



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

LÍVIA CUQUETTO LEITE

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DO EXTRATO DA
CASCA DE JABOTICABA FRENTE À SENESCÊNCIA E
OBESIDADE SOBRE O TESTÍCULO E EPIDIDIMO DE
CAMUNDONGOS (FVB).”**

**“THERAPEUTIC EFFECT OF JABOTICABA PEEL EXTRACT ON
SENESCENCE AND OBESITY, AS OBSERVED IN THE TESTIS
AND EPIDIDYMIS OF FVB MICE.”**

**CAMPINAS
2019**

LÍVIA CUQUETTO LEITE

AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DO EXTRATO DA CASCA DE JABUTICABA FRENTE À SENESCÊNCIA E OBESIDADE SOBRE O TESTÍCULO E EPIDIDIMO DE CAMUNDONGOS (FVB).

THERAPEUTIC EFFECT OF JABOTICABA PEEL EXTRACT ON SENESCENCE AND OBESITY, AS OBSERVED IN THE TESTIS AND EPIDIDYMISS OF FVB MICE.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutora em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular.

Thesis presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for a doctorate degree in Cellular and Structural Biology, in the area of Cell Biology.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA LÍVIA CUQUETTO LEITE E ORIENTADA PELA Dra. MARY ANNE HEIDI DOLDER

Orientadora: MARY ANNE HEIDI DOLDER

**CAMPINAS
2019**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C922 Cuquetto-Leite, Livia, 1991-
Avaliação do efeito terapêutico do extrato da casca de jaboticaba frente à senescência e obesidade sobre o testículo e epidídimo de camundongos (FVB) / Livia Cuquetto Leite. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Mary Anne Heidi Dolder.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Aparelho genital masculino. 2. Antioxidantes. 3. Envelhecimento. 4. Sobrepeso. I. Dolder, Mary Anne Heidi, 1943-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Therapeutic effect of jaboticaba peel extract on senescence and obesity, as observed in the testis and epididymis of FVB mice

Palavras-chave em inglês:

Generative organs, Male

Antioxidants

Aging

Overweight

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Mary Anne Heidi Dolder [Orientador]

Rejane Maira Góes

Cristina Pontes Vicente

Bruna Fontana Thomazini

Raquel Vaz Hara

Data de defesa: 09-09-2019

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-9842-2911>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0257369742033612>

Campinas, 09 de setembro de 2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

Profa. Dra. Rejane Maira Góes

Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente

Profa. Dra. Bruna Fontana Thomazini

Profa. Dra. Raquel Vaz Hara Jardim

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Agradecimentos

À **Deus e à vida** por me permitir estar exatamente onde eu preciso estar

Aos meus pais **Rosana e Edilmar** por apoiarem minhas decisões e estarem presentes em cada momento da minha vida.

Ao meu companheiro de vida, **Yohan**. Obrigada por me acompanhar aos finais de semana na Unicamp, e alimentar e me hidratar quando eu esquecia/esqueço de fazê-los!

À minha orientadora **Dra. Mary-Anne Heidi Dolder**, por me acolher em seu laboratório e me auxiliar tanto na vida acadêmica como fora dela. Você é um exemplo de pessoa a ser seguido, sou sua fã!

Aos meus amigos do **Laboratório Microscopia e Biologia da Reprodução**, **Jhonne Torres, Cristina Capucho, Ianny Brum Reis e Bruna Fontana Thomazini**, por contribuírem direta e indiretamente na realização deste trabalho. Obrigada pelas viagens, momentos de descontração e pelos ensinamentos de vida também.

Ao meu amigo, **Michel Montezol**, pelos ensinamentos trocados e pelas discussões filosóficas sobre a vida.

Aos meus colegas do **Laboratório Biologia da Reprodução**, **Andressa Bassegio, Celina de Almeida Lamas, Ellen Pangrazi, Isabella Rosseto Urra, Jessica Vale, Larissa Akemi Kido de Barros e Raquel Frenedoso da Silva**, por compartilharem experiências científicas, pela troca de ensinamentos, assim como pela confiança e respeito construídos nesses últimos anos.

À professora **Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete**, por apoiar desde o início a empreitada deste trabalho e pelo acolhimento em seu laboratório em todas as técnicas que era preciso realizar.

À **Celina de Almeida Lamas**, amiga, parceira de bancada e de viagens, por me proporcionar participar desse grandioso projeto. Obrigada por me ensinar cada técnica que desenvolvi nesse trabalho assim como pelos momentos de descontração. Minha gratidão à você!

Aos funcionários do **Departamento de Biologia Estrutural e Funcional** pela contribuição direta e indireta para a execução deste trabalho.

À **Liliam Alves Senne Panagio**, por sua competência, prontidão e eficiência com que desenvolveu seu trabalho. Muito obrigada também pela sua amizade!

À **Universidade Estadual de Campinas** por me proporcionar com excelência o acesso ao saber durante os anos de pós-graduação.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural** à sua coordenação pelo incentivo à pesquisa científica e ao aprimoramento acadêmico de seus alunos.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo fomento financeiro (Processo 142329/2017-7).

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio financeiro (Processo 16/18201-0).

À **Fundação de Apoio ao Estudante, à Pesquisa e Extensão da Unicamp (Faepex)** pelo apoio financeiro juntamente com as fundações anteriormente citadas (Processo 3121/18).

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo auxílio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O envelhecimento e a obesidade favorecem o desenvolvimento de alterações em diversos parâmetros sistêmicos bem como no aparelho reprodutor masculino. Em contrapartida, a jabuticaba é rica em compostos fenólicos com atividade antioxidante, anti-inflamatória e anti-carcinogênica. Dessa forma, avaliamos as alterações histopatológicas, bioquímicas, e moleculares nos testículos e epidídimos, decorrentes da obesidade e envelhecimento, assim como o efeito recuperativo da jabuticaba. 70 camundongos FVB foram distribuídos em sete grupos experimentais: JV (jovem), SE (senil), SHP (senil+dieta hiperlipídica), SJI (senil+2,9g de extrato/Kg de peso do animal) e SHJI (senil+dieta hiperlipídica+2,9g de extrato/Kg de peso do animal), SJII (senil+5,8g de extrato/Kg de peso do animal) e SHJII (senil+dieta hiperlipídica+5,8g de extrato/Kg de peso do animal). Após 60 dias, os animais foram eutanasiados, com posterior coleta dos testículos e epidídimos, os quais foram processados para técnicas bioquímicas (quantificar atividade antioxidante endógena); Western Blotting (quantificar níveis receptores hormonais e vias inflamatórias), técnicas histológicas (histopatológicas e de microscopia eletrônica de transmissão), além da avaliação do índice apoptótico. Observamos que o envelhecimento provocou desde malformações espermáticas, espessamento da membrana basal dos túbulos seminíferos bem como do epitélio epididimal (tanto na cabeça como na cauda); separação celular difusa tanto no testículo como no epidídimo, e desintegração da barreira hemato-testicular e hemato-epididimária. Um acúmulo de grânulos de lipofuscina foi observada nas células de Sertoli e nas células epididimais. Também foram observadas intensificação de várias alterações histopatológicas como vacuolização epitelial (no testículo e epidídimo); necrose celular, infiltrados inflamatórios, hipertrofia de células clara e cariomegalia (no epidídimo). Ademais, a senescência reduziu a atividade do sistema antioxidante endógeno, que somada ao aumento da peroxidação lipídica provocou o aumento do estresse oxidativo, e aumentou o processo inflamatório tecidual, pelo aumento nos níveis de IL-17, NF- κ B, TNF- α , os quais somados ao aumento nos níveis de COX-2 e ao estresse oxidativo, provocou toda a série de disfunções e alterações morfológicas observadas no testículo e epidídimo. A ingestão da dieta hiperlipídica agravou várias dessas disfunções já acarretadas pelo envelhecimento. Por sua vez, o tratamento com o extrato da casca de jabuticaba melhorou em diferentes aspectos os órgãos analisados: (1). Reduziu o processo inflamatório, pela diminuição nos níveis de IL-17, NF- κ B, TNF- α . (2). Reduziu os níveis de peroxidação lipídica, juntamente aos níveis de COX-2, além de ter aumentado os níveis das enzimas antioxidantes endógenas, o que por sua vez reduziu o processo de estresse oxidativo. (3). Reestabeleceu os níveis de aromatase, de ER α e PCNA para próximo dos níveis apresentados pelos animais jovens. (4). Reestabeleceu a quantidade bem como o volume das células de Leydig para próximo dos valores exibidos pelos animais jovens. (3). Reduziu a proporção das condições histopatológicas, tanto epididimais como testiculares. (4). Melhorou a ultraestrutura tanto do epitélio testicular como epididimal, bem como dos espermatozoides. Dessa forma, a administração do extrato da casca de jabuticaba pode potencialmente atuar como tratamento para melhorar as condições funcionais do testículo e epidídimo, o qual por se tratar de compostos fitoterápicos, pode ser aplicado para os seres humanos.

Palavras-chave: Aparelho Genital Masculino, Antioxidantes, Envelhecimento e Sobrepeso.

ABSTRACT

Aging and obesity favor changes in several systemic parameters as well as in the male reproductive system. In contrast, jaboticaba is rich in phenolic compounds with antioxidant, anti-inflammatory and anti-carcinogenic activity. Thus, we evaluated histopathological, biochemical, and molecular changes in testes and epididymis, due to obesity and aging, as well as the recuperative effect of jaboticaba. In our study, 70 FVB mice were distributed in 7 experimental groups: YG (young mice, 3 months), AG (aged mice), HfAG (aged mice + high-fat diet), JAGI (aged mice + 2,9g of extract/Kg of animal weight) and HfJAGI (aged mice + high-fat diet + 2,9g of extract/Kg of animal weight), JAGII (aged mice + 5,8g of extract/Kg of animal weight) and HfJAGII (aged mice + high-fat diet + 5,8g of extract/Kg of animal weight). After 60 days, the animals were euthanized, with subsequent collection of testis and epididymis, which were processed for biochemical techniques (quantifying endogenous antioxidant activity); Western blotting (quantifying hormone receptor levels and inflammatory pathways), histological techniques (histopathological and transmission electron microscopy), as well as apoptotic index evaluation. We observed that aging caused from spermatic malformations, thickening of the basement membrane of the seminiferous tubules as well as the epididymal epithelium (both in the head and tail); diffuse cell separation in both the testis and epididymis, and disintegration of the blood-testicular and blood-epididymal barrier. An accumulation of lipofuscin granules was observed in Sertoli cells and epididymal cells. Intensification of various histopathological changes such as epithelial vacuolization (in the testis and epididymis) was also observed; cell necrosis, inflammatory infiltrates, clear cell hypertrophy and karyomegaly (in epididymis). In addition, senescence reduced the activity of the endogenous antioxidant system, which in addition to increased lipid peroxidation caused increased oxidative stress, and increased tissue inflammatory process by increasing levels of IL-17, NF- κ B, TNF- α , which, together with the increase in COX-2 levels and oxidative stress, caused the whole series of dysfunctions and morphological changes observed in the testis and epididymis. Ingestion of the high fat diet aggravated several of these dysfunctions already caused by aging. In turn, the treatment with jaboticaba bark extract improved the analyzed organs in different aspects: (1). It reduced the inflammatory process by decreasing the levels of IL-17, NF- κ B, TNF- α . (2). It reduced lipid peroxidation levels along with COX-2 levels and increased levels of endogenous antioxidant enzymes, which in turn reduced the oxidative stress process. (3). Reestablished aromatase, ER α and PCNA levels to near the levels presented by young animals. (4). He restored the amount and volume of Leydig cells to near the values displayed by young animals. (3). It reduced the proportion of histopathological conditions, both epididymal and testicular. (4). Improved ultrastructure of both testicular and epididymal epithelium as well as sperm. Therefore, the administration of jaboticaba bark extract can potentially act as a treatment to improve the functional conditions of the testis and epididymis, which because they are phytotherapeutic compounds, can be applied to humans.

Keywords: Male Generative Organs, Antioxidants, Aging and Overweight.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABP: proteína andrógeno-ligante/*Androgen-binding protein*
AGEs: produtos finais de glicosilação avançada/*Advanced glycosylation end products*
AOPPs: produtos proteicos de oxidação avançada/*Advanced oxidation protein products*
APO-1: proteína ativadora-1/*Activation protein-1*
AR: receptor de andrógeno/*Androgen receptor*
ATP: adenosina trifosfato/*Adenosine triphosphate*
Bcl-2: proteína de linfoma de células-B 2/*B-cell lymphoma protein 2*
Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large
BSA: *Bovine serum albumin*
COX-2: ciclooxigenase 2/*Cyclooxygenase 2*
DAB: 3,3' Diaminobenzidina tetrahidrocloreto / 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride
DFU: 5,5-dimetil-3- (3-fluorofenil) -4- (4-metilsulfonil) fenil-2 (5H) – furanona
DHT: di-hidrotestosterona/*Dihydrotestosterone*
DTNB: 5,5'-Ditiobis(2-Ácido Nitrobenzoico)
ECJ: Extrato da Casca de Jabuticaba
EGCG: epigalocatequina/*Epigallocatechin*
EGF: fator de crescimento epidérmico/*Epidermal growth factor*
eNOS: sintase de óxido nítrico endotelial/*Endothelial nitric oxide synthase*
ER α : receptor de estrógeno de isoforma alfa/*Estrogen receptor alpha isoform*
ER β : receptor de estrógeno de isoforma beta/*Estrogen receptor beta isoform*
FSH: hormônio folículo-estimulante/*Follicle-stimulating hormone*
FVB: Linhagem de camundongos “*Friend Virus B*”
GH: hormônio do crescimento/*Growth hormone*
GnRH: hormônio liberador de gonadotrofina/*Gonadotropin-releasing hormone*
GnRH: hormônio liberador de gonadotropina/*Gonadotropin-Releasing Hormone*
GPx: glutationa peroxidase/*Glutathione Peroxidase*
GR: glutationa redutase/*Glutathione Reductase*
GSH: glutationa reduzida/*Glutathione Reduced*
GSSG: glutationa oxidada/*Glutathione Disulfide*
GST: glutationa S-transferase/*Glutathione S-transferase*
HDL: lipoproteínas de alta densidade/*High Density Lipoproteins*
HE: Hematoxilina e Eosina
HPG: hipotalâmico hipofisário gonadal/*Hypothalamus-Hypophysis-Gonad axis*
HPTA: eixo hipotalâmico-pituitário-testicular/*Hypothalamic-pituitary-(gonadal)(testicular) axis*
HSC-3: Células de câncer oral de sítio metastático
IES: Índice Epidídimossomático
IGF-I: fator de crescimento semelhante à insulina tipo I/*Insulin Growth Factor I*
IGF-II: fator de crescimento semelhante à insulina tipo II/*Insulin Growth Factor II*
IGS: Índice Gonadossomático
IL: interleucinas/*Interleucin*
IMC: índice de massa corporal/*Body mass index*
iNOS: sintase de óxido nítrico induzida/*Inducible nitric oxide synthase*

JNK: quinase c-Jun n-terminal/
LDL: lipoproteínas de baixa densidade/*Low Density Lipoproteins*
LH: hormônio luteinizante/*Luteinizing Hormone*
MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno/*Mitogen Activated Protein Kinases*
MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1/*Monocyte chemoattractant protein-1*
MDA: malonaldeído
NADPH: fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NF-κB: fator nuclear κB/*Nuclear factor κB*
NHANES: Dados da Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição/*National Health and Nutrition Examination Survey* dos Estados Unidos da América
Nox: fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida oxidase/*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*
Nrf2: fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2/*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
NTB: nitro-2-tioflidênico
PBS: fosfato buffer saline
PBS: Tampão fosfato salino/*Phosphate-buffered saline*
PCNA: Antígeno Nuclear da Proliferação Celular/*Proliferating cell nuclear antigen*
PED: Produção diária de espermatozoides
PON-1: paraoxonase-1/*Paraoxonase-1*
PPAR-γ: receptor γ ativado por proliferador de peroxissomos/*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*
RIPA: *Radioimmunoprecipitation assay buffer*
RNA_m: RNA mensageiro/*messenger RNA*
RPM: rotações por minuto
SDS: *Sodium dodecyl sulfate*/ dodecil sulfato de sódio
SHBG: globulina ligadora de hormônio sexual/*Sex hormone-binding globulin*
SOD: superóxido dismutase/*Superoxide dismutase*
StAR: proteína reguladora aguda esteroideogênica/*Steroidogenic acute regulatory protein*
TBA: ácido 2-tiobasbitúrico
TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico/*Thiobarbituric acid reactive substances*
TBS-T: *Tris-buffered saline*
TLR-4: receptor do tipo Toll 4/*Toll-like receptor 4*
TNF-α: fator de necrose tumoral alfa/*Tumor necrosis fator alpha*
TRPV-1: potencial receptor transiente do tipo vaniloide-1/*Transient Receptor Potential Vanilloid*
1
VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular/*Vascular endothelial growth factor*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Generalidades do Testículo	14
1.2. Generalidades do Epidídimo	18
1.3. Efeito da Senescência: Testículo e Epidídimo	22
1.3.1. Efeito Hormonal	23
1.3.2. Alterações Morfológicas	24
1.3.3. Estresse Oxidativo	25
1.3.4. Desenvolvimento de Problemas Inflamatórios	27
1.4. Efeito da Obesidade: Testículo e Epidídimo.....	29
1.4.1. Efeito Hormonal	30
1.4.2. Estresse Oxidativo	31
1.4.3. Alterações Inflamatórias	34
1.5. Compostos Naturais.....	35
1.5.1. Jabuticaba.....	44
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	46
3. MATERIAL E MÉTODOS GERAIS.....	47
3.2. Dieta Hiperlipídica	49
3.3. Extrato de casca de Jabuticaba	50
3.3.1. Preparo e Determinação da dose do Extrato da Casca de Jabuticaba (ECJ)	50
3.4. Determinação do Peso Absoluto e Relativo de Órgãos	50
3.5. Contagem de espermátides, produção espermática diária (PED) e tempo de trânsito epididimal	50
3.6. Microscopia de Luz.....	51
3.7. Morfometria e Estereologia do Testículo	51
3.7.1. Proporções Volumétricas (%) e Volumes dos Componentes do Parênquima Testicular....	51
3.7.2. Diâmetro Tubular, Altura do Epitélio Seminífero e Comprimento Total dos Túbulos Seminíferos (CT)	51
3.8. Morfometria e Estereologia do Epidídimo.....	52
3.8.1. Proporções volumétricas (%) dos compartimentos na cabeça e cauda do epidídimo	52
3.8.2. Diâmetro tubular e luminal e altura do epitélio na cabeça e cauda do epidídimo	52

