membrane to the inner spermatids. The mean of these three lines was considered the epithelium height of the tubule, and 125 tubules were assessed per animal. In this analysis, images were photographed at 200x magnification.

Johnsen's score were used for semi-quantitative evaluation of the seminiferous epithelium (Johnsen, 1970). Briefly, a score of 1 to 10 was given to each tubule according to the maturity of the germ cells: 10, complete spermatogenesis, with many spermatozoa, and germinal epithelium organized with a regular thickness, leaving an open lumen; 9, many spermatozoa present but germinal epithelium disorganized with marked sloughing or obliteration of the lumen; 8, only a few spermatozoa (fewer than 5 to 10) present; 7, no spermatozoa but many spermatids present; 6, no spermatozoa and only a few spermatids (fewer than 5 to 10) present; 5, no spermatozoa and no spermatids but several or many spermatocytes present; 4, only a few spermatocytes (fewer than 5) and no spermatids or spermatozoa present; 3, spermatogonia the only germ cells present; 2, no germ cells, but Sertoli cells present; and 1, no cells present in tubular section. For this purpose, at least 50 tubules per animal were examined under 400x magnification.

Statistical analysis

The one-way ANOVA, followed by Tukey's post test were used for mean comparisons. In all cases, significance was set at a probability value of 0.05. All analyzes were performed using GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

RESULTS

The systolic blood pressure of all SHR rats at 12 weeks was greater than 200 mmHg (238 ± 24 ; mean $\pm$ standard deviation) and remained elevated throughout the experiment until the sixteenth week. After the beginning of enalapril treatment to group HE, systolic pressures values decreased to lower than 160 mmHg values, while group H pressure remained high. At the 21st week, blood pressure of HE animals was significantly lower than H animals, and statistically similar to WKY animals. The blood pressure of WKY remained about 150 mmHg during all the experiment (Figure 1).

The analysis of spermatozoid concentration showed a 38% reduction in hypertensive rats when compared to normotensive. The enalapril treatment was effective in avoiding the diminishment of spermatozoid concentration, since no difference was found between HE and WKY animals in this parameter (Figure 2). Concerning spermatozoid motility and viability, no difference was found among the groups. The numerical results of spermatozoid evaluation are presented in table 1.

The testicular weight and volume of both H and HE groups were higher than the WKY animals but no difference were found when comparing the two SHRs groups.

The volumetric density and absolute volume of the testicular structures were the mostly affected parameters. The seminiferous tubule volumetric density and absolute volume of H and HE groups were augmented in relation to WKY animals. Analyzing each part of the tubule, it was found that animals from group H had an increased on the volumetric density of lumen in comparison to the other groups. When absolute volume is compared, the three experimental groups presented statistically different means. In this analysis, the H group had the higher luminal volume while WKY had the lower values and HE stay with intermediary values.

Nevertheless, regarding the seminiferous epithelium, the most important parenchymal structure here analyzed, HE group presented the higher volumetric density and absolute volume as seen in figure 3. The basement membrane relative and absolute volumes were higher in the WKY animals when compared to both H and HE groups.

In respect to the intertubular compartment, WKY animals had the higher volumetric density in comparison to H and HE groups which were 21% and 16% reduced, respectively.

However, when analyzing the absolute volume of the intertubular compartment, no difference was found among the groups.

Finally, the vascular volumetric density was augmented in the hypertensive animals from the H group in comparison to WKY and HE animals which did not presented difference between them. When studying the absolute values of the vessels, it was found that H animals had an increased volume while HE animal has intermediary values to the lower, WKY animals.

The analysis of seminiferous tubule diameter, epithelium height and Johnsen's score showed no significant difference among the studied groups.

The numeric results of all morphological evaluations are presented in table 2. Figure 4 shows a representative histological image of each group.

DISCUSSION

The spontaneously hypertensive rats (SHR) are genetically selected animals used as a model of essential hypertension because it develops naturally a high arterial blood pressure with end-organ and vascular alterations (Pinto, et al., 1998, Thandapilly, et al., 2012). As such, this is the most used model to study hypertension and other cardiovascular and associated diseases (Pinto, Paul and Ganten, 1998). In this studied we confirmed the arterial systolic hypertension in each SHR animals before the beginning of the treatment. Also, enalapril, as expected, was able to reduce blood pressure on HE animals.

Since the vascular changes of hypertension is well correlated with different organic injuries leading to diseases such as erectile dysfunction (Javaroni and Neves, 2012) it is highly presumptive that the very delicate germinal epithelium may also be affected by this systemic disease.