3.9. Quantificação Histopatológica do Epidídimo	52
3.10. Microscopia Eletrônica de Transmissão	53
3.11. Western Blotting	53
3.12. Avaliação tecidual de antioxidantes e peroxidação lipídica.....	54
3.12.1. TBARS (Ensaio das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico).....	54
3.12.2. Conteúdo de Grupo Tiol (GSH).....	55
3.12.3. Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)	55
3.12.4. Atividade da Glutathione Reduzida (GR).....	55
3.12.5. Atividade da SuperOxido Dismutase (SOD).....	55
3.12.6. Atividade da Catalase	56
3.13. Ensaio de TUNEL do epidídimo	56
3.14. Análise Estatística.....	56
Artigo Científico I.....	57
Artigo Científico II.....	90
4. RESULTADOS ADICIONAIS	125
4.1. Avaliação Biométrica.....	125
4.1.1. Aumento de Peso Corporal e Peso Final	125
4.1.2. Peso Absoluto e Relativo dos Testículos (IGS)	125
4.2. Análise Morfométrica.....	125
4.3. Avaliação Estereológica.....	126
4.4. Histopatologia e Ultraestrutura Testicular.....	127
4.4.1. Animais dos grupos JV, SE e SHP	127
4.4.2. Animais dos grupos SJI, SJII, SHJI e SHJII	128
4.5. Análises Moleculares (Western Blotting).....	129
4.5.1. AR	129
4.5.2. ER α	129
4.5.3. Aromatase	129
4.5.4. PCNA.....	130
5. DISCUSSÃO	130
5.1. Avaliação Morfométrica e Estereológica	130
5.2. Histopatologia Testicular.....	133
5.3. Ultraestrutura Testicular	137
5.4. Análises Moleculares de Western Blotting: ER α , AR, Aromatase e PCNA	141
6. CONSIDERAÇÕES GERAIS DA TESE	151

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS DA TESE	153
ANEXOS I	168
ANEXOS II	169
ANEXOS III	170
ANEXOS IV	171

1. INTRODUÇÃO

1.1. Generalidades do Testículo

O aparelho reprodutor masculino constitui-se de dois testículos associados a dois epidídimos, e estes aos ductos genitais, além de glândulas acessórias e pênis (Junqueira e Carneiro 2012).

Nos Primatas, os testículos, presentes em todas as ordens de mamíferos, estão situados de maneira bilateral (direita e esquerda) na bolsa musculocutânea, denominada escroto, a qual está localizada na região anterior do períneo, logo por trás do pênis (Johnson et al. 2010). Cada testículo possui forma ovoide, com o grande eixo quase vertical, e ligeiramente achatado no sentido lateromedial, o qual o faz apresentar duas faces, duas bordas e duas extremidades. As faces são lateral e medial, as bordas anterior e posterior, e as extremidades, superior e inferior (Tortora 2007; Netter 2008). A borda posterior é ocupada de cima para baixo por uma formação cilíndrica, o epidídimo. A metade superior da borda posterior do testículo representa propriamente o hilo do epidídimo, recebendo a denominação especial de mediastino do testículo. É através do mediastino que o testículo se comunica propriamente com o epidídimo (Tortora 2007; Netter 2008). Uma representação esquemática dos testículos, ductos eferentes, epidídimo e ducto deferente, é mostrada na Figura 1.

Por se desenvolverem retroperitonealmente, os testículos levam parte do peritônio no escroto após a descida, e esta porção chamada de túnica vaginalis envolve o testículo maduro na borda anterior e face lateral. Justaposta à camada parietal da túnica vaginalis está a camada visceral da túnica albugínea. O peritônio fornece o fluido lubrificante para ambas as camadas. Esta lubrificação permite o movimento dos testículos no interior do escroto, a fim de escapar de danos durante aumentos prejudiciais de pressão neste microambiente (Tortora 2007; Netter 2008). Por sua vez, a túnica albugínea é uma cápsula fibrosa espessa que envolve o parênquima testicular. Esta envia para o interior do testículo delgados septos, os quais se subdividem em lóbulos. Nestes encontramos grande quantidade de ductos finos, longos e sinuosos, de calibre quase capilar, que são denominados túbulos seminíferos contorcidos (Johnson et al. 2010).

Os túbulos seminíferos correspondem ao local de síntese e maturação espermática, a espermatogênese. Os mesmos são constituídos pelo epitélio germinativo envolto por uma lâmina basal, junto à qual se distribui uma camada de células mioídes, cuja contração contribui ao movimento espermático e mantém a integridade tubular (Fawcett 1975; Johnson et al. 2010). O epitélio seminífero, por sua vez, integra dois tipos celulares, as células da linhagem germinativa (espermatogônias, espermátocitos e espermátides) e as células de Sertoli (Fawcett 1975; Johnson et al. 2010). Estas últimas são conectadas entre si por junções comunicantes (junções *gap*) além de serem unidas baso-lateralmente por junções oclusivas, constituindo a barreira hematotesticular abaixo da qual se organizam as

espermatogônias, no compartimento basal. Durante a espermatogênese, algumas células da linhagem germinativa cruzam tais junções e ocupam o compartimento adluminal, situado acima da respectiva barreira. Desse modo, os espermatócitos e espermátides mantêm-se nos recessos das membranas laterais bem como no ápice das células de Sertoli, ao passo que os flagelos das espermátides estendem-se em direção ao lúmen tubular (Figura 2) (Johnson et al. 2010; Junqueira e Carneiro 2012).

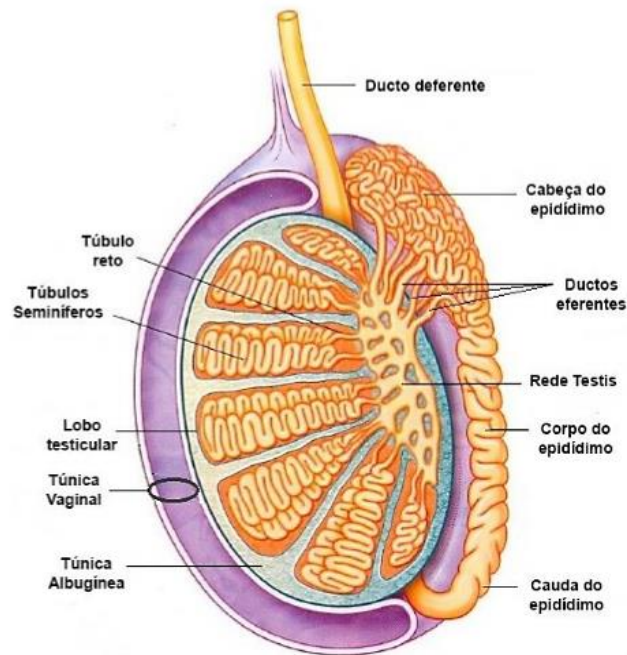


Figura 1: Representação esquemática anatômica do testículo e epidídimo. Modificado de Seeley et al. (2014).

Além disso, as células mioides contêm receptores para testosterona, de modo que sua secreção altera a secreção de transferrina e proteína andrógeno-ligante (ABP) pelas células de Sertoli. Entretanto, as células mioides podem inibir a secreção da proteína ativadora de plasminogênio pelas células de Sertoli. Este evento impede o rompimento das junções oclusivas entre as células de Sertoli no momento em que as células germinativas se movem do compartimento basal para o adluminal dos túbulos seminíferos (Fawcett 1985; Hettle et al. 1988).

As células de Sertoli são de suma relevância à manutenção e maturação espermática, conferindo suporte, proteção e suprimento nutricional às células germinativas. As células de Sertoli, através de fagocitose, digerem o excesso citoplasmático liberado pelas espermátides sob a forma de corpos residuais. Conjuntamente, as células de Sertoli secretam nos túbulos seminíferos um fluido fundamental ao transporte espermático. Além disso, a formação da barreira hematotesticular por estas, fornece proteção às células de etapas espermiogênicas mais avançadas em relação às substâncias circulantes na

corrente sanguínea bem como aos agentes nocivos além de prevenir a perda dos hormônios sintetizados no testículo (Fawcett 1975; Johnson et al. 2010; Junqueira e Carneiro 2012). Outras células cuja função é importante para o desenvolvimento espermático são as células de Leydig, por serem responsáveis pela síntese de esteroides, especialmente a testosterona (Figura 2) (Junqueira e Carneiro 2012).

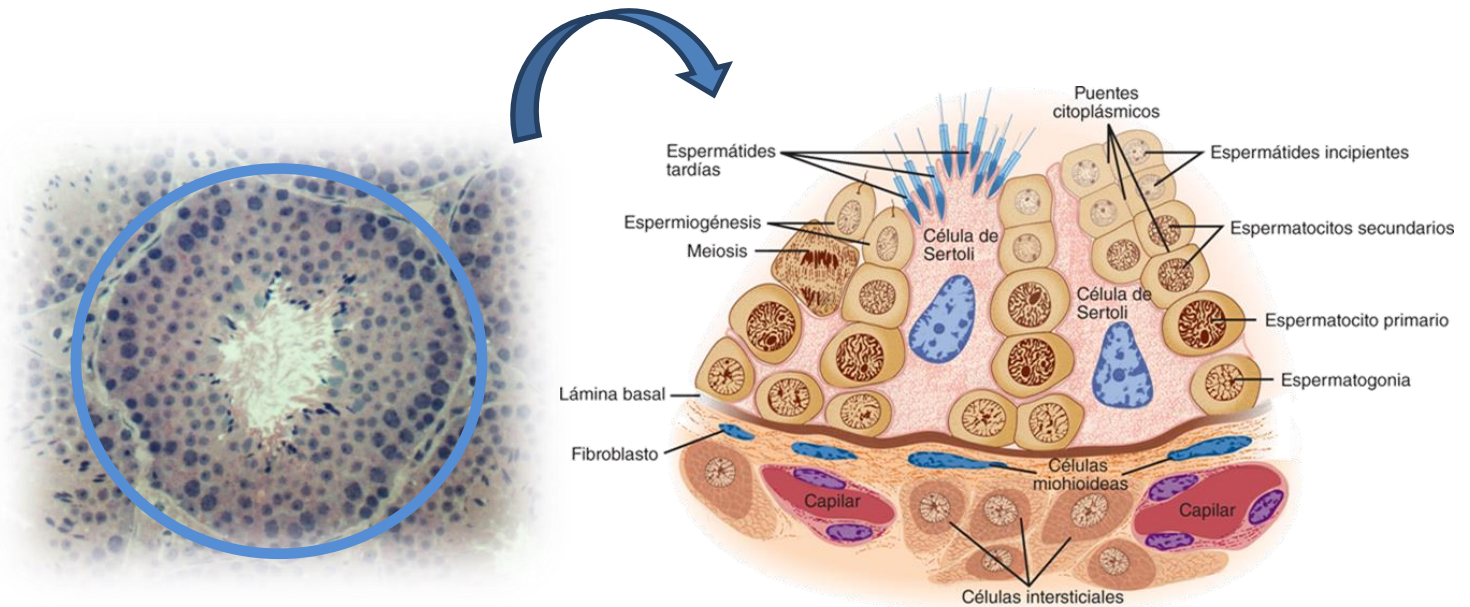


Figura 2: Estrutura interna testicular, evidenciando a histologia de um túbulo seminífero à esquerda com um esquema em maior aumento do epitélio germinativo à direita (Modificado de Kim et al. 2014).

Os mecanismos fisiológicos envolvidos na comunicação célula-célula abrangem gonadotropinas, fatores de crescimento, e citocinas. A modulação bem-sucedida dos fatores de crescimento testicular poderia explicar as vias parácrinas e autócrinas requeridas ao desenvolvimento e manutenção da esteroidogênese bem como espermatogênese (Benahmed 1995; Griswold 1995; Johnson et al. 2010). As interações célula-célula relevantes ao testículo incluem as interações células de Sertoli-células germinativas, células de Leydig-células de Sertoli e células mioideas-células de Sertoli (Johnson et al. 2010).

Diversos hormônios, especialmente o LH e FSH, regulam o desenvolvimento e função testicular através de complexas series de interações. Enquanto a esteroidogênese realizada pelas células de Leydig é predominantemente controlada pelo LH, a funcionalidade das células de Sertoli é regulada preponderantemente pelo FSH (Ascoli 2007; Latronico e Segaloff 2007; Johnson et al. 2010).

A esteroidogênese testicular consiste basicamente na produção de andrógenos pelas células de Leydig situadas no compartimento intersticial dos testículos (Robaire e Hermo 1988). Esta, como relatado anteriormente, é mediada pela liberação pulsátil de LH via pituitária, atuando através dos

receptores de LH presentes na superfície de suas células alvo (Robaire e Hermo 1988; Johnson et al. 2010).

Nos testículos, a testosterona consiste no principal andrógeno produzido pelas células de Leydig, o qual atua sozinho ou sinergeticamente com o FSH a fim de sustentar a manutenção funcional das células de Sertoli e assim a espermatogênese (Johnson et al. 2010). Entretanto a testosterona pode ser convertida em outro andrógeno, a di-hidrotestosterona (DHT), via ação da enzima 5α -redutase (Baumgarten et al. 1971) situada nas células de Leydig. Acredita-se que o aumento de tal atividade, predominantemente durante a puberdade, mantém o curso normal da espermatogênese em períodos de decréscimo nos níveis de testosterona (Sujarit e Pholpramool 1985).

Além destes, os testículos são também considerados uma fonte de estrógeno. Este pode ser sintetizado a partir de andrógenos, como a testosterona através da ação da aromatase expressa pelas células de Leydig, Sertoli e da linhagem germinativa (Canick et al. 1979; Nitta et al. 1993). A função dos estrógenos sob os parâmetros testiculares não está completamente compreendido, mas sabe-se que há uma correlação entre esterilidade e deficiência na expressão de aromatase (Morishima et al. 1995; Carani et al. 1997), uma vez que a mesma está associada à redução do epitélio seminífero, do peso testicular bem como na quantidade de células germinativas (Robertson et al. 1999) o que resulta em irregularidades no processo de espermatogênese. Assim, uma ampla distribuição de aromatase testicular é essencial à manutenção dos altos níveis de estradiol necessários para a espermiogênese, maturação e mobilidade espermática (Carreau et al. 2010; Carreau e Hess 2010).

Em íntima associação aos estrógenos encontramos os receptores de estrógenos ($ER\alpha$ e $ER\beta$), distribuídos especialmente nas células de Leydig e Sertoli. Os mesmos são responsáveis por modular as funções fisiológicas dos compostos estrogênicos, além de regularem a transcrição de genes-alvo específicos, ao se relacionarem inicialmente com os estrógenos (Paterni et al. 2014). Com isso, o equilíbrio na atividade das isoformas de $ER\alpha$ e $ER\beta$ é fundamental para uma balanceada sinalização via estrógenos, de modo que uma desordem entre os mesmos poderia causar várias disfunções metabólicas, como obesidade e diabetes mellitus tipo 2, além de afetar negativamente a função reprodutiva masculina (Paterni et al. 2014).

Inúmeros outros fatores exercem elevada influência na funcionalidade testicular tais como, os fatores epidermais de crescimento (EGFs), fatores de crescimento semelhante à insulina tipo I e II (IGF-I e IGF-II), fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF), inibinas e activinas. Tem sido proposto que peptídeos regulatórios intragonadais modulam processos reprodutivos de maneira autócrina e parácrina, considerando que os EGFs se ligam às células gonadais, afetam o número de receptores de gonadotropina e modulam a esteroidogênese testicular (Welsh e Hshueh 1982; Johnson et al. 2010) similarmente à ação dos IGFs, das activinas e inibinas. Já o VEGF exerce relevante função na

angiogênese, além de estimular a proliferação, migração e organização de células endoteliais. Sua superexpressão, desencadeada por processos inflamatórios, favorece a progressão de condições patológicas como a tumorigênese (Schwarzenbach et al. 2004).

1.2. Generalidades do Epidídimo

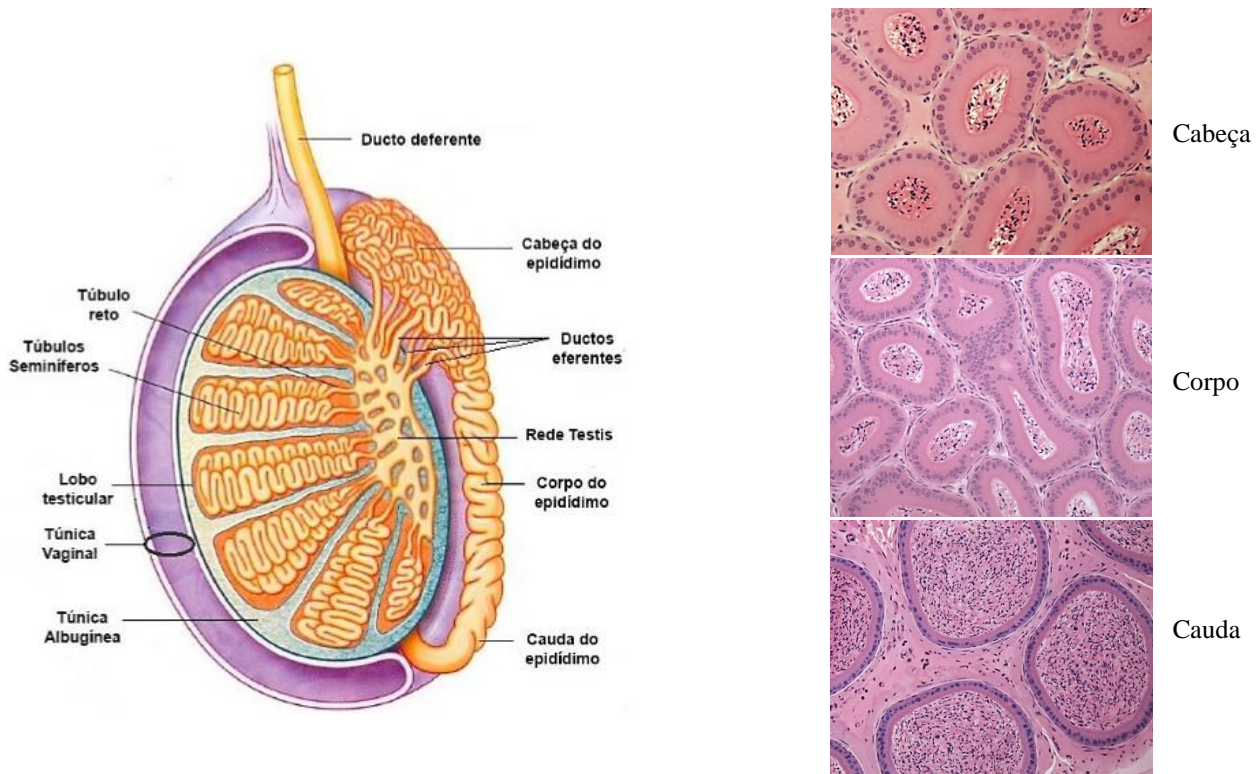


Figura 3: Estrutura interna epididimal, evidenciando, à direita, a histologia do túbulo epididimal (Modificado de Kim et al. 2014).

Os túbulos seminíferos convergem para formar o rete testicular, que por sua vez dá origem aos ductos eferentes, uma série de 4 a 20 túbulos, variando em quantidade conforme a espécie (Hemeida et al. 1978; Nistal e Paniagua 1984). Estes túbulos convergem para formar um único ducto altamente espiralado, o epidídimo (do grego “sobre ou adjacente ao testículo”).

O epidídimo, assim como o testículo, consiste em um órgão sexual bilateral, sendo extremamente longo e variando em comprimento desde 1 metro em camundongos (Takano et al. 1981), 3 metros em ratos (Turner et al. 1990), 3 a 6 metros em humanos (Von Lanz et al. 1964) e até 80 metros em cavalos (Maneely 1959). O epidídimo é geralmente dividido em três regiões anatômicas macroscópicas: o segmento inicial, a cabeça (*caput*), o corpo (*corpus*) e a cauda (*cauda*) como descrito inicialmente por Benoit (1926).

Em todas as espécies de mamíferos examinadas até o momento, cada região do epidídimo é posteriormente organizada em lóbulos separados por septos do tecido conjuntivo. Esses septos não

servem apenas como suporte interno para o órgão, mas têm sido propostos para fornecer uma separação funcional entre lóbulos que permite a expressão seletiva de genes e proteínas dentro de lóbulos individuais (Turner et al. 2003). O epidídimo se estende para um tubo reto, o ducto deferente, que é circundado por uma camada muscular muito espessa. O ducto deferente conecta-se com a uretra, que libera o conteúdo para o exterior do corpo. Uma representação esquemática dos testículos, ductos eferentes, epidídimo e ducto deferente, é mostrada na Figura 3, com evidência na histologia de cada segmento epididimal.

Um epitélio pseudoestratificado colunar constitui a base epididimal. A composição epitelial varia de acordo com as regiões epididimais, na cabeça há predominantemente células principais, basais e estreitas, assim como no corpo, ao passo que na cauda as células principais e basais mesclam-se com as células claras (Robaire et al. 2006). As células principais são colunares e portadas de microvilos e estereocílios altamente ramificados. Ao longo da estrutura epididimal, a altura das células principais varia de colunar alta na porção da cabeça à colunar baixa no corpo e cauda, assim como a espessura epitelial decresce distalmente. A característica mais marcante destas células é a sua maquinaria secretora e endocítica altamente desenvolvida e os seus núcleos alinhados na base das células (Trasler et al. 1988; Robaire et al. 2006). Dependendo do segmento, as células principais compreendem aproximadamente 65% a 80% da população total de células epiteliais do epidídimo (Trasler et al. 1988). Por sua vez, as células apicais são encontradas primariamente no epitélio do segmento inicial (Serre e Robaire 1998). Essas células têm núcleo esférico localizado apicalmente e não contactam a membrana basal, além de diferir das células principais e estreitas pela riqueza de enzimas proteolíticas e pelo perfil de expressão proteica (Adamali e Hermo 1996). No que concerne as células estreitas, em ratos e camundongos adultos, estas localizam-se apenas no segmento inicial e região da cabeça do epitélio epididimal (Adamali e Hermo 1996; Serre e Robaire 1998). Caracteristicamente, estas células são mais estreitas que as células principais, além de apresentarem numerosas vesículas em sua porção apical, em forma de taça. Estas estão envolvidas na endocitose e secreção de íons H^+ no lúmen tubular através da reciclagem para e a partir da membrana plasmática apical (Hermo et al. 2000). Por sua vez, as células claras são células de intensa atividade endocítica, sendo caracterizadas por conter em sua região apical numerosas vesículas, corpos multivesiculares, endossomos e lisossomos, e em sua região basal variável quantidade de gotículas lipídicas. Segundo Breton (1996) as células claras auxiliam também na regulação do pH luminal, por conterem em sua membrana apical a ATPase, e anidrase carbônica II, além da adenilato ciclase solúvel no citoplasma apical, as quais podem alterar sua fisiologia de acordo com o pH luminal (Jensen et al. 1999; Pastor-Soler et al. 2003). Por sua vez, as células basais ocorrem aderidas à membrana basal, não apresentando acesso direto ao lúmen tubular (Veri et al. 1993). No entanto, por apresentarem contato direto com as células principais, vários estudos têm sugerido que as células basais desempenhem

a endocitose mediada por receptores de fatores derivados do sangue ou das células principais (Clermont et al. 1995). Além disso, tem sido proposto que tal tipo celular possa exercer função imune decorrente de sua capacidade de responder, em número e expressão de antígenos macrofágicos, à presença luminal de autoantígenos espermáticos (Seiler et al. 2000). Por fim, as células de Halo consistem em células pequenas de citoplasma arredondado, situadas próximas da base celular, com numerosos grânulos densos. Em adultos jovens, este tipo celular consiste em linfócitos T *helper*, linfócitos T citotóxicos, e monócitos, atuando como frente primária de defesa deste órgão (Serre e Robaire 1999).

Juntamente com os ductos eferentes, o epidídimo absorve cerca de 90% dos fluidos provenientes dos túbulos seminíferos, o que pode ser suportado pela presença de várias invaginações na superfície luminal da membrana, vesículas revestidas assim como de corpos multivesiculares no interior das respectivas células epiteliais, especialmente das células claras (Johnson et al. 2010). Adicionalmente, o epidídimo secreta substâncias ao lúmen, sendo tal função sustentada pela existência de organelas celulares desenvolvidas (retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi), necessárias à síntese proteica e processos secretórios, no epitélio epididimal (Johnson et al. 2010).

Além disso, o epidídimo exerce inúmeras funções pelas quais o espermatozoide torna-se apto à fecundação. Durante a maturação epididimal, todas as porções espermáticas sofrem modificações, as quais incluem reorganização do conteúdo citoplasmático, no formato e tamanho celular, na estrutura interna acrossomal, cromatina nuclear, na estrutura das organelas caudais, orientação estrutural das mitocôndrias espermáticas, propriedades adesivas, aderência núcleo-acrossomo, alteração no estado dos grupos sulfidril, lipídicos, protéicos, lipoprotéicos e das desoxiribonucleoproteínas, entre uma série de outras modificações celulares (Bedford 1965; Mann 1974; Johnson *et al.* 2010). Dessa forma, o trânsito espermático através do epidídimo é fundamental não somente para o desenvolvimento do potencial de fertilização, mas também para um processo de pós-implantação espermatozoide-óvulo bem-sucedido. Wazzan et al. (1990) reportaram que entre camundongos apenas 8% dos oócitos fertilizados por espermatozoides da cabeça epididimal foram capazes de se desenvolver em blastocistos *in vitro*, quando comparados com 48% dos oócitos fertilizados pelos espermatozoides provenientes da cauda epididimal. Lacham-Kaplan e Trounson (1994) confirmaram que uma elevada taxa de retardo no desenvolvimento embrionário ocorreu em oócitos de camundongos fertilizados por espermatozoides que ganharam “*in vitro*” sua capacidade de fertilização. Embora espermatozoides e espermátides testiculares fertilizem 94% e 37% dos óvulos, respectivamente, após a injeção no interior dos oócitos, apenas 54% e 28% destes, respectivamente, se desenvolvem em prole saudável (Kimura e Yanagimachi 1995). Em conjunto, essas pesquisas evidenciam que a passagem através do epidídimo favorece os espermatozoides com a capacidade de ascender o trato genital feminino, interagir com os óvulos e gerar embriões com desenvolvimento normal.

Além destes eventos, é no epidídimo que os espermatozoides garantem seu potencial de motilidade eficiente. Os espermatozoides testiculares são imóveis ou exibem apenas uma leve contração flagelar. Conforme percorrem os diferentes segmentos epididimais, os espermatozoides progridem em seu padrão de motilidade, de modo que aqueles liberados da *caput*, movem-se em um padrão circular, ao passo que os espermatozoides liberados da *cauda* movem-se de modo progressivo e vigoroso para frente (Reid e Cleland 1957). Em adição à esta mudança, ao longo do epidídimo em camundongos os espermatozoides desenvolvem sua capacidade de realizar a reação acrossomal (Lakoski et al. 1988), pela qual são capazes de reconhecer e se ligar à zona pelúcida dos ovócitos e se fundir à membrana vitelínica dos mesmos. Concomitante a essas alterações funcionais, os espermatozoides passam por alterações estruturais durante o trânsito epididimal: migração da gota citoplasmática ao longo do flagelo espermático, remodelação acrossomal, alterações na cromatina nuclear espermática e algumas organelas da cauda e alterações na membrana plasmática do esperma (Bedford 1973). Coletivamente, essas alterações sustentam a maturação funcional e o subsequente armazenamento espermático epididimal (Robaire et al. 2006).

Adicionalmente, ao longo dos túbulos há a barreira hemato-epididimal, responsável primariamente pela produção de um microambiente com fluído luminal especializado importantíssimo para a maturação espermática. Entretanto, outra função crítica desempenhada por esta barreira é a proteção dos espermatozoides em maturação. Os mecanismos de defesa incluem a restrição dos tipos de compostos que podem entrar no lúmen epididimal, a síntese e a secreção de proteínas de efeito protetor, como as defensinas, rápida metabolização de potenciais agentes nocivos através da síntese e secreção de enzimas e compostos antioxidantes, como a superóxido dismutase e glutathione, respectivamente (Jones et al. 1979; Vernet 2004). Como os espermatozoides maturam em um ambiente hiperosmótico, o epidídimo também garante que os mesmos sejam protegidos de bruscas mudanças na osmolalidade luminal, além de lhes conceder a capacidade de regular o volume celular (Alvarez et al. 1987).

A funcionalidade epididimal faz-se modelada pela integração de diversas vias hormonais e não hormonais. Dentre a primeira via, a testosterona e estradiol, ambos testiculares, parecem ser as principais substâncias responsáveis pela manutenção da estrutura e função epididimal, uma vez que a privação hormonal resulta em redução do diâmetro luminal e altura das células principais bem como no aumento do estroma intertubular (DeLongeas et al. 1987). Juntamente com as mudanças morfológicas, é relatado um comprometimento da função secretora das células principais, considerando a perda total do retículo endoplasmático situado na porção citoplasmática apical além de uma intensa redução da proporção de microvilos apicais assim como o acúmulo lisossomal, vacuolização, o desaparecimento vesicular do ápice celular e a elevação da taxa endocítica (Moore e Bedford 1979). A deficiência androgênica pode resultar também na redução da atividade epididimal dos receptores de andrógeno (AR), da 5α -redutase além de estimular a apoptose celular ao longo de toda a extensão epididimal (Fan e Robaire 1998). Por

consequente, todas essas alterações resultam em perda do potencial de fertilização e de motilidade espermática, e assim em espermatozoides inviáveis à fecundação (Robaire et al. 2006).

Além dos estrógenos, seus respectivos receptores, os ER, auxiliam na regulação da integridade epididimal. Os mesmos, em especial o ER α , são fundamentais à concentração e morfologia normal espermática e estão envolvidos na regulação do transporte de fluidos ao longo do aparelho reprodutor masculino (Hess et al. 2003; 2014). Com isso, são inúmeros os fatores influentes aos parâmetros morfofisiológicos do epidídimo, variando desde hormônios testiculares à ação proteica intracelular, o que evidencia a integralização e dependência das porções reprodutoras entre si.

1.3. Efeito da Senescência: Testículo e Epidídimo

Nas mulheres, a atividade reprodutiva termina com a menopausa, e o impacto negativo da idade materna avançada é bem documentado. Por sua vez, nos homens, esse processo é gradual e a cessação completa da capacidade reprodutiva não ocorre (Tenover 2003). O declínio reprodutivo em homens com idade avançada pode resultar de uma combinação de alterações morfológicas e moleculares nos órgãos reprodutivos, muitas vezes devido a doenças ou fatores ambientais adversos que causam danos secundários nos órgãos reprodutivos ao longo da vida (Handelsman 2006).

Nas sociedades modernas, uma série de fatores tem favorecido o atraso da paternidade, tais como o aumento na expectativa de vida, idade avançada ao casamento, fatores socioeconômicos, e a mudança geral no papel das mulheres na sociedade (Sharma et al. 2015). Além disso, a maior acessibilidade às técnicas de reprodução assistida aumentou a chance de pais mais velhos com resultados insatisfatórios de gravidez conceberem crianças saudáveis, aumentando, assim, a idade paterna média. Em comparação com 1993, a idade paterna na Inglaterra aumentou em 15% em um período de dez anos (Bray et al. 2006). Em contrapartida, o aumento da idade paterna afeta não só as taxas de sucesso e de gravidez de risco, como também a função testicular (Feldman et al. 2002), hormônios reprodutivos (Feldman et al. 2002), parâmetros espermáticos (Brahen et al. 2011; Agarwal et al. 2008), integridade do DNA espermático (Moskovtsev et al. 2006), comprimento dos telômeros (Broer et al. 2013), taxa de mutação *de novo* (Crow 2000), estrutura cromossômica e fatores epigenéticos (Curley et al. 2011). Assim, essas mudanças afetam negativamente a fertilidade e os resultados reprodutivos em casais mais velhos, contribuindo para maiores incidências de defeitos congênitos de nascença (Liam et al. 1986) e mortes fetais (Alio et al. 2011). O aumento da idade masculina também se mostrou associado a vários distúrbios, como acondroplasia (Orioli et al. 1995), autismo (D'onofrio et al. 2014), esquizofrenia e transtornos bipolares, (D'onofrio et al. 2014) entre muitos outros.

1.3.1. Efeito Hormonal

O envelhecimento tem um efeito bem documentado em todos os níveis do eixo hipotalâmico-pituitário-testicular (HPTA), que é responsável pela regulação da função testicular (Handelsman 2006). As duas principais funções testiculares - espermatogênese (função exócrina) e esteroidogênese (função endócrina) não são completamente independentes (Handelsman 2006).

Normalmente, o hipotálamo libera o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), que estimula a secreção do hormônio folículo-estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) pela glândula pituitária. As moléculas de LH são reconhecidas pelos receptores de LH presentes nas células de Leydig, o que estimula a biossíntese de testosterona (esteroidogênese). Por sua vez, o FSH é reconhecido pelos receptores de FSH situados na membrana das células de Sertoli, o qual exerce um relevante papel na espermatogênese. Essas funções são afetadas pela idade, resultando em alterações nos níveis hormonais durante o envelhecimento em humanos e em outros animais, (Nelson et al. 1975; Handelsman 2006). Um estudo comparativo acerca dos efeitos da idade sobre a atividade esteroidogênica testicular entre ratos Brown Norway e Sprague-Dawley evidenciou uma redução drástica nos níveis de testosterona sérica e intratesticular associada à idade em ambos os modelos animais (Zirkin et al. 1993). De fato, a capacidade das células de Leydig em produzir testosterona é reduzida em ratos idosos da linhagem Brown Norway, resultando em níveis reduzidos de testosterona sérica (Gruenewald et al. 1994; Chen et al. 2015).

Nos homens, uma das mudanças relacionadas à idade mais relevantes é o declínio nos níveis de testosterona, particularmente os níveis séricos (Matsumoto 2002; Handelsman 2006). Embora alguns estudos não tenham detectado alterações nos níveis de testosterona em homens saudáveis de diferentes idades (Sartorius et al. 2012), a maioria mostrou que a testosterona plasmática declina com o aumento da idade (Mauss 1975; Davidson et al. 1983; Wu et al. 2008). Não há consenso sobre o mecanismo que causa o declínio da testosterona relacionado à idade, mas foi associado aos três níveis do HPTA (Wu et al. 2008; Gunes et al. 2016) ou ao declínio da função testicular (Golan et al. 2015). A diminuição do número de células de Leydig (Neaves et al. 1984) e perfusão testicular comprometida devido à aterosclerose, suportam uma causa principalmente testicular para baixos níveis de testosterona (Handelsman 2006). No entanto, níveis mais baixos de testosterona em homens idosos não devem ser estritamente associados ao envelhecimento, já que outros fatores, como estilo de vida e patologias podem estar envolvidos (Santiago et al. 2018).

Feldman et al. (2002) relacionou que similarmente à testosterona, outros hormônios como a dehidroepiandrosterona, o sulfato de dehidroepiandrosterona, o cortisol e a estrona apresentam um declínio longitudinal significativo com a idade. Em contrapartida, os níveis de diidrotestosterona e gonadotrofinas hipofisárias aumentam longitudinalmente (Feldman et al. 2002). Por sua vez, Beattie et al. (2015) demonstraram que os níveis séricos de LH normalmente aumentam com o envelhecimento,

possivelmente como resposta ao declínio da testosterona, o que favorece o desenvolvimento do hipogonadismo secundário (Beattie et al. 2015). Outros fatores, além do envelhecimento, podem influenciar os níveis testiculares e plasmáticos de testosterona, incluindo fatores hereditários, ambientais (obesidade), psicossociais (depressão, drogas, tabagismo) e socioeconômicos (Sartorius et al. 2012; Wang et al. 2017). Portanto, a associação dos níveis de testosterona com a idade nem sempre é linear.