Akagashi and colleagues showed that intratesticular arteries of a similar animal model (the stroke-prone SHR) present hyaline and fibrinoid degeneration (Akagashi, Itoh, Kumamoto, Tsukamoto, Suzuki and Ohta, 1996). These alterations were described as causing an atrophy of the seminiferous tubules, possibly by a hypo-perfusion and poor nutrition of the organ (Akagashi, Itoh, Kumamoto, Tsukamoto, Suzuki and Ohta, 1996). In our analysis, the SHR animals without treatment showed a higher vascular volume (almost twice than the normotensive controls) confirming that some intratesticular vascular alterations occurs secondary to hypertension in this rat model.

The results from the enalapril treated group indicate that the vascular alterations can be somehow prevented by this ACE inhibitor. It has been previously reported that enalapril partially prevents the vascular remodeling in the thoracic aorta of hypertensive rats (Pereira, et al., 2004), however in testicular vasculature, this was not previously demonstrated. Specifically about the intratesticular arteries, the calcium channel blocker manidipine also proved to prevent damage by lowering the blood pressure (Akagashi, Kumamoto, Itoh, Tsukamoto, Suzuki and Ohta, 1997).

It has been previously cogitated that the vascular changes in the testicle leads to spermatogenesis alterations by an insufficiency of Sertoli cells in receiving oxygen and nutrients from blood and supplying the epithelium (Akagashi, Itoh, Kumamoto, Tsukamoto, Suzuki and Ohta, 1996, Akagashi, Kumamoto, Itoh, Tsukamoto, Suzuki

and Ohta, 1997). Although this theory was not tested in the present study, it may explain the alterations promoted by hypertension in the animals of group H.

It is well known that the seminiferous epithelium cells are sensitive to ischemia. However, the mechanism by which the ischemic damage occurs remains unclear. The effects of ischemia on seminiferous epithelium are commonly studied in an acute and complete ischemic environment, by clamping or twisting the testicular arteries (Tamamura, et al., 2010, Turkmen, et al., 2012). However it would be of interest to have an experimental model to evaluate the effect of different degrees of hypoperfusion in spermatogenesis.

In this model of hypertensive rats, major testicular alterations were found, including a higher testicular weight and volume. However, the SHR strain is known to have a higher testicular weight in comparison to its Wistar Kyoto controls (Amador, et al., 1983). Other particularities of SHR animals are increased serum levels of prolactin and follicular stimulating hormone and diminished testosterone, both important hormones enrolled in the regulation of reproduction function (Safarinejad, et al., 2009). It is not known if the hormonal alteration in this strain is caused by the inbreeding selection of these animals or by the vascular changes itself (Amador, Steger, Bartke, Johns, Hayashi and Stallings, 1983). In humans the relation of hypertension and reduced levels of testosterone is well established (Fogari, Preti, Derosa, Marasi, Zoppi, Rinaldi and Mugellini, 2002, Fogari, Preti, Zoppi, Fogari, Rinaldi, Corradi and Mugellini, 2005, Fogari, Zoppi, Preti, Rinaldi, Marasi, Vanasia and Mugellini, 2002, Svartberg, von Muhlen, Schirmer, Barrett-Connor, Sundfjord and Jorde, 2004). Further studies investigating the endocrine profile of SHR with and without antihypertensive agents would help in elucidating these questions.

In this experiment, by reducing the blood pressure and then restoring normal testicular environment, enalapril was partially efficient in preventing the tubular alterations promoted by hypertension. Both SHR groups had higher seminiferous tubule volume. However, while in untreated hypertensive animals the larger structure of the tubule was the lumen, in the enalapril animals, the epithelium was the main structure, similarly to what happened in controls.

This elevated seminiferous epithelium volume in group HE was probably responsible to the normal spermatozoid concentration seen in these animals. Analyzing the results of spermatozoid evaluation, it can be noted that the enalapril

promoted the highest concentration with intermediate motility, although these differences were not statistically significant.

The stereological method applied in this study was designed to objectively access the different structures of the testicle with a high reproducibility (Johnson and Neaves, 1981, Silva, et al., 2010). In this experiment, it allowed to detect modifications in the testicular morphology that were not described by subjective or semi-quantitative histopathological methods on previously hypertensive animals testicular analysis (Akagashi, Itoh, Kumamoto, Tsukamoto, Suzuki and Ohta, 1996, Akagashi, Kumamoto, Itoh, Tsukamoto, Suzuki and Ohta, 1997). Although a descriptive analysis brings more detailed information about each structure alterations, the inconstancy of these variations sometimes makes the descriptive method very subjective and flawed.