Sabe-se que a estimulação androgênica das células de Sertoli é fundamental para a indução inicial da espermatogênese. Poucos são os estudos que comparam os níveis de esteroides endógenos no tecido testicular de homens jovens e idosos. Dentre esses, Takahashi et al. (1983) mediram a concentração de nove esteroides endógenos em homens de 25 a 35 anos com oligozoospermia e varicocele e em homens com idade entre 61 e 85 anos com câncer prostático e mostraram que os níveis de todos os hormônios esteroides diminuíram com a idade. No entanto, mais recentemente Carreau et al. (2004) realizaram um estudo comparativo pelo qual relataram que não há diferença significativa entre a quantificação de esteroides intratesticulares em homens jovens e idosos. A redução na produção de testosterona testicular com a idade pode ter um grande impacto na espermatogênese, afetando a função das células de Sertoli. No entanto, esse declínio geralmente aparece em homens idosos com doenças relacionadas a alterações hormonais. Além disso, é bem estabelecido que os níveis plasmáticos de FSH (hormônio folículo-estimulante), o segundo maior estímulo para a espermatogênese, aumentam com o avanço da idade, estando associado a uma diminuição no tamanho dos testículos e degeneração das células germinativas, afetando a eficácia espermatogênica (Haldeman 2006; Beattie et al. 2015).

1.3.2. Alterações Morfológicas

A idade constitui uma das variáveis mais relevantes na determinação da estrutura morfológica e histológica testicular e epididimal. O envelhecimento tem sido associado à redução do volume dos testículos em associação ao decréscimo numérico em células de Sertoli (Mahmoud et al. 2003; Perheentupa e Huhtaniemi 2009) e à redução na produção espermática diária (Johnson et al. 1984) atribuída ao aumento apoptótico de células germinativas em estágios pré-meióticos (Handelsman 2006). Outros aspectos característicos à senilidade testicular abrangem um mosaico de lesões tubulares variando desde a espermatogênese completa à total esclerose do epitélio seminífero. Tais modificações incluem o estreitamento do diâmetro tubular assim como sua obliteração, o espessamento da membrana basal, túnica própria e túnica albugínea, tecido capsular e intertubular associado à fibrose e interrupção da espermatogênese, esfoliação prematura das células germinativas, assim como redução quantitativa das células de Sertoli, Leydig – em até 44% – e da linhagem espermatogênica, com vacuolização nas primeiras e multinucleação nas últimas (Kaler e Neaves 1978; Neaves et al. 1987; Paniagua et al. 1987; Johnson et al. 1988; Perheentupa e Huhtaniemi 2009; Huang et al. 2014). Além destas, há alterações celulares

ultraestruturais, de modo que alguns tipos de células testiculares desenvolvem cristais de Reinke citoplasmáticos e intranucleares, múltiplos vacúolos, grânulos de lipofuscina, acúmulo citoplasmático de lipídios, multinucleação e aspectos de desdiferenciação associados ao reduzido desenvolvimento mitocondrial e reticular (Paniagua et al. 1987). A grande maioria das alterações histológicas acima relatadas está intimamente relacionada à má vascularização testicular adquirida durante a senescência, em decorrência do déficit na perfusão arterial. Estes resultam na reduzida oxigenação no interior tubular, a qual permanece marginal, e, por conseguinte, no aumento da fibrose das túnica próprias e albugínea bem como na degeneração das células de Leydig e de sua capacidade sintética de andrógenos (Paniagua et al. 1987; Perheentupa e Huhtaniemi 2009).

Já em relação à influência da senescência nos caracteres epididimais, alterações em diferentes parâmetros foram relatadas, embora tais estudos ainda sejam incipientes e pouco explorados em detrimento das abordagens testiculares. Serre e Robaire (1998) evidenciam que o epidídimo sofre modificações histológicas drásticas com o avanço da senilidade, corroborando as alterações anteriormente relatadas por Jones (1980). Como consequência do envelhecimento epididimal relatou-se um acúmulo de grânulos de lipofuscina assim como de gigantes vesículas no citoplasma das células epiteliais, além do aumento na espessura da membrana basal, possivelmente causado por mudanças hormonais, já que sob tais condições, fatores endócrinos podem ter uma dificuldade crescente em alcançar o epidídimo, o que eventualmente prejudicaria sua homeostase em associação com o aumento na expressão do gene inibidor de metaloproteinase-2 (TIMP-2), responsável pela remodelação de matriz extracelular (Jervis e Robaire 2002). Além destes, sabe-se que a senescência desencadeia a ativação do sistema imune epididimal, pelo aumento quantitativo das células de halo, conhecidas por sua funcionalidade na barreira imunológica no epitélio epididimal, ao atuarem no recrutamento segmento-específico de linfócitos e eosinófilos citotóxicos. Assim, a acumulação de células epiteliais danificadas e antígenos originados de células germinativas, ambos associados ao seu escoamento pela barreira hemato-epididimal, pode contribuir ao recrutamento ativo de células com atividade imunológica (Laitinen e Talo 1981; Serre e Robaire 1998; Levy e Robaire 1999).

1.3.3. Estresse Oxidativo

É sabido que os radicais livres consistem em espécies químicas reativas que contêm elétrons desemparelhados em sua camada de valência. Tais elétrons são os responsáveis por tornar os radicais livres altamente reativos a quaisquer moléculas celulares, desde carboidratos, lipídios, proteínas aos ácidos nucleicos (Aprioku 2013; Sullivan e Chandel 2014; Gunes et al. 2016). A geração de radicais livres provém de um normal metabolismo celular assim como de fontes exógenas, as quais incluem radiação, herbicidas, estresse crônico, cigarro, abuso de álcool, drogas e poluição aérea (Aitken et al. 2014; Moller

et al. 2014). Após tais estímulos, na mitocôndria ocorre a conversão do oxigênio captado em moléculas altamente reativas de oxigênio, denominadas de espécies reativas de oxigênio (EROS).

O envelhecimento está, também, associado à elevação do estresse oxidativo orgânico, especialmente gonadal, de modo que haja um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de agentes antioxidantes. Embora as EROS sejam oriundas de reações enzimáticas naturais o nível das mesmas é mantido fisiologicamente moderado pela ação da via antioxidante (Sharma e Agarwal 1996; Agarwal et al. 2006; Kefer et al. 2009; Kothari et al. 2010; Agarwal et al. 2014), prevenindo assim o efeito deletério potencial das EROS. Sob tais condições, o estresse oxidativo é mantido em níveis reduzidos, permitindo a ocorrência dos processos de sinalização celular e função espermática (De Lamirande e Lamothe 2009; Agarwal et al. 2014) normais. Nesse aspecto, as EROS são consideradas componentes integrais da fisiologia e desenvolvimento espermático, as quais são requeridas à maturação, hiperativação, capacitação, quimiotaxia espermática, reação acrossomal, bem como à fusão espermatozoide-oócito (Griveau et al. 1995; Sharma e Agarwal 1996; Kothari et al. 2010; Guthrie e Welch 2012). Entretanto, níveis elevados de EROS têm sido relacionados a vários danos celulares (Victor et al. 2004; Durackova 2010; Liochev 2013; Gunes et al. 2016), incluindo danos na estrutura do DNA, como alteração de bases nitrogenadas e quebras na dupla fita (Aitken et al. 1992; Sharma et al. 2015). Os agentes antioxidantes, fundamentais ao respectivo processo, podem ser de origem enzimática e não enzimática. Os primeiros incluem a Superóxido Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase, Glutathione transferase e Ceruloplasmina, enquanto os últimos compreendem a albumina, β -carotenos, l-carnitina, glutathione, piruvato, taurina, hipotaurina, ubiquinol, vitaminas C e E, e zinco (Agarwal e Sekhon 2010; 2011).

Adicionalmente, o excesso de estresse oxidativo relatado na senescência afeta diretamente também a funcionalidade das células de Leydig, responsáveis pela produção de EROS nos testículos (Tsai et al. 2003). Chen et al. (2004) e Salomon et al. (2013) observaram uma redução na expressão de vários genes relacionados ao reparo de danos induzidos pelos radicais livres nas células de Leydig senis, acompanhada pelo aumento da produção de EROS e peroxidação lipídica, afetando, pois, a síntese de testosterona e todo o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Além disso, Chen et al. (2009) associaram o excesso de EROS à redução para cerca de 50% da capacidade esteroidogênica de células de Leydig senis, sugerindo danos aos componentes lipídicos e proteicos de membrana, o que resulta na reduzida sinalização de LH em tais tipos celulares. Adicionalmente a tais dados, relatou-se que com a senescência há o aumento da síntese proteica de COX-2, associadas à redução esteroidogênica (Wang et al. 2005; Chen et al. 2007; Santiago et al. 2018); além do envelhecimento resultando em alterações ultraestruturais e funcionais nos macrófagos testiculares (relevante fonte de EROS), afetando a função mitocondrial das células de Leydig bem como a sua esteroidogênese (Allen et al. 2004).

Durante o envelhecimento, os mecanismos de controle de EROS são continuamente enfraquecidos, em decorrência de alterações mitocondriais, pelas quais o funcionamento da cadeia respiratória torna-se dificultada, e resulta no decréscimo da produção de ATP e aumento de EROS (Weir e Robaire 2007; Aydin et al. 2014). Este, por sua vez, culmina na elevação da peroxidação lipídica, redução na fluidez de membrana, danos no DNA espermático, o qual, por fim, resulta na perda de motilidade e vitalidade dos espermatozoides (Aitken et al. 1992; Agarwal et al. 2005; Durairajanayagam et al. 2014; Sharma et al. 2015). Weir e Robaire (2007) demonstraram um aumento significativo na geração de EROS acompanhado pela maior fragmentação do DNA espermático, além de menor atividade das enzimas glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) nos espermatozoides de ratos Brown Norway senis. Em concordância, no estudo desenvolvido por Vernet et al. (2004) foi observado, um aumento significativo da peroxidação lipídica, nos epidídimos de ratos e camundongos senis em comparação aos juvenis. Outros estudos propõem que através da peroxidação lipídica, a membrana celular espermática é degradada, favorecendo a fragmentação do DNA e assim a apoptose celular (Vernet et al. 2001).

1.3.4. Desenvolvimento de Problemas Inflamatórios

Já está bem conhecida a íntima relação entre o envelhecimento, o desenvolvimento de processos oxidativos e inflamatórios (Frungeri et al. 2018). Muitas teorias que tentam estabelecer se a inflamação é uma causa ou efeito no envelhecimento foram desenvolvidas. No entanto, nenhuma teoria única explica todos os aspectos do envelhecimento, levando ao suposto de que vários processos (por exemplo: estresse oxidativo, dano mitocondrial, imunosenescência, endocrinosenescência, modificações epigenéticas e doenças relacionadas à idade) contribuem e que todos estes estão interligados com respostas inflamatórias (Jenny 2012). O termo inflamação é usado atualmente para descrever a regulação positiva da resposta inflamatória que ocorre com o avanço da idade (Baylis et al. 2013). Inflamação é um novo ramo desafiador e promissor dos campos de pesquisa relacionados ao envelhecimento, uma vez que afeta quase todos os tipos de tecidos e células (Xia et al. 2016).

Evolutivamente, respostas imunes e inflamatórias intensas permitiram que os primeiros seres humanos sobrevivessem até a idade reprodutiva. No entanto, esses mesmos mecanismos de resposta levam a uma variedade de consequências deletérias, agora que os humanos sobrevivem rotineiramente à idade avançada (Neese e Williams 1998). Em um processo altamente complicado, os órgãos progressivamente perdem a funcionalidade e a integridade estrutural, desencadeando o surgimento de doenças relacionadas à idade, como aterosclerose, demência e câncer. Embora a etiologia do processo de envelhecimento não seja totalmente compreendida (Singh e Newman 2011), a inflamação desempenha claramente um papel importante, ligando de forma inextricável a inflamação e o envelhecimento (Chung et al. 2009).

Subsequente a traumas ou infecções, a resposta inflamatória é iniciada a nível local celular. Vários mediadores celulares, como macrófagos e monócitos, são ativados. Estas células liberam citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) que atuam como mediadores moleculares e são responsáveis pela progressão da resposta inflamatória a um nível sistêmico. A cascata inflamatória é projetada com foco para a destruição de patógenos, além de tender a iniciar processos de reparo de tecidos e promover um retorno à homeostase fisiológica (Gabay e Kushner 1999). Em um nível agudo, esse processo é marcado por calor, inchaço, vermelhidão e dor facilmente discerníveis. No entanto, em termos de envelhecimento e doenças relacionadas à idade, a resposta inflamatória é um processo subclínico crônico de baixo nível mediado pelos mesmos efetores, mas diferindo significativamente em grau (Tracy 2003).

Há uma quantidade crescente de evidências indicando que o desequilíbrio entre os níveis de moléculas pró e anti-inflamatórias representa um dos mecanismos fundamentais do envelhecimento. Assim, é razoável supor que a inflamação geralmente está relacionada ao processo de envelhecimento gonadal. De fato, a redução da capacidade esteroidogênica e espermatogênica dependente da idade tem sido associada a um aumento no estado inflamatório do tecido (Gravance et al. 1997; Jiang et al. 2014; Sibert et al. 2014; Zirkin e Chen, 2000). Baixos níveis séricos de andrógenos em homens idosos são correlacionados com o aumento dos níveis das citocinas pró-inflamatórias circulantes (Krabbe et al. 2004; Maggio et al. 2005). Os macrófagos são hiperativados com o envelhecimento, resultando na elevação da expressão de COX-2 e um aumento na produção de prostaglandinas (conhecidos um dos mediadores moleculares da inflamação) (Lloberas e Celada 2002). Syntin et al. (2001) relataram que o nível de RNAm de COX-2 aumentou com a idade nas células de Leydig nos ratos idosos da linhagem Brown Norway. Em associação, foi estabelecido que a IL-1 β e seus receptores são expressos em macrófagos e células de Leydig do testículo humano, e que esta citocina induz a expressão de COX-2 e a produção de prostaglandinas em ambos os tipos de células (Matzkin et al. 2010). Além disso, Wang et al. (2005) observaram que o tratamento, de ratos Wistar idosos, com o inibidor de COX-2, DFU, [5,5-dimetil-3- (3-fluorofenil) -4- (4-metilsulfonil) fenil-2 (5H) – furanona] resultou no aumento dos níveis séricos de testosterona assim como na expressão da proteína StAR (proteína reguladora aguda esteroidogênica), em relação àqueles não tratados com o respectivo inibidor. Em conjunto, estes resultados suportam um papel chave para os macrófagos testiculares e certos mediadores inflamatórios, tais como IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α e prostaglandinas, no declínio da biossíntese de testosterona relacionado com a idade.

Em relação às condições inflamatórias no epidídimo, Mueller et al. (1998) reportaram que as células principais do epitélio epididimal em ratos jovens da linhagem Brown Norway expressam a enzima antioxidante glutathione S-transferase (GST). Entretanto, em ratos idosos algumas células principais da região da cauda proximal não expressam subunidades específicas da GST. Considerando que esta enzima

atua na proteção dos componentes celulares contra ataques eletrolíticos e oxidativos, a redução na expressão de GST pode incapacitar o epidídimo destes animais a combater o estresse oxidativo. Por sua vez, as EROS ativam uma variedade de fatores de transcrição, levando à expressão de mais de 500 genes diferentes, incluindo fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias (Reuter et al. 2010). Conseqüentemente, o estresse oxidativo pode levar à inflamação crônica, degeneração celular e vacuolização, achados comuns no epidídimo de ratos idosos (De Grava Kempinas e Klinefelter 2015).

De la Fuente e Miquel (2009) propuseram a teoria da oxidação-inflamação como a principal causa do envelhecimento. No testículo humano, um estudo desenvolvido por Schell et al. (2010) relatou que a prostaglandina pró-inflamatória 15d-PGJ2 induz à geração de EROS. Em associação a tanto, está bem estabelecido que a via de sinalização do hormônio de crescimento (GH) participa da regulação do envelhecimento e da expectativa de vida (Bartke 2015). A superexpressão de GH reduz a expectativa de vida em camundongos, aumentando os níveis de citocinas pró-inflamatórias bem como a expressão de marcadores inflamatórios e diminuindo a atividade antioxidante em vários tecidos não reprodutivos (Coschigano et al. 2003, 2010; Danilovich et al. 2000; Bogazzi et al. 2011; Masternak e Bartke 2012). Matzkin e colaboradores (2016) evidenciaram que a redução da longevidade em camundongos transgênicos para GH está diretamente associada a diversas alterações gonadais, incluindo o aumento na expressão de COX-2, produção de prostaglandinas, população de macrófagos, peroxidação lipídica, a ocorrência de eventos apoptóticos, e a redução na expressão de enzimas antioxidantes. Contrariamente, a deficiência de GH prolonga a longevidade, aumenta a resistência ao estresse oxidativo e reduz a atividade pró-inflamatória e eventos apoptóticos em vários órgãos, que não estão diretamente relacionados à reprodução (Chandrashekar e Kopchick 1999; Csiszar et al. 2008; Gesing et al. 2011).

1.4. Efeito da Obesidade: Testículo e Epidídimo

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2012) a obesidade é definida como o acúmulo excessivo de gordura corporal que pode prejudicar a saúde e aumentar a mortalidade humana. Além disso, a mesma já é considerada um problema de saúde global e a prevalência da obesidade tem aumentado substancialmente nas últimas três décadas. Por exemplo, o número de indivíduos adultos com sobrepeso e obesos aumentou de 857 milhões em 1980 para aproximadamente 2 bilhões em 2016 (WHO 2018). Em todo o mundo, a proporção de homens com excesso de peso aumentou de 28,8% em 1980 para 36,9% em 2013 (Ng et al. 2014).

A obesidade consiste em um grave problema nutricional, pois aumenta o risco de morbidade de várias patologias, incluindo hipertensão, dislipidemia, diabetes tipo 2, doença coronariana, acidente vascular cerebral, doença hepática gordurosa não alcoólica, osteoartrite, apneia do sono, além dos cânceres de mama, próstata e cólon (WHO 2012). A classificação atual da obesidade é baseada no Índice

de Massa Corporal (IMC), que é o peso (em quilogramas) dividido pelo quadrado da altura (em metros). A definição de “faixa normal” do IMC é baseada em dados de mortalidade caucasiana; um IMC de 30 kg/m² ou mais é considerado um índice de obesidade, enquanto um IMC acima de 25 kg/m² é um índice de sobrepeso (WHO 2012). Para as populações asiáticas, um IMC de 27,5 kg/m² ou mais é um índice de obesidade, enquanto um IMC acima de 23 kg/m² é um índice de sobrepeso. O IMC tem limitações porque não distingue entre massa magra e gordura; pode superestimar a gordura corporal em fisiculturistas bem treinados e subestimar a gordura corporal na população idosa. Além disso, o IMC não identifica a distribuição de gordura. Atualmente, é bem reconhecido que a gordura abdominal é um grande risco para doenças relacionadas à obesidade: de fato, o acúmulo de gordura visceral contribui para estados pró-oxidantes e pró-inflamatórios, bem como para alterações no metabolismo glicídico e lipídico (Fernández-Sánchez et al. 2011; WHO 2012).

1.4.1. Efeito Hormonal

A maioria dos homens obesos possuem perfis hormonais reprodutivos alterados, tais como níveis elevados de estrogênio e leptina, acompanhados por reduzidos níveis de testosterona, hormônio folículo-estimulante (FSH), globulina ligadora de hormônio sexual (SHBG), grelina e inibina B (MacDonald et al. 2010; McPherson e Lane 2015; Cui et al., 2017). Em homens obesos, a hiperatividade da aromatase (enzima do citocromo P450) no tecido adiposo unilocular causa a conversão excessiva de andrógenos em estrogênios. Portanto, a secreção de gonadotrofinas da hipófise diminui através da inibição do feedback no hipotálamo e na glândula pituitária, e então ocorrem outros impactos na produção de testosterona através de quedas nos pulsos do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) – LH e FSH (Mah e Wittert 2010; Michalakis et al. 2013; Rey et al. 2013). O rompimento da alça de feedback negativo do eixo hipotalâmico hipofisário gonadal (HPG) resulta, por fim, no declínio significativo na produção de testosterona.

Esses desequilíbrios hormonais sexuais podem ser uma das causas importantes da infertilidade masculina ou da infertilidade induzida pela obesidade. Sabe-se que tanto o desenvolvimento testicular na puberdade quanto a manutenção da espermatogênese no indivíduo adulto dependem de um alto nível de testosterona. Os níveis normais de testosterona intratesticular são de 50 a 100 vezes em comparação à sua concentração sérica. Esse nível é necessário para a manutenção da barreira hemato-testicular, das junções celulares específicas entre as células de Sertoli, bem como à manutenção da adesão celular entre células de Sertoli e células germinativas (Lie et al. 2013). Além disso, a testosterona é indispensável na progressão meiótica e na maturação das espermátides. Assim, os altos níveis de testosterona, associados às células de Sertoli, constroem um nicho adequado para o desenvolvimento de células germinativas durante as diferentes fases da espermatogênese. Ademais, o FSH é outro importante

regulador das células de Sertoli, estimulando praticamente todas as funções relacionadas à espermatogênese. Portanto, os baixos níveis de testosterona e FSH em homens obesos podem ser uma causa de espermatogênese prejudicada e, finalmente, culminar na redução da contagem e viabilidade de espermatozoides (Cheng et al. 2010; Ramaswamy e Weinbauer 2015).

1.4.2. Estresse Oxidativo

Estudos epidemiológicos, clínicos e em animais demonstraram que a obesidade está associada a um estado alterado de oxirredução e a um aumento do risco de doenças metabólicas (Karaouzene et al. 2011; Warolin et al. 2013). O estresse oxidativo pode ser uma consequência, mas também um gatilho da obesidade. Hipernutrição crônica, refeições com alto teor de gordura e carboidratos e ácidos graxos saturados, estimulam as vias intracelulares, levando ao estresse oxidativo através de múltiplos mecanismos bioquímicos, como a geração de íons superóxidos a partir de NADPH oxidases (Nox), fosforilação oxidativa, autooxidação do gliceraldeído, além da ativação da proteína quinase C (Sies et al. 2005; Serra et al. 2012). O estresse oxidativo pode ter um papel causal no desenvolvimento da obesidade, estimulando a deposição de tecido adiposo unilocular e alterando a ingestão de alimentos: cultura celular e estudos em animais mostram que o estresse oxidativo aumenta a proliferação de pré-adipócitos, assim como a diferenciação de adipócitos e o tamanho de adipócitos maduros (Furukawa et al. 2004; Lee et al. 2009; Higuchi et al. 2013) e espécies reativas de oxigênio parecem estar envolvidas no controle do peso corporal, exercendo diferentes efeitos sobre os neurônios hipotalâmicos que controlam a saciedade e o comportamento da fome (Horvath et al. 2009). Também foi demonstrado que a obesidade por si só pode induzir o estresse oxidativo sistêmico: de fato, o acúmulo de gordura aumenta a atividade de Nox e o estresse do retículo endoplasmático em adipócitos, o que favorece o aumento da produção de EROS (Furukawa et al. 2004; Mlinar et al. 2011). Outros fatores que contribuem para o estresse oxidativo na obesidade são a geração de EROS pós-prandial anormal (Patel et al. 2007), hiperleptinemia (Bełtowski et al. 2012), inflamação crônica (Bondia-Pons et al. 2012), disfunção tecidual (Serra et al. 2012) e reduzida atividade das defesas antioxidantes (Strauss 1999; Chrysohoou et al. 2007).

A deposição de gordura elevada está estritamente relacionada ao desequilíbrio redox do organismo. Excesso de peso e obesidade juvenis e adultos têm sido associados a altos níveis de estresse oxidativo (Tran et al. 2012; Warolin et al. 2013), uma vez que indivíduos obesos apresentam maiores níveis de produtos proteicos de oxidação avançada (AOPPs) e de malonaldeído, que os indivíduos controle (D'Archivio et al. 2012). Em adultos, o IMC, a gordura corporal total e a circunferência da cintura demonstraram estar positivamente correlacionados com os níveis urinários de F2-isoprostano (composto similar a prostaglandinas sintetizado a partir da peroxidação de ácidos graxos essenciais) e inversamente correlacionados com a atividade anti-inflamatória da paraoxonase-1 (PON1) (Ferretti et al. 2010; Aslan

et al. 2011). Em camundongos, a obesidade induzida por dieta aumenta o não só estresse oxidativo cerebrocortical (Freeman et al. 2013) como também se correlaciona com a disfunção mitocondrial e o aumento do estresse oxidativo no músculo esquelético, no fígado (Yuzefovych et al. 2013) e nas gônadas (Vigueras-Villasenõr et al. 2011). Corações de roedores mantidos em dieta hiperlipídica aumentaram os índices de oxidação lipídica e protéica, assim como aumentaram os marcadores de apoptose (Wang e Kaufman 2012).

Apesar da forte associação entre obesidade e estresse oxidativo, nenhum dos marcadores acima mencionados é um preditor do desenvolvimento da obesidade, mas, ao contrário, esses biomarcadores podem prever o desenvolvimento e a progressão de doenças metabólicas e cardiovasculares em pessoas com sobrepeso e obesas. Foi encontrada uma correlação positiva entre marcadores de estresse oxidativo e marcadores de inflamação, hiperglicemia e hiperlipidemia. Em indivíduos jovens com sobrepeso e obesidade, as AOPPs correlacionam-se positivamente com a obesidade, níveis de triglicerídeos e insulina medidos, e correlacionam negativamente com as taxas de glicose/insulina e colesterol-HDL, sugerindo um aumento do risco metabólico nesses indivíduos (Krzystek-Korpacka et al. 2008; Codoñer-Franch et al. 2012). F2-isoprostanos urinários compreendem marcadores positivamente associados com citocinas pró-inflamatórias circulantes, como proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e IL-6 (Pou et al. 2007) que são preditores de diabetes e doenças cardiovasculares (Dandona et al. 2005; Bondia-Pons et al. 2012). Aumento dos níveis séricos de um outro marcador para estresse oxidativo, os AGEs (produtos finais de glicosilação avançada) prediz a redução na atividade e até mesmo a morte cardiovascular em mulheres com diabetes tipo 2 (Kilhovd et al. 2007).

Embora haja grande quantidade de estudos acerca da progressão do estresse oxidativo tecidual ou sistêmico em indivíduos obesos, poucos são os estudos que abordam a influência da obesidade sobre os marcadores de estresse oxidativo gonadal e a redução na atividade antioxidante endógena (Olivares et al. 2010; Vigueras-Villasenõr et al. 2011; Wang et al. 2015). Olivares e colaboradores (2010) relatam o desenvolvimento de hipogonadismo hipogonadotrópico (insuficiência na produção androgênica) em indivíduos adultos obesos. Nessas situações uma série de fatores pode afetar a regulação endócrina gonadal, tais como a resistência à insulina e leptina, as quais estão associadas às baixas concentrações séricas de LH, enquanto esta última associada à hiperleptinemia induz a apoptose das células de Leydig, contribuindo, assim, aos reduzidos níveis de testosterona apresentados pelos indivíduos obesos. Por sua vez, Vigueras-Villasenõr et al. (2011) relataram um aumento nos níveis de malonaldeído testicular e epididimal nos indivíduos alimentados com dieta hiperlipídica. Em associação a tanto, eles observaram um aumento na temperatura escrotal acompanhada por grande taxa de apoptose e menor viabilidade espermática em tais indivíduos (Vigueras-Villasenõr et al. 2011). Já Wang et al. (2015)

relataram uma redução na expressão gênica para GPx e SOD testiculares em camundongos obesos, e relacionaram esse evento com a redução na esteroidogênese, também observada.

Vários estudos mostraram que o estresse oxidativo no sêmen e testículos está positivamente correlacionado com o aumento do IMC e danos no DNA espermático, e negativamente correlacionado com a diminuição da motilidade espermática e capacidade de reação acrossomal (Bakos et al. 2011; Tunc et al. 2011). Assim, obviamente, o estresse oxidativo excessivo é um dos mecanismos potenciais que levam à má qualidade dos espermatozoides em homens obesos. Adicionalmente, Garolla et al. (2015) e Viguera-Villasenor et al. (2011) mostraram que o acúmulo de gordura escrotal em homens obesos provoca uma elevação da temperatura gonadal e também pode contribuir para parâmetros espermáticos alterados. Isso decorre do fato de que o processo de espermatogênese é altamente sensível ao calor, com temperatura ideal variando entre 34°C e 35°C em humanos, e em homens obesos essa temperatura tende a ser maior que 37°C (Garolla et al. 2015). Definitivamente, o aumento do calor testicular pode reduzir substancialmente a motilidade e a concentração de espermatozoides no sêmen e também aumentar o dano do DNA assim como o estresse oxidativo espermático (Du Plessis et al. 2010). Além disso, existe uma correlação positiva entre o aumento do IMC e maiores níveis de EROS no plasma seminal (Taha et al. 2016). Em particular, os espermatozoides são individualmente suscetíveis ao estresse oxidativo devido a suas organelas especialmente simplificadas e capacidade defensiva antioxidante limitada. Nos espermatozoides, as EROS são geradas principalmente a partir das mitocôndrias e, em condições normais, podem ser facilitadas com reconhecimento, fusão e fertilização de óvulos-espermatozoides posteriormente (Amaral et al. 2013); no entanto, altos níveis de EROS tendem a atacar os lipídios na membrana plasmática espermática, assim como seus DNAs mitocondriais e nucleares (Aitken et al., 2016).

Por fim, o estresse oxidativo e a inflamação parecem estar intimamente interligados com a obesidade, embora seja difícil estabelecer a sequência temporal de sua relação. Por exemplo, vários fatores de transcrição pró-inflamatórios, incluindo o fator nuclear κ B (NF- κ B) e a proteína ativadora-1 (APO-1), são sensíveis à oxirredução. Nesse cenário, as EROS desencadeiam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez aumentam a produção de EROS (Bryan et al. 2013), estabelecendo assim um círculo vicioso. O estresse oxidativo sistêmico e a inflamação também constituem fatores-chave na patogênese das doenças relacionadas à obesidade, incluindo aterosclerose, resistência à insulina, diabetes tipo 2, câncer e a síndrome metabólica (Dandona et al. 2005; Crujeiras et al. 2013). Recentemente, tem sido sugerido que o aumento do estresse oxidativo e da inflamação na obesidade também intensificam os processos de envelhecimento (Tzanetakou et al. 2012).

1.4.3. Alterações Inflamatórias

Evidências acumuladas sugeriram uma correlação positiva entre inflamação crônica ou estado de pró-inflamação e obesidade humana assim como em modelos animais (Divella et al. 2016; Griffin et al. 2016; Kolb et al. 2016). Os adipócitos uniloculares produzem e secretam um grande número de moléculas, coletivamente chamadas de adipocitocinas, cuja maioria como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-17) são citocinas pró-inflamatórias, as quais favorecem e intensificam o processo inflamatório, atraindo os macrófagos para os locais inflamados. Acredita-se que as citocinas pró-inflamatórias contribuam para o rompimento da homeostase da glicose e da resistência insulínica muitas vezes associada à obesidade. Huang et al. (2016) ao realizar exames em homens obesos, observou elevados índices de TNF- α e IL-6 no soro sanguíneo, assim como no tecido testicular e no plasma seminal dos mesmos (Zhang et al. 2015, Huang et al. 2016).

Está agora bem documentado que as citocinas pró-inflamatórias exercem alguns impactos no eixo HPG, e, por conseguinte na fertilidade (Tsatsanis et al. 2015). As doenças inflamatórias sistêmicas, como a artrite reumatoide, estão associados a níveis reduzidos de testosterona. A citocina pró-inflamatória TNF- α inibe diretamente a função do hormônio LH, levando, subsequentemente à baixos níveis de testosterona e à subfertilidade masculina (Iwasa et al. 2009). Portanto, o aumento sistêmico de citocinas inflamatórias no soro sanguíneo de homens obesos pode induzir a uma perda na produção de andrógenos em vários níveis do eixo “hipotalâmico-hipofisário-células de Leydig”.

No testículo, as citocinas pró-inflamatórias podem afetar diretamente o epitélio seminífero. As células de Sertoli respondem a muitas dessas moléculas, principalmente IL-1, TNF- α e interferons. Foi postulado que estas moléculas afetam a expressão e a montagem das proteínas juncionais como as ocludinas, claudinas e proteínas citoesqueléticas de actina-miosina, e assim induzem a abertura das junções celulares entre as células de Sertoli adjacentes. Esses distúrbios resultam em desequilíbrios no nicho do epitélio seminífero essencial para a espermatogênese (Zhang et al. al. 2014, Chojnacka et al. 2016, Li et al. 2016, Stanton 2016). De fato, estudos realizados por Liu et al. (2014) e Fan et al. (2015) relataram o rompimento da barreira hemato-testicular combinado com a diminuição na expressão de proteínas juncionais em células de Sertoli em muitos modelos animais obesos induzidos por dieta (Liu et al. 2014; Fan et al. 2015).

Além disso, a maturação espermática no epidídimo é crucial para que os espermatozoides adquiram a capacidade motora assim como a capacidade de fertilização. O epitélio epididimal transporta proteínas e lipídios através de vesículas para a membrana espermática, para a qual são necessários para a maturação espermática (Sullivan 2015). O estado pró-inflamatório induzido pela obesidade também pode prejudicar a função do epitélio epididimal, alterando seu microambiente, através da modificação dos conteúdos vesiculares e do aumento no influxo de neutrófilos e macrófagos para o lúmen epididimal.

Esses eventos culminam, potencialmente, em maior expressão de citocinas e apoptose epitelial, o que impede a maturação espermática e sua capacidade de fertilização. Conseqüentemente, a presença de citocinas pró-inflamatórias intratesticulares e intraepididimais interfere em processos regulatórios críticos da espermatogênese e da maturação espermática (Liu e Ding 2017).

Ademais, a obesidade associada ao estado inflamatório crônico, causa maior taxa de desequilíbrio metabólico e aumento da formação de EROS no tecido testicular, trato reprodutivo e sêmen. As citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e o TNF- α , alteram o epitélio seminífero e o epitélio epididimal, gerando altos níveis de EROS, assim como estas próprias afetam o funcionamento celular, favorecendo a síntese de novas citocinas pró-inflamatórias. Além disso, sabe-se que a inflamação atrai leucócitos fagocitários infiltrantes, de modo a induzir o estresse oxidativo nos órgãos reprodutivos masculinos (Henkel 2011; Lavranos et al. 2012). Por sua vez, um estudo realizado por Bryan e colaboradores (2013) destacaram que o excesso de EROS produzidas pelo tecido adiposo unilocular desencadeia a liberação das citocinas pró-inflamatórias, as quais atraem localmente os glóbulos brancos, e estes contribuem não só para o aumento da inflamação como também à produção tecidual de EROS. Assim, embora esteja já bem conhecida a relação entre obesidade, processos inflamatórios e estresse oxidativo, pouco é conhecido acerca de sua influência nos órgãos do aparelho reprodutor masculino, bem como de sua ordem de ocorrência.