This is the first report of the beneficial effects of enalapril on the testicular morphology and spermatozoid production. Lisinopril, also an ACE inhibitor, was associated to an improved spermatozoid concentration and motility, in a dose dependent manner until 5 mg/Kg, in non-hypertensive rats (Okeahialam, Amadi and Ameh, 2006). In contrast, this same agent at 10 or 20 mg/Kg reduced spermatozoid density, motility and penetration on zona pellucida (Saha, Garg, Bhargava and Mazumdar, 2000) also in normotensive rats. Since these agents were administered to normotensive animals, it reduced blood pressure below control levels (Okeahialam, Amadi and Ameh, 2006). It seems that when arterial pressure goes very lower, there is also an alteration in testicular environment with impact in testicular production as seen in hypertension.

Other anti-hypertensive drugs when used in normotensive animals also reduced the spermatozoid quality and quantity (Juneja, Gupta, Wali, Sanyal, Chakravarti and Majumdar, 1990, Saha, Bhargava, Garg and Majumdar, 2000). In these studies the calcium channel blockers verapamil and nimodipine were used. According to Juneja and colleagues, the verapamil may promote poor spermatozoid production by an excess of intracellular calcium which negatively influences the mitochondrial energy coupling system (Juneja, Gupta, Wali, Sanyal, Chakravarti and Majumdar, 1990). However, when nimodipine, also a calcium channel blocker, was used in hypertensive animals, testicular histology was preserved (Akagashi, Kumamoto, Itoh, Tsukamoto, Suzuki and Ohta, 1997). This reinforces the hypothesis that the testicular environment requires quite perfect conditions for gamete

production. According to this concept, antihypertensive agents may improve the reproductive function in hypertensive individuals by regulating blood pressure, as part of this normal testicular environment.

The arterial hypertension of the SHR animal model induces testicular morphological alterations both in seminiferous tubule and in intratesticular vessels with lower spermatozoid concentration. Enalapril partially protected the testicle from the hypertension-induced alterations.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was received grants from the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil.

AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

No competing financial interests exist.

REFERENCES

- Akagashi K, Itoh N, Kumamoto Y, Tsukamoto T, Suzuki T, Ohta Y. Hypertensive changes in intratesticular arteries impair spermatogenesis of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Journal of andrology*. 1996;17:367-74.
- Akagashi K, Kumamoto Y, Itoh N, Tsukamoto T, Suzuki T, Ohta Y. Manidipine improves spermatogenesis in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Journal of andrology*. 1997;18:210-6.
- Amador A, Steger RW, Bartke A, Johns A, Hayashi RH, Stallings MH. Pituitary and testicular function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of andrology*. 1983;4:67-70.
- Benchimol de Souza D, Silva D, Marinho Costa Silva C, Barcellos Sampaio FJ, Silva Costa W, Martins Cortez C. Effects of immobilization stress on kidneys of Wistar male rats: a morphometrical and stereological analysis. *Kidney & blood pressure research*. 2011;34:424-9.
- de Souza DB, Silva D, Cortez CM, Costa WS, Sampaio FJ. Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats. *Journal of andrology*. 2012;33:735-9.
- Filgueira FP, Lobato NS, DosSantos RA, Oliveira MA, Akamine EH, Tostes RC, Fortes ZB, Carvalho MH. Endogenous testosterone increases leukocyte-endothelial cell interaction in spontaneously hypertensive rats. *Life sciences*. 2012;90:689-94.
- Fogari R, Preti P, Derosa G, Marasi G, Zoppi A, Rinaldi A, Mugellini A. Effect of antihypertensive treatment with valsartan or atenolol on sexual activity and plasma testosterone in hypertensive men. *European journal of clinical pharmacology*. 2002;58:177-80.
- Fogari R, Preti P, Zoppi A, Fogari E, Rinaldi A, Corradi L, Mugellini A. Serum testosterone levels and arterial blood pressure in the elderly. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2005;28:625-30.
- Fogari R, Zoppi A, Preti P, Rinaldi A, Marasi G, Vanasia A, Mugellini A. Sexual activity and plasma testosterone levels in hypertensive males. *American journal of hypertension*. 2002;15:217-21.
- Gomez RA, Lynch KR, Chevalier RL, Everett AD, Johns DW, Wilfong N, Peach MJ, Carey RM. Renin and angiotensinogen gene expression and intrarenal renin distribution during ACE inhibition. *The American journal of physiology*. 1988;254:F900-6.