1.5. Compostos Naturais

Numerosos estudos confirmaram a associação positiva entre dieta rica em alimentos vegetais e bom estado de saúde (Crujeiraseiras et al. 2006; González-Castejón e Rodriguez-Casado 2011; Kaczmarczyk et al. 2012). Os efeitos positivos desses alimentos inúmeras vezes dependem de seu conteúdo fitoquímico, vitaminas antioxidantes e fibras. A maioria desses compostos dietéticos contribui para um bom balanço redox por vários mecanismos, tais como a eliminação direta ou a neutralização de radicais livres, a modulação da atividade e expressão de enzimas diversas e a ação anti-inflamatória. Uma dieta com alta capacidade antioxidante total (um índice de capacidade antioxidante cumulativo em alimentos) tem sido encontrada inversamente relacionada à adiposidade central, marcadores de estresse metabólico e oxidativo, e risco de acidente vascular cerebral isquêmico (Del Rio et al. 2011; Hermsdorff et al. 2011). Em particular, um papel benéfico de frutas cítricas na obesidade e nas doenças associadas à obesidade foi demonstrado por estudos clínicos. Dados da Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição (NHANES) realizada entre 2003 e 2006 mostram que os consumidores de suco de laranja são 21% menos propensos a serem obesos e os consumidores masculinos têm 36% menos probabilidade de ter síndrome metabólica, em comparação com os não consumidores (O'Neil et al. 2012). Um efeito positivo do suco de laranja é ainda apoiado pela observação de que essa bebida neutraliza o estresse oxidativo pós-prandial

assim como a inflamação induzida pela refeição rica em carboidratos e gordura (Ghanim et al. 2010b). O consumo diário de suco de tangerina (500 mL de suco de tangerina puro) afeta positivamente as defesas antioxidantes e diminui os biomarcadores oxidativos em crianças obesas (Codoñer-Franch et al. 2010). Outros exemplos de alimentos vegetais úteis são brócolis e cenoura. O consumo de brotos de brócolis melhora o estresse oxidativo em condições diabéticas: a ingestão de 10g/dia de brotos de brócolis contribui para o aumento sérico na capacidade antioxidante total, além da redução no índice de estresse oxidativo em 21 pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (Bahadoran et al. 2011). Em 17 indivíduos com sobrepeso com níveis elevados de colesterol e triglicérides no plasma, a ingestão de suco de cenoura (470 mL) aumentou significativamente a capacidade antioxidante total e reduziu os níveis plasmáticos de malonaldeído. Curiosamente, este estudo relatou que a melhora no equilíbrio redox não foi acompanhada de diminuição nos marcadores de risco cardiovascular, demonstrando que o alto consumo de um único alimento vegetal sem modificações no estilo de vida não é suficiente para melhorar os perfis lipídicos.

Dentre os diferentes suplementos naturais (vitaminas C, E, carotenoides polifenóis entre outros), os compostos fenólicos constituem os fitoquímicos mais abundantes presentes nos alimentos de origem vegetal, sendo amplamente distribuídos em frutas, legumes, cereais integrais, café, cacau e chá. Nos últimos anos, numerosos estudos *in vitro* e em animais forneceram evidências de que os polifenóis são agentes protetores contra patologias desencadeadas por eventos oxidantes, incluindo doenças cardiovasculares, distúrbios metabólicos, câncer e obesidade (González-Castejón e Rodriguez-Casado 2011; Pedret et al. 2012). No entanto, os alvos moleculares relacionados aos processos patogênicos ainda não foram totalmente caracterizados. A atividade antioxidante dos polifenóis depende de sua capacidade em atuar como moléculas captadoras, bem como inibir as enzimas geradoras de EROS (incluindo Nox e iNOS) e aumentar a expressão de enzimas antioxidantes (incluindo a Superóxido Dismutase, Catalase e aquelas responsáveis pela manutenção do ciclo da glutatona). Os polifenóis podem ter propriedades anti-obesidade, anti-inflamatórias, antidiabéticas e anticancerígenas através de múltiplos mecanismos: atuam modulando a inflamação e o estado redox tecidual e sistêmico, regulando a diferenciação dos adipócitos e o metabolismo lipídico, por meio da inibição da atividade da lipase pancreática e a permeabilidade intestinal, e interagindo com a microbiota intestinal (De la Garza et al. 2011; Hollman et al. 2011; Baret et al. 2013). No entanto, faltam estudos prospectivos em humanos e não é possível estabelecer uma relação causal entre polifenóis, obesidade e doenças crônicas (Hollman et al. 2011). Poucos ensaios clínicos e pré-clínicos de curto prazo investigaram o papel da suplementação de compostos fenólicos sobre a obesidade e em doenças relacionadas à obesidade, avaliando marcadores de estresse oxidativo e inflamação, bem como fatores de risco de tolerância à glicose (Leiberer et al. 2013).

Mais recentemente, compostos fenólicos têm sido estudados por sua ação na sinalização celular, particularmente na modificação de vias de inflamação. Algumas dessas ações podem ser diretas

e outras são propostas como secundárias para modificar o equilíbrio redox das células. Ações mais diretas podem incluir receptores bloqueadores ou reguladores negativos ou fatores de transcrição que levam à expressão gênica pró-inflamatória, tais como receptores de interleucina (IL) e TLR-4, fator nuclear κ B (NF- κ B), proteína ativadora-1 (APO-1), e quinases JNK ou atuando como um ligante natural para receptor γ ativado por proliferador de peroxissomos (PPAR- γ), que por sua vez, modula a expressão gênica inflamatória. A ativação do PPAR- γ também pode modificar estímulos inflamatórios para TLRs através de seus efeitos sobre a redistribuição de gordura no tecido adiposo (Tsai e Maeda 2005). Ademais, os compostos fenólicos também possuem um potencial efeito pré-biótico, através do qual os mesmos alteram a composição e função da microbiota intestinal, a permeabilidade intestinal assim como os estímulos pró-inflamatórios intestinais (Lee et al. 2006). Os polifenóis também podem aumentar benéficamente a produção de moléculas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10, IL-13 e adiponectina (Nagasako-Akazome et al. 2007; Scazzocchio et al. 2011). Em geral, compostos fenólicos encontrados em frutas e legumes possuem múltiplos caminhos para beneficiar a saúde humana; principalmente através de suas ações na modificação de eventos celulares para promover o equilíbrio entre estado inflamatório e estado normal.

Embora mecanismos gerais de ação possam ser identificados, cada polifenol pode exercer efeitos fisiológicos distintos, dependendo de sua estrutura química, biodisponibilidade e metabolismo. De acordo com sua estrutura química, os polifenóis são classificados em diferentes categorias: ácidos fenólicos, estilbenos, flavonoides (flavonois, antocianinas, flavanonas, flavonas, flavanonois e isoflavonas), calconas, lignanas e curcuminoides (Savini et al. 2013).

Dentre os compostos fenólicos, o resveratrol (Figura 4) tem se mostrado muito útil no combate a obesidade, distúrbios metabólicos, doenças cardiovasculares e câncer, através de múltiplas ações: aumenta a atividade mitocondrial, neutraliza o acúmulo de lipídios, diminui a inflamação, melhora a sinalização de insulina e modula o equilíbrio redox. Um estudo realizado por De Groot et al. (2012), relatou que a suplementação de trifosfato de resveratrol (300 mg por dia) durante 28 dias, reduziu os parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo e modulou a expressão de genes sensíveis ao redox nas células sanguíneas de indivíduos obesos. Por sua vez, Siriwardhana et al. (2013) observou que em adipócitos humanos maduros, o resveratrol reduziu a expressão de mediadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-6, COX-2) e inibiu a sinalização de NF- κ B; também induziu lipólise e apoptose, reduzindo a lipogênese e a proliferação de células adiposas (González-Castejón e Rodríguez-Casado 2011; Siriwardhana et al. 2013). Em pré-adipócitos, o resveratrol regula negativamente a expressão do PPAR- γ (um receptor nuclear de hormônio, regulando a diferenciação de adipócitos, sensibilidade à insulina e suscetibilidade à obesidade) e aumenta a expressão de genes modulando a atividade mitocondrial (Rayalam et al. 2008). Efeitos metabólicos comparáveis também foram observados em humanos: um estudo randomizado cruzado em homens obesos saudáveis mostra que a suplementação de resveratrol

(150 mg ao dia) por 30 dias reduziu o estresse oxidativo e mimetizou o efeito da restrição calórica (Timmers et al. 2011). Além disso, outra ação positiva do resveratrol na obesidade depende da sua capacidade de reduzir as respostas oxidativas e inflamatórias induzidas por dietas hiperlipídica. Esse efeito é alcançado através da redução na atividade da Nox e indução da expressão da glutathione S-transferase-1P em células mononucleares (Ghanim et al. 2010a), assim como prevenção da ruptura da barreira intestinal mediada pelo estresse oxidativo (Elamin et al. 2013).

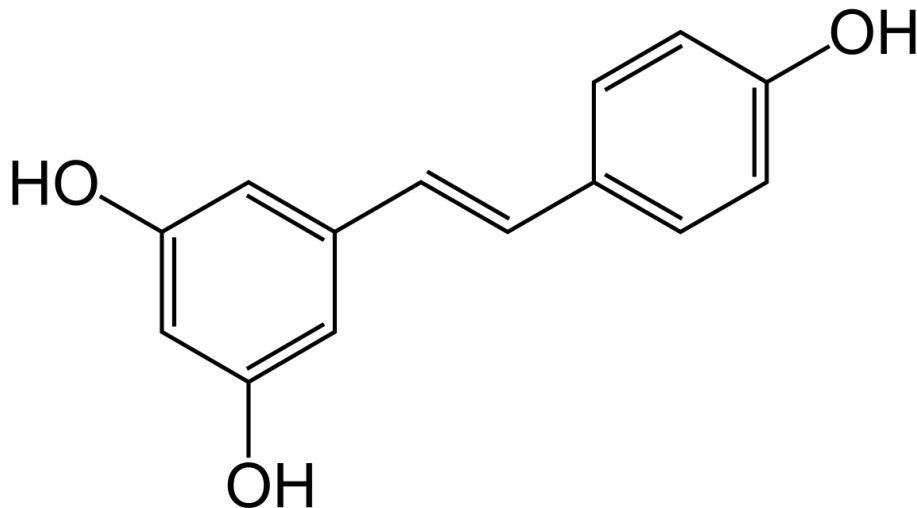


Figura 4: Esquema representativo da fórmula química estrutura do Resveratrol.

Outro composto fenólico relevante é a quercetina (Figura 5). Este flavonol é encontrado em maçãs, cebolas, cebolinha, brócolis e chás, sendo conhecida por ter múltiplas funções biológicas, incluindo atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e anti-mutagênicas. Um estudo realizado por Anhê et al. (2012) concluiu que a quercetina atenuou a adipogênese nos miotubos de células esqueléticas de ratos Wistar, enquanto em ratos obesos ela reduziu a inflamação e melhorou a sensibilidade à insulina, através do aumento da expressão de GLUT4 e redução da fosforilação das quinases JNK, bem como a expressão de TNF- α e iNOS no músculo esquelético dos mesmos. Em adipócitos primários humanos, Chuang et al. (2010) relatou que o tratamento com quercetina preveniu a resistência à insulina e regulou negativamente a inflamação, atenuando a expressão de IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-17 e MCP-1. Em complemento, Rivera et al. (2008) relatou que a suplementação de quercetina (10 mg/kg) diminuiu o estado inflamatório no tecido adiposo de ratos Zucker obesos, além de ter melhorado a dislipidemia, hipertensão e hiperinsulinemia. Ademais, a quercetina também reduz os níveis circulantes de glicose, insulina, triglicerídeos e colesterol em camundongos e ratos alimentados com uma dieta hipercalórica e aumenta a expressão bem como a secreção de adiponectina (hormônio proteico responsável por modular

a regulação da glicemia e o catabolismo de ácidos graxos) (Leiberer et al. 2013). Em indivíduos com sobrepeso e obesidade, a suplementação diária de quercetina (150 mg durante seis semanas) diminuiu significativamente os níveis de LDL oxidada e o TNF- α (Egert et al. 2010).

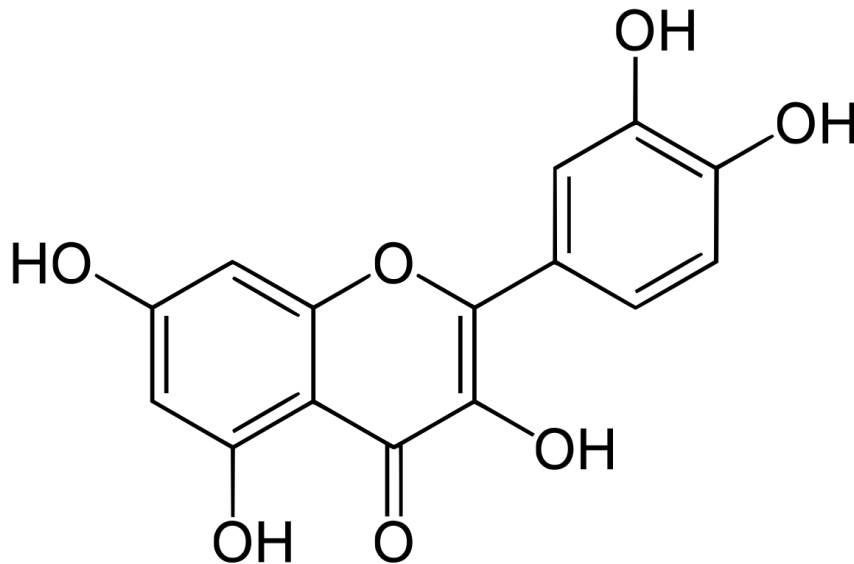


Figura 5: Esquema representativo da fórmula química estrutural das Quercetinas.

Além das quercetinas, outra relevante subfamília de flavonoides compreende as antocianinas (Figura 6). Vários estudos demonstraram os efeitos anti-inflamatórios das mesmas. Diferentes classes de antocianinas (cianidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-glicosídeo e a petunidina-3-glicosídeo) inibiram as atividades de NF- κ B através da via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) em diferentes condições, tais como: em camundongos CD-1 (Afaq et al. 2005), nos quais inibiu a tumorigênese de pele; e células microgliais da linhagem BV2 (Jeong et al. 2013), nas quais reduziram a resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeos. Em um estudo realizado por Rossi e colaboradores (2003), observou-se que a cianidina-3-glicosídeo, concentrada no extrato de amora preta, atenuou de maneira dose-dependente vários parâmetros pró-inflamatórios nos pulmões de ratos Wistar infectados com carragenina. Além disso, Ju et al. (2011) relatou que o extrato da casca da batata-doce roxa exerceu atividades antilipogênicas pela supressão de enzimas e fatores de transcrição adipogênicos, e teve um efeito antiinflamatório pela regulação negativa de COX-2 e IL-6 em adipócitos de camundongos (linhagem: 3T3-L1).

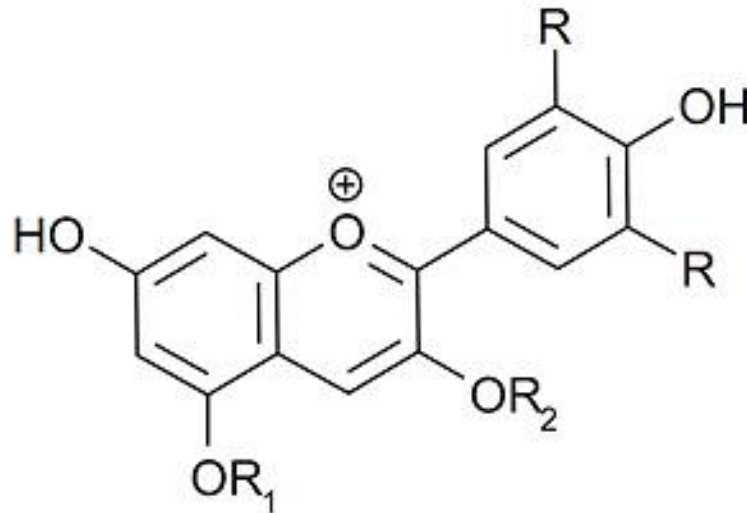


Figura 6: Esquema representativo da fórmula química estrutural de antocianinas. Cada R representa uma cadeia lateral da molécula.

Essas atividades biológicas das antocianinas estão intimamente relacionadas à incidência de doenças crônicas. De fato, as antocianinas reduziram os fatores de risco para doenças cardiovasculares (Wallace et al. 2016) e suprimiram o crescimento celular em várias linhas celulares de câncer, indicando que as antocianinas possuem importantes propriedades anticancerígenas (Lin et al. 2017). O consumo de antocianinas reduziu o peso corporal e a resistência à insulina, levando à tolerância à glicose restaurada (Vendrame et al. 2016; Overall et al. 2017).

As catequinas, por sua vez, são os flavonóis mais abundantes contidos em chás, além de estarem também presentes no cacau, uvas e vinho tinto (Pérez-Jiménez et al. 2011). Estas abrangem as seguintes classes: catequinas, epicatequinas, galocatequinas, epigalocatequinas e seus galatos respectivos (Figura 7). Em ratos, as catequinas reduzem significativamente o estresse oxidativo e a inflamação, aumentando a expressão de catalase e SOD e diminuindo as atividades de Nox, iNOS, TNF- α e NF- κ B (Roghani e Baluchnejadmojarad 2010). Além disso, Chen et al. (2009) relatou que a suplementação com epigalocatequina (EGCG; 1mg/kg) elevou a termogênese, melhorou a tolerância à glicose e aumentou a expressão de PPAR- γ , em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica. Engelhard et al. (2006) relatou que em ratos diabéticos tratados com estreptozotocina, a administração de EGCG (25mg/kg) durante oito semanas estabeleceu uma condição hipoglicêmica paralela a um melhor perfil lipídico. Si et al. (2011) relatou que uma dieta enriquecida com epicatequina reduz os níveis de IGF-1 e prolonga a vida útil de camundongos diabéticos. Nos seres humanos, as catequinas têm sido comprovadas por melhorar a pressão arterial, colesterol LDL, obesidade e fatores de risco para doenças cardiovasculares. As bebidas ricas em catequina (chá verde contendo cerca de 600 mg de catequinas) melhoram a obesidade e a glicemia em doentes com diabetes mellitus tipo 2 (Nagao et al. 2009).

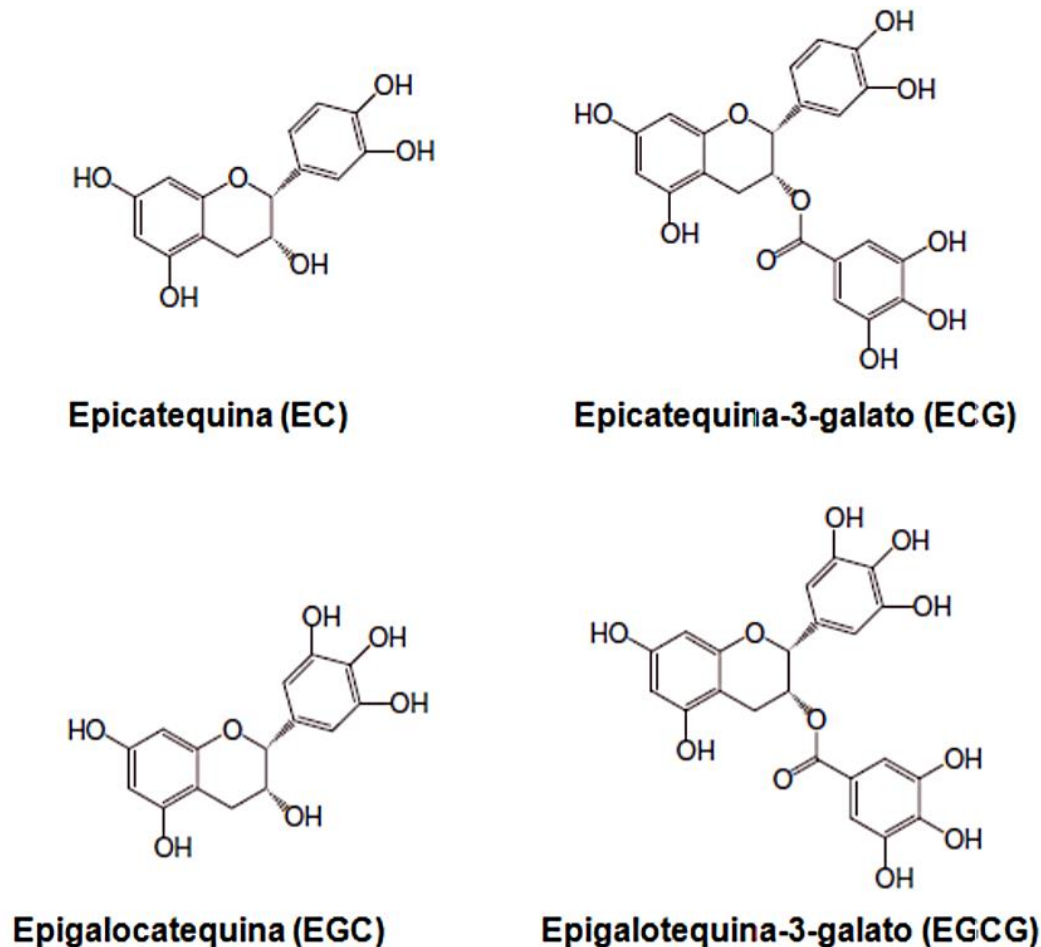


Figura 7: Esquema representativo das fórmulas químicas estruturais das epicatequinas e seus galatos. Modificado de De Albuquerque 2014.

As isoflavonas (genisteína, daidzeína e gliciteína) estão presentes nas leguminosas, grãos e vegetais, mas a soja é a fonte mais importante desses polifenóis na dieta (Figura 8). Graças à sua estrutura química, essas moléculas são capazes de exercer efeitos semelhantes ao estrogênio; por esta razão, são também classificados como fitoestrogênicos e são considerados úteis para o tratamento de cânceres hormônios-dependentes (em particular, cânceres de próstata e de mama) (Cimino et al. 2012). Estudos de segurança a longo prazo sugerem que as mulheres que consomem uma dieta rica em isoflavonas apresentam menor tendência a desenvolver cânceres de endométrio e de ovário (Eden 2012). Evidências recentes sugerem que esses compostos também protegem contra a obesidade e comorbidades (Hurt e Wilson 2012); seus efeitos antiadenogênicos e antilipogênicos podem ser devido à capacidade dos receptores de estrogênio em interagir com o PPAR, modulando o desenvolvimento adiposo, a sensibilidade insulínica e o metabolismo dos ácidos graxos. Outros mecanismos de proteção compreendem a redução do estresse oxidativo bem como da inflamação. A genisteína é considerada um candidato promissor para contrabalançar os efeitos deletérios das EROS, pois age como um antioxidante através da quelação de metais e do aumento tanto da relação de glutathiona reduzida/oxidada (GSH/GSSG) quanto do potencial

de membrana mitocondrial (Savini et al. 2013). Adicionalmente, a genisteína tem a capacidade de restaurar as atividades enzimáticas antioxidantes e reduzir a produção de EROS, citocinas pró-inflamatórias, bem como os conteúdos de iNOS e NOS endotelial (eNOS). Em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, as moléculas de genisteína inibem a inflamação e a progressão da esteatose hepática, através da ativação da proteína JNK (c-Jun amino-terminal quinase) e inibição do NF- κ B, bem como a secreção de TNF- α e IL-6 (Behloul e Wu 2013). Em mulheres pós-menopáusicas, a suplementação de genisteína (> 1 mg/dia) diminuiu o IMC bem como o tamanho da cintura, além de ter aumentado os níveis séricos de HDL (Goodman-Gruen e Kritz-Silverstein 2001, 2003). Assim, seis meses de suplementação de isoflavona (80 mg por dia) em mulheres saudáveis tem a capacidade de diminuir o dano oxidativo de DNA e aumenta a capacidade antioxidante total plasmática (Erba et al. 2012).

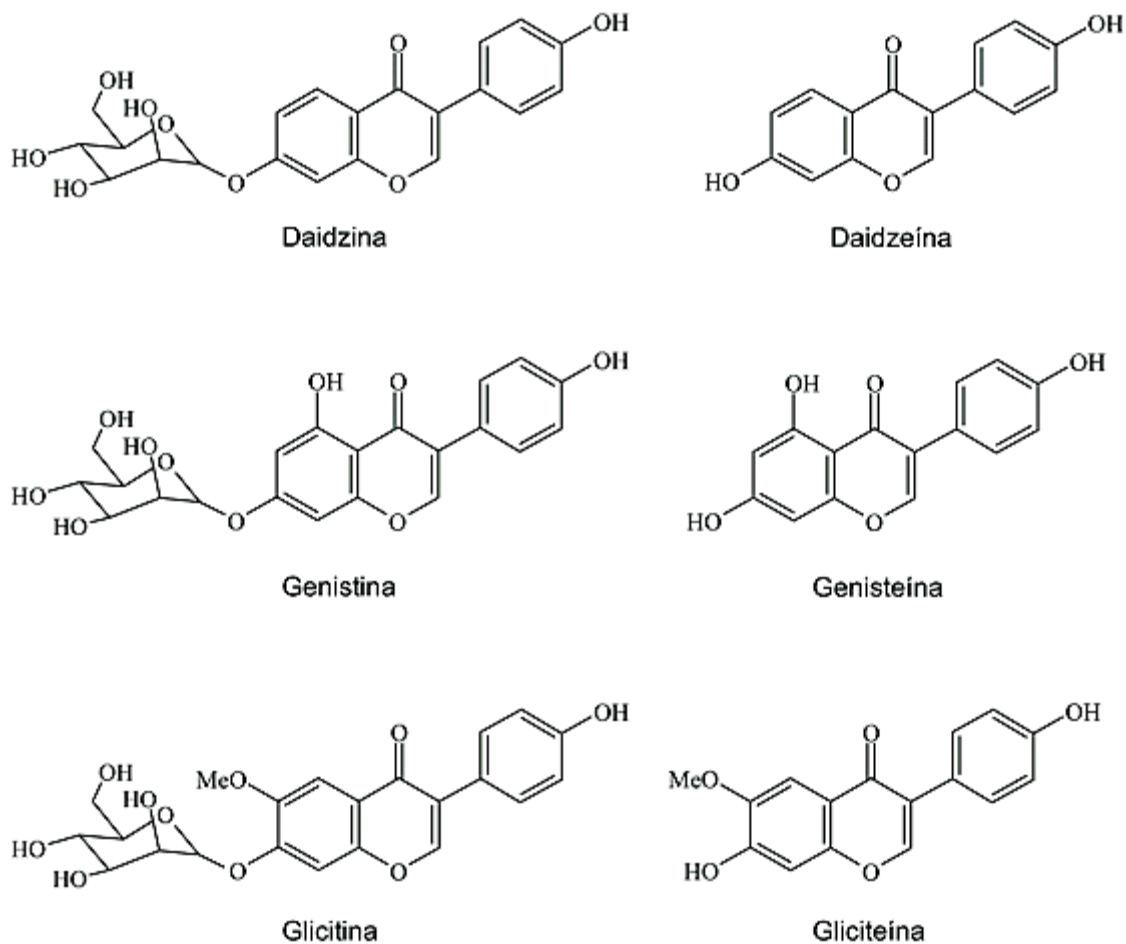


Figura 8: Esquema representativo das fórmulas químicas estruturais de isoflavonas da soja. Modificado de Genovese et al. 2003.

A curcumina, um polifenol da classe dos curcuminoides, é o principal extraído da cúrcuma (uma especiaria derivada dos rizomas da *Curcuma longa*), além de possuir propriedades anticancerígenas, anti-inflamatórias, antiobesogênicas e antidiabéticas (Figura 9) (Shehzad et al. 2012). Os mecanismos de ação subjacentes envolvem a regulação de fatores de transcrição sensíveis às oscilações de oxirredução, citocinas inflamatórias e fatores de crescimento. A nível celular, a curcumina é capaz de induzir um leve estresse oxidativo e metabólico, resultando em respostas adaptativas caracterizadas pelo aumento do metabolismo de enzimas antioxidantes (como catalase e MnSOD) e de lipídeos (por exemplo: aP2/FABP4, CD36 e HMG-CoA redutase) (Zingg et al. 2013). No fígado, a curcumina previne a resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica e a obesidade, atenuando a lipogênese (Shao et al. 2012). No tecido adiposo, essa classe de polifenóis inibe a infiltração de macrófagos assim como a ativação do NF-κB (Bradford 2013). No músculo, ao ativar o Nrf2, esta melhora o nível de estresse oxidativo e a tolerância à glicose (He et al. 2012). Finalmente, a curcumina tem uma atividade anticancerígena bem reconhecida que, pelo menos em alguns casos, é decorrente de seus efeitos semelhantes ao estrogênio (Bachmeier et al. 2010).

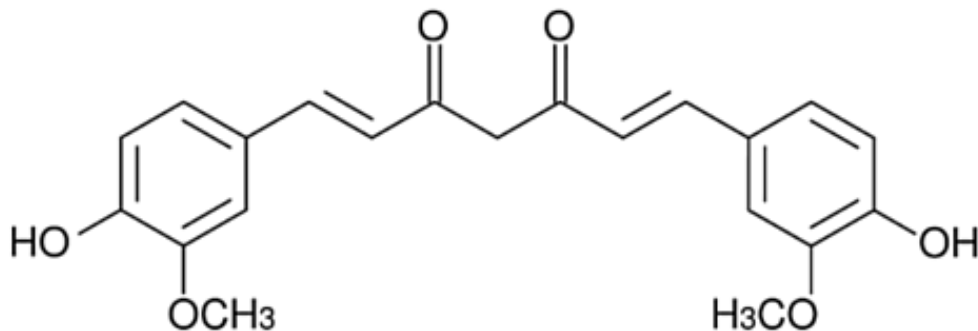


Figura 9: Esquema representativo da fórmula química estrutural da curcumina.

Por fim, têm-se os capsaicinoides e capsinoides, os quais compreendem alcaloides encontrados principalmente em pimentas vermelhas e pimentões. Estes exercem ações farmacológicas e fisiológicas, incluindo efeitos anticancerígenos, anti-inflamatórios, antioxidantes e antiobesogênicos (Luo e Peng 2011). Tem sido relatado que o consumo de capsaicinoides aumenta o gasto energético e a oxidação lipídica, reduz o apetite bem como o consumo de energia, favorecendo assim a perda de peso (Whiting et al. 2013). Os mecanismos moleculares de ação não são totalmente compreendidos, embora esteja estabelecido que a estimulação do potencial receptor transiente do tipo vaniloide-1 (TRPV1) seja responsável por muitos dos efeitos observados. A capsaicina também atenua as respostas inflamatórias

induzidas pela obesidade reduzindo os níveis de TNF- α , IL-6, IL-8 e MCP-1 (Choi et al. 2011), da mesma forma que atenua os níveis de adiponectina, importantes para a resposta à insulina (Kang et al. 2011).

Portanto, a ingestão de alimentos ricos em compostos fenólicos tem sido associada a uma série de benefícios à saúde, já que os mesmos têm sido relacionados à redução do risco de doenças cardiovasculares, progressão da memória, além da proteção contra obesidade e alterações glicêmicas (Brito et al. 2007). Tais melhorias devem-se às propriedades bioquímicas dos fenólicos, dentre as quais destacam-se (1) elevada atividade antioxidante; (2) capacidade de modificar eventos moleculares para o melhoramento de funções endoteliais e inibição de agregação plaquetária, auxiliando na prevenção de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas; (3) propriedades e atividades anti-inflamatórias envolvidas na atividade estrogênica, peroxidação lipídica, inibição enzimática e aumento da produção de citocinas reguladoras da resposta imune pela inibição da via de NF- κ B; (4) proteção contra resistência à insulina; (5) controle da progressão da diabetes mellitus e da hipertensão bem como (5) regulação do avanço da obesidade pela redução nas taxas de colesterol e triglicérides (Brito et al. 2007; Tsuda et al. 2003; Defuria et al. 2009; Wu et al. 2012).

1.5.1. Jaboticaba

A jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*; *Myrciaria jaboticaba*), pertencente à família Myrtaceae, é uma planta de cor roxa escura, nativa do Brasil, e está distribuída em todo o bioma da Mata Atlântica, sendo conhecida internacionalmente como a “uva do Brasil” (Wu et al. 2012). O fruto tem uma aparência e textura semelhante à das uvas, mas com uma casca mais espessa, resistente e escura. Cada fruto contém de uma a quatro sementes na polpa branca. Comum nos mercados brasileiros, as jaboticabas são consumidas frescas, bem como em formas processadas em compotas, sucos e licores. Sua popularidade foi comparada àquela das uvas em outros países (Reynertson et al. 2006; Wu et al. 2012).

Vários estudos já analisaram a composição das diferentes espécies de jaboticaba. Esta é considerada a fruta brasileira com a maior fonte de antocianinas, uma classe específica de flavonoides (compostos fenólicos), concentrada majoritariamente em sua casca. As antocianinas são responsáveis pela coloração arroxeadada de várias frutas, destacando-se nesse caso a jaboticaba (Leite et al. 2011). Os respectivos fenólicos são constantemente associados às atividades antioxidante, anti-inflamatória e anti-carcinogênica assim como à prevenção de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, evidenciando, pois, a relevância ao consumo da casca de jaboticaba, anteriormente discutida (Tsuda et al. 2003; Brito et al. 2007). Além de antocianinas, vários estudos descreveram a presença de outros compostos fenólicos na casca da referente fruta, tais como terpenos, ácidos fenólicos, quercitinas, isoquercitinas, ácido gálico, ácido elágico e depisídeos (jaboticabina). A este último é atribuído às atividades antibióticas, antivirais e antiproliferativas, sendo o mesmo considerado potente anti-inflamatório não esteroide. Adicionalmente,

a jaboticaba possui uma abundante composição em carboidratos, minerais, aminoácidos, vitaminas, especialmente a vitamina C, carotenoides e fibras solúveis e insolúveis, de modo que a mesma seja considerada uma “super fruta” (Reynertson et al. 2006; Rufino et al. 2010; Lenquiste et al. 2012; Plagemann et al. 2012).

Em corroboração às propriedades bioquímicas relatadas aos compostos fenólicos, Leite et al. (2011) evidenciaram um significativo aumento no potencial antioxidante do plasma em ratos por meio da ingestão da casca de jaboticaba desidratada. Além disso, fora demonstrado o efeito antiproliferativo do extrato da casca de jaboticaba contra células tumorais sem indução de danos ao DNA ou efeitos mutagênicos (Leite-Legatti et al. 2012). Por sua vez, Reynertson et al. (2006) relataram uma intensa atividade anti-radical referente ao extrato de jaboticaba, assim como a inibição da síntese de IL-8 (interleucina 8) por parte do respectivo componente. Outros estudos atribuíram o aumento à sensibilidade insulínica em ratos obesos aos compostos bioativos presentes na casca da jaboticaba, relacionando tal fato à capacidade destes em atenuar os processos inflamatórios pela redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β e IL-17) também envolvidas no metabolismo glicosídico (Defuria et al. 2009; Dragano et al. 2013). Wang et al. (2014) analisaram o efeito do tratamento com o extrato aquoso das sementes de jaboticaba em células humanas de carcinoma oral (linhagem: HSC-3). Estes observaram que o tratamento ativava a via apoptótica das células cancerígenas, por induzir a atividade da caspase-3, assim como a Bcl-2 e Bcl-xL, além de regular negativamente a expressão gênica de Survivina (membro da família de proteínas inibidoras de apoptose que inibe as caspases e bloqueia a morte celular). De Andrade et al. (2015) testaram o efeito do extrato hidroalcoólico da casca de *M. cauliflora* via infusão intravenosa em ratos Wistar. Estes relataram que o extrato favoreceu a redução da pressão arterial, além de aumentar o fluxo sanguíneo aórtico sem alterações na frequência cardíaca. Em um estudo Inada e colaboradores (2018) produziu um suco de jaboticaba (*M. jaboticaba*) por extração a vapor e relatou, além de seu elevado teor de compostos fenólicos, sua intensa atividade antimicrobiana para *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*. Quatrin et al. (2018) relataram que o consumo da casca de jaboticaba em pó por ratos Wistar diabéticos atenuou condições de hiperglicemia e dislipidemia, pela ativação da síntese da glutatona, pela qual promoveu o aumento da proporção de GSH/GSSG, além de modular o equilíbrio redox dos grupos tiol-dissulfeto no fígado desses animais. Mais recentemente, Lamas et al. (2018) ao realizar um novo método de extração de compostos fenólicos da casca da jaboticaba (*M. jaboticaba*) relacionou seu elevado teor de antocianinas e ácido gálico, à sua potente capacidade antioxidante. Relataram também que o extrato reduziu os níveis de esteatose hepática em camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica, bem como os níveis de marcadores pró-inflamatórios (TNF- α e NF- κ B), além de reduzir a resistência insulínica em camundongos obesos pré-diabéticos.

No geral, das publicações que mostram o efeitos dos compostos fenólicos sobre o aparelho reprodutor masculino a maioria evidencia a redução dos danos oxidativos, assim como a melhora na contagem e viabilidade espermática (Hala et al. 2010; Chenniappan e Murugan, 2017; Archana et al. 2018; Selmi et al. 2018). Nesse contexto, Chenniappan e Murugan (2017) observaram que o tratamento com extrato de *Ionidium suffruticosum* melhorou os níveis de catalase e SOD nos testículos e epidídimos, bem como a contagem de espermatozoides do epidídimo, em ratos Wistar albinos. Selmi et al. (2018) relataram uma redução nos níveis de radicais livres, bem como melhores níveis de GPx, catalase e SOD total, tanto nos testículos quanto no epidídimo de ratos Wistar intoxicados com malatião e tratados com óleo essencial de lavanda. Outro estudo observou que o extrato de semente de uva aumentou a contagem, a viabilidade e a mobilidade dos espermatozoides de ratos Sprague Dawley albinos contaminados com cloreto de alumínio (Hala et al. 2010). Além disso, de acordo com Archana et al. (2018) a co-administração de resveratrol resultou em uma melhora significativa na esteroidogênese e espermatogênese e mitigação do estresse oxidativo em ratos expostos ao cloreto de polivinil (PVC). Sendo assim, destacamos a relevância de uma reeducação alimentar rica em compostos antioxidantes para a recuperação da homeostase orgânica. Contudo, não existem estudos a respeito dos efeitos da suplementação alimentar com compostos fenólicos contra as alterações ocasionadas pelo envelhecimento e sobrepeso nos diferentes órgãos do aparelho reprodutor masculino, tanto na espécie humana quanto em roedores.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O processo de envelhecimento associado à obesidade afeta negativamente inúmeros parâmetros testiculares e epididimais, variando desde os processos fisiológicos aos morfológicos, de modo que ambos sejam considerados fatores de risco não só à fertilidade masculina, mas também à homeostase dos respectivos órgãos. Tais fatores promovem alterações no potencial redox e endócrinas que prejudicam a esteroidogênese testicular além de aumentar a taxa apoptótica das células germinativas e a proliferação anormal dos demais tipos celulares tanto no testículo como no epidídimo. Em contraposição a tais efeitos, a jabuticaba mostra-se rica em compostos fenólicos aptos a recompor a homeostase funcional e morfológica gonadal. Assim, o presente projeto visou caracterizar o possível efeito terapêutico da ingestão do extrato da casca de jabuticaba, sob os parâmetros histológicos (estruturais e ultraestruturais), moleculares e bioquímicos nos testículos e epidídimos de camundongos senis e obesos, frente ao incipiente conhecimento acerca do tema.

Os objetivos específicos foram:

- I. Avaliar os efeitos do extrato patenteado da casca de jabuticaba, altamente concentrado em compostos fenólicos, frente ao envelhecimento e dieta hiperlipídica sobre os aspectos histopatológicos e moleculares dos epidídimos e testículos de camundongos FVB;
- II. Quantificar os níveis proteicos dos antígenos relacionados ao processo inflamatório (COX-2, IL-17, NF- κ B e TNF- α) e proliferativo (PCNA) nos testículos e epidídimos de camundongos senis FVB e com sobrepeso induzido por dieta hiperlipídica, também submetidos ao tratamento com o extrato patenteado da casca de jabuticaba;
- III. Avaliar a incidência de células apoptóticas através da técnica de TUNEL nos camundongos FVB senis e com sobrepeso, submetidos ao tratamento com o extrato patenteado da casca de jabuticaba;
- IV. Quantificar os níveis proteicos dos antígenos relacionados à via hormonal (AR, ER α e Aromatase) nos testículos e epidídimos de camundongos senis FVB e com sobre peso induzido por dieta hiperlipídica, e tratados com o extrato patenteado da casca de jabuticaba;
- V. Analisar por método imunoenzimático (ELISA) os níveis intratesticulares e intraepididimais de marcadores antioxidantes endógenos (GSH, GR, GPx, SOD, Catalase), bem como de peroxidação lipídica, via técnica de TBARS, em camundongos FVB senis e com sobrepeso, também tratados com o extrato patenteado da casca de jabuticaba;
- VI. Correlacionar à ocorrência de processos inflamatórios e excesso de estresse oxidativo, com o desenvolvimento de patologias epididimais e testiculares, avaliando também os efeitos preventivos e recuperativos do extrato patenteado da casca de jabuticaba nos camundongos FVB senis e com sobrepeso;

3. MATERIAL E MÉTODOS GERAIS

3.1. Animais e Desenho experimental

Neste trabalho foram utilizados 70 camundongos da linhagem FVB provenientes do Biotério Central da Unicamp (CEMIB). Todos os procedimentos experimentais foram realizados segundo as Normas Internacionais de Pesquisa envolvendo Animais, e submetidos à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp (Protocolo CEUA: 4038-1). A cópia digitalizada destes documentos encontram-se nos Anexos I, II e III.

Os animais foram separados em 7 grupos experimentais (n= 10 animais/grupo):

- **Grupo Jovem (JV):** camundongos com 3 meses de idade que receberam gavagem diária com água além de ração Nuvital® *ad libitum* por 60 dias;

- **Grupo Controle/Senil (SE):** camundongos com 11 meses de idade, que receberam gavagem diária com água além de ração Nuvital® *ad libitum* (Composição: 22g% de proteína; 53g% de carboidrato; 4.5g% de lipídios; 2.9 kcal/g) por 60 dias;
- **Grupo Dieta Hiperlipídica (SHP):** camundongos com 11 meses de idade que receberam gavagem diária com água além de ração hiperlipídica (Composição: 20g% de proteína; 50g% de carboidrato; 21g% de lipídios; 4.5 kcal/g) por 60 dias;
- **Grupo Senil/Jabuticaba dose 1 (SJI):** camundongos com 11 meses de idade, que receberam gavagem diária de extrato de casca de jabuticaba (2,9 g de extrato/ Kg de peso do animal/ dia), além de água e ração Nuvilab® *ad libitum* durante 60 dias;
- **Grupo Senil/Jabuticaba dose 2 (SJII):** camundongos com 11 meses de idade, que receberam uma dose extra, em relação ao grupo SJI, de gavagem diária extrato de casca de jabuticaba (5,8 g de extrato/Kg de peso do animal/ dia), além de água e ração Nuvilab® *ad libitum* durante 60 dias;
- **Grupo Dieta Hiperlipídica/Jabuticaba dose 1 (SHJI):** camundongos com 11 meses de idade que receberam gavagem diária de extrato de casca de jabuticaba (2,9 g de extrato/ Kg de peso do animal/ dia), além de água e ração hiperlipídica *ad libitum* por 60 dias.
- **Grupo Dieta Hiperlipídica/Jabuticaba dose 2 (SHJII):** camundongos com 11 meses de idade que receberam dose extra de gavagem diária de extrato de casca de jabuticaba (5,8 g de extrato/Kg de peso do animal/ dia), em relação ao grupo SHJI, além de água e ração hiperlipídica *ad libitum* por 60 dias.

Resumo da divisão dos grupos experimentais se encontra no esquema abaixo (Figura 10).

Após 60 dias de tratamento, todos os animais foram pesados em balança semi-analítica Marte AS 5500 (São Paulo, Brasil), anestesiados com Cloridrato de Xilazina 2% (5mg/kg i.m.; König, São Paulo, Brasil) e Cloridrato de Cetamina 10% (60mg/kg i.m.; Fort Dodge, Iowa, EUA) e sacrificados. Os testículos e epidídimos foram coletados e submetidos às análises em microscopia de luz, eletrônica, Western Blotting e bioquímica conforme indicado pelos Anexos III.

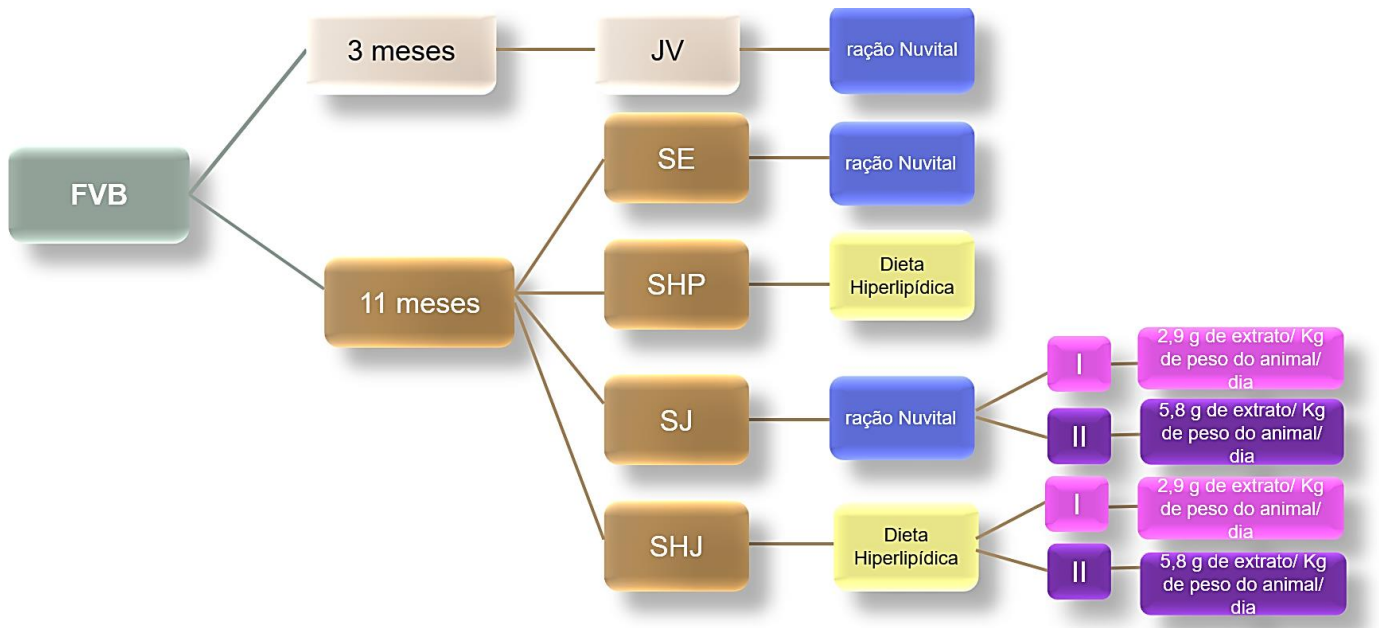


Figura 10: Esquema representativo a respeito da divisão dos grupos experimentais utilizados neste estudo.

3.2. Dieta Hiperlipídica

A ração com alto teor lipídico foi preparada no laboratório da Professora Dra. Carla Beatriz Collares Buzatto de acordo com Carvalho et al. (2012), com alto teor de lipídios (21% em peso; 40,3% em Kcal), a qual foi administrada por 60 dias. A composição desta ração (em pó) pode ser observada na Tabela 1. Já os animais dos grupos JV, SE e SJ receberam ração com conteúdo normal de lipídio (4.5% em peso, 8.0 % em Kcal; ração padrão em pó; Nuvital CR-1, Colombo, PR) pelo mesmo período de tempo.

Tabela 1. Composição da ração hiperlipídica.

Componentes g%	Ração Normal	Ração Hiperlipídica
Proteínas	22.0	20.0
Carboidratos	53.0	50.0
Lipídios	4.5	21.0
Outros*	20.5	8.0
Kcal/g	2.9	4.7

*Fibras, vitaminas e sais minerais.

3.3. Extrato de casca de Jaboticaba

3.3.1. Preparo e Determinação da dose do Extrato da Casca de Jaboticaba (ECJ)

O extrato foi preparado junto ao Laboratório de Nutrição e Metabolismo em parceria com o Prof^o Dr^o Mário Roberto Maróstica Jr. (FEA-UNICAMP). Jaboticabas frescas, da variedade Sabará (*Myrciaria jaboticaba*), foram adquiridas na Central de Abastecimento de Campinas (CEASA) no estado de São Paulo, Brasil. As frutas foram lavadas e descascadas manualmente e em seguida as cascas foram congeladas a -18 °C. O método utilizado para preparar o ECJ foi patenteado em parceria com o prof. Dr. Mário Maróstica (Maróstica et al. 2017; nº. BR 1020170054624) e consistiu na adição da casca de jaboticaba liofilizada em solução de etanol com posterior remoção de solvente (Maróstica et al. 2017). Os compostos presentes no ECJ e sua atividade antioxidante *in vitro* foram avaliados em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (Lamas et al. 2018). A dose administrada para os animais foi determinada em estudos prévios de nosso grupo de pesquisa, também em fase de submissão para periódicos científicos, sendo seu conteúdo fenólico dez vezes menor que o ingerido ao se adicionar 4% de casca de jaboticaba liofilizada à ração dos roedores (Lenquiste et al. 2012; Dragano et al. 2013).

3.4. Determinação do Peso Absoluto e Relativo de Órgãos

Foram determinados inicialmente os pesos absolutos dos testículos e epidídimos, por meio de uma balança analítica.

Para o cálculo do peso relativo foram considerados os pesos absolutos e o peso corporal dos animais (peso do órgão/peso corporal x 100). No caso dos testículos, esta medida recebe o nome de Índice Gonadossomático (IGS) e dos epidídimos recebe o nome de Índice Epidídimossomático (IES).

3.5. Contagem de espermátides, produção espermática diária (PED) e tempo de trânsito epididimal

Espermátides resistentes à homogeneização (estágio 20 da espermiogênese) no testículo, e espermatozoides das porções cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram contados em câmaras de Neubauer (4 campos por animal), após homogeneização dos órgãos (homogeneizador Ultra-Turrax – Janke & Kunkel IkaWerk) em mistura de 0,9% de NaCl, 0,05% de triton x 100, segundo método descrito previamente (Robb et al. 1978).

Para determinação da produção diária de espermatozoides (PED), o número de espermatozoides por testículo foi dividido por 4,25, que é o número de dias em que as espermátides maduras estão presentes no epitélio seminífero (Robb et al. 1978).

Para o cálculo do tempo de trânsito espermático na cabeça/corpo ou cauda do epidídimo, foi dividido o número de espermatozoides, em cada porção, pela PED. Estas metodologias foram realizadas de acordo com técnicas descritas por Kempinas et al. (1998).

3.6. Microscopia de Luz

Após sacrifício amostras testiculares e epididimais foram coletadas e fixadas em solução de Karnovsky e Paraformol 4%, por 24 horas. Após a fixação, os órgãos fixados foram desidratados em uma série alcoólica crescente. Posteriormente, as amostras fixadas em Paraformol foram diafanizadas em uma solução de álcool/xilol, seguido por soluções de Xilol durante duas horas e por fim, inclusos em parafina e polímero de plástico (*Paraplast Plus, ST. Louis, MO, EUA*). Este material foi seccionado em micrótoomo (*Leica RM2255*) com espessura de cinco micrômetros e posteriormente corado em Hematoxilina e Eosina (HE) (Junqueira et al. 1979) e fotografado no microscópio de Luz Olympus BX41 acoplado à câmera digital Olympus Q Color 3. Por sua vez, as amostras fixadas em Karnovsky foram seccionadas, após 48 horas do sacrifício, sendo uma pequena porção destinada à microscopia eletrônica de transmissão e o restante (a porção mais significativa) destinado à inclusão em Histo-resina Leica. Estes foram submetidos à desidratação alcoólica crescente, seguido por infiltração *overnight* em resina, e posteriormente foram incluídos em Histo-resina. Assim como o material destinado à parafina, estes últimos seguirão o mesmo protocolo de secção, sendo, porém, seccionados a 3 micrômetros.

3.7. Morfometria e Estereologia do Testículo

3.7.1. Proporções Volumétricas (%) e Volumes dos Componentes do Parênquima Testicular

Estes parâmetros foram analisados a partir da contagem de 4320 pontos por animal. Para isso, foi utilizado um retículo com 432 intercessões, que foi projetado sobre 10 imagens aleatórias (com um espaçamento de 10 micrometros entre cada corte), e visualizados em microscópio de luz, com aumento de 400x. Dessa forma, foram quantificados os túbulos seminíferos, células de Leydig, vasos sanguíneos, espaço linfático e tecido conjuntivo.

O volume total do testículo foi calculado pela diferença entre peso bruto testicular e o peso da túnica albugínea. Além disso, considerando que a densidade deste órgão é próxima a 1 (1,03 a 1,04), o peso testicular poderá ser considerado igual ao seu volume (França e Russel 1998).

3.7.2. Diâmetro Tubular, Altura do Epitélio Seminífero e Comprimento Total dos Túbulos Seminíferos (CT)

Para obtenção do diâmetro médio tubular foram mensuradas ao acaso 30 secções transversais dos túbulos seminíferos que apresentem um contorno o mais próximo possível ao corte circular.

Utilizando as mesmas secções que o item 3.7.1., foi mensurada a altura do epitélio seminífero, considerando a distância entre membrana basal e a luz tubular. O valor deste parâmetro por túbulo foi obtido pela média de duas aferições em regiões diametralmente opostas.

Já o comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) é expresso em metros, e estimado considerando-se o diâmetro tubular médio de cada animal e conhecimento prévio do volume que estes túbulos ocupam no órgão. Assim, foi utilizada a seguinte fórmula: $CT = VTS / \pi R^2$ no qual, VTS = volume total de túbulos seminíferos e πR^2 = área da secção transversal dos túbulos seminíferos (Predes et al. 2010).

3.8. Morfometria e Estereologia do Epidídimo

3.8.1. Proporções volumétricas (%) dos compartimentos na cabeça e cauda do epidídimo

Estas proporções foram estimadas a partir da contagem de 1000 pontos (por animal) em 10 campos aleatórios, com um espaçamento de 10 micrometros entre cada