- Ibrahim MM, Damasceno A. Hypertension in developing countries. *Lancet*. 2012;380:611-9.
- Javaroni V, Neves MF. Erectile dysfunction and hypertension: impact on cardiovascular risk and treatment. *International journal of hypertension*. 2012;2012:627278.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of reproduction and fertility*. 1984;70:219-28.
- Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*. 1970;1:2-25.
- Johnson L, Neaves WB. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *Biology of reproduction*. 1981;24:703-12.
- Juneja R, Gupta I, Wali A, Sanyal SN, Chakravarti RN, Majumdar S. Effect of verapamil on different spermatozoal functions in guinea pigs--a preliminary study. *Contraception*. 1990;41:179-87.
- Kasturi SS, Tannir J, Brannigan RE. The metabolic syndrome and male infertility. *Journal of andrology*. 2008;29:251-9.
- Koshida H, Takeda R, Miyamori I. Lisinopril decreases plasma free testosterone in male hypertensive patients and increases sex hormone binding globulin in female hypertensive patients. *Hypertension research*. 1998;21:279-82.
- Okeahialam BN, Amadi K, Ameh AS. Effect of lisinopril, an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor on spermatogenesis in rats. *Archives of andrology*. 2006;52:209-13.
- Pereira LM, Bezerra DG, Mandarim-de-Lacerda CA. Aortic wall remodeling in rats with nitric oxide deficiency treated by enalapril or verapamil. *Pathology, research and practice*. 2004;200:211-7.
- Pinto YM, Paul M, Ganten D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovascular research*. 1998;39:77-88.
- Safarinejad MR, Azma K, Kolahi AA. The effects of intensive, long-term treadmill running on reproductive hormones, hypothalamus-pituitary-testis axis, and semen

quality: a randomized controlled study. *The Journal of endocrinology*. 2009;200:259-71.

Saha L, Bhargava VK, Garg SK, Majumdar S. Effect of nimodipine on male reproductive functions in rats. *Indian journal of physiology and pharmacology*. 2000;44:449-55.

Saha L, Garg SK, Bhargava VK, Mazumdar S. Role of angiotensin-converting enzyme inhibitor, lisinopril, on spermatozoal functions in rats. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*. 2000;22:159-62.

Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*. 1970;26:57-60.

Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, Klinefelter GR, Makris SL, Perreault SD, Schrader S, Seyler D, Sprando R, Treinen KA, Veeramachaneni DN, Wise LD. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation. *Reproductive toxicology*. 1996;10:237-44.

Silva RC, Costa GM, Andrade LM, Franca LR. Testis stereology, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Theriogenology*. 2010;73:157-67.

Suzuki H, Tominaga T, Kumagai H, Saruta T. Effects of first-line antihypertensive agents on sexual function and sex hormones. *Journal of hypertension Supplement*. 1988;6:S649-51.

Svartberg J, von Muhlen D, Schirmer H, Barrett-Connor E, Sundfjord J, Jorde R. Association of endogenous testosterone with blood pressure and left ventricular mass in men. The Tromso Study. *European journal of endocrinology*. 2004;150:65-71.

Tamamura M, Saito M, Kinoshita Y, Shimizu S, Satoh I, Shomori K, Dimitriadis F, Satoh K. Protective effect of edaravone, a free-radical scavenger, on ischaemia-reperfusion injury in the rat testis. *BJU international*. 2010;105:870-6.

Thandapilly SJ, Lemaistre JL, Louis XL, Anderson CM, Netticadan T, Anderson HD. Vascular and cardiac effects of grape powder in the spontaneously hypertensive rat. *American journal of hypertension*. 2012;25:1070-6.

Turkmen S, Mentese A, Karaguzel E, Karaca Y, Kucuk A, Uzun A, Yulug E, Turedi S. A comparison of the effects of N-acetylcysteine and ethyl pyruvate on experimental testicular ischemia-reperfusion injury. *Fertility and sterility*. 2012;98:626-31.

TABLES

Table 1. Spermatozoid evaluation of normotensive (WKY), hypertensive (H) and enalapril treated hypertensive (HE) animals.

	WKY	H	HE	p value
Spermatozoid concentration (sptz. 10^7 /ml)	2.11 $\pm$ 0.34	1.31 ^a $\pm$ 0.27	2.46 $\pm$ 0.54	0.0009
Spermatozoid motility (%)	60.8 $\pm$ 15.1	49.3 $\pm$ 7.4	56.9 $\pm$ 7.9	0.2224
Spermatozoid viability (%)	54.1 $\pm$ 4.4	58.4 $\pm$ 8.7	54.0 $\pm$ 15.9	0.7507

Data presented as mean $\pm$ SD

Table 2. Morphological evaluation of normotensive (WKY), hypertensive (H) and enalapril treated hypertensive (HE) animals.

	WKY	H	HE	p value
Testicular weight (g)	1.26 ^a $\pm$ 0.08	1.68 $\pm$ 0.14	1.62 $\pm$ 0.21	< 0.0001
Testicular volume (ml)	1.22 ^a $\pm$ 0.08	1.63 $\pm$ 0.14	1.57 $\pm$ 0.21	< 0.0001
Vv [seminiferous tubule] (%)	92.2 ^a $\pm$ 0.4	93.8 $\pm$ 0.4	93.4 $\pm$ 0.3	< 0.0001
Seminiferous tubule volume (ml)	1.12 ^a $\pm$ 0.07	1.53 $\pm$ 0.01	1.46 $\pm$ 0.20	< 0.0001
Vv [tubular lumen] (%)	38.6 $\pm$ 0.9	54.4 ^a $\pm$ 1.6	38.4 $\pm$ 1.0	< 0.0001
Tubular lumen volume (ml)	0.47 ^a $\pm$ 0.02	0.89 ^b $\pm$ 0.02	0.60 ^c $\pm$ 0.09	< 0.0001
Vv [seminiferous epithelium] (%)	44.1 ^a $\pm$ 0.7	33.0 ^b $\pm$ 1.1	48.9 ^c $\pm$ 0.8	< 0.0001
Seminiferous epithelium volume (ml)	0.53 $\pm$ 0.03	0.54 $\pm$ 0.02	0.76 ^a $\pm$ 0.09	< 0.0001
Vv [basement membrane] (%)	9.40 ^a $\pm$ 0.82	6.38 $\pm$ 0.51	6.00 $\pm$ 0.48	< 0.0001
Basement membrane volume (ml)	0.11 ^a $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01	0,0080
Vv [intertubular compartment] (%)	7.79 ^a $\pm$ 0.44	6.15 $\pm$ 0.48	6.55 $\pm$ 0.31	< 0.0001
Intertubular compartment volume (ml)	0.09 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	0.3810
Vv [vascular] (%)	1.05 $\pm$ 0.27	1.46 ^a $\pm$ 0.18	1.19 $\pm$ 0.08	0.0007
Vascular volume (ml. 10^2)	1.3 ^a $\pm$ 0.3	2.4 ^b $\pm$ 0.3	1.8 ^c $\pm$ 0.2	< 0.0001
Seminiferous tubule diameter (μ m)	296 $\pm$ 7	292 $\pm$ 7	297 $\pm$ 10	0.4928
Epithelium height (μ m)	50.3 $\pm$ 2.3	47.8 $\pm$ 1.8	48.9 $\pm$ 2.4	0.0884
Johnsen's score	9.3 $\pm$ 0.1	9.4 $\pm$ 0.1	9.2 $\pm$ 0.2	0.2523

Vv: volumetric density. Data presented as mean $\pm$ SD

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Mean systolic blood pressure of the animals during the experiment. Note that animals from group HE started the experiment with hypertension and presented a decrease in blood pressure until reaching normal values at the 21st week of life.

Figure 2. Spermatozoid concentration of controls (WKY), hypertensive (H) and enalapril treated (HE) animals. Note that H animals had a diminished concentration that was prevented by enalapril. * $p < 0.05$. Data presented as mean $\pm$ SD.

Figure 3. Seminiferous epithelium volumetric density of the studied groups showing the prejudice of hypertension in this parameter while HE group had the highest values. Data presented as mean $\pm$ SD.

Figure 4. Representative testicular histological sections of WKY (a), H (b) and HE (c) animals showing the diminished seminiferous epithelium and augmented vascular volumetric density in the hypertensive animals. Hematoxylin & eosin, 200X.

ANEXO – Comissão de ética para o cuidado e uso de animais experimentais



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/051/2012** sobre **“ESTUDO ESTRUTURAL, ULTRAESTRUTURAL E MOLECULAR DOS EFEITOS DE DIFERENTES TRATAMENTOS NO SISTEMA UROGENITAL DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS”**, sob a responsabilidade de **Waldemar da Silva Costa**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em **03/10/2012**. Este certificado expira em **03/10/2016**.

Rio de Janeiro, 03 de Outubro de 2012.

Profa. Patricia Cristina Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Profª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva

Profª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas IBRAG/UERJ

Matricula 34765-8

(21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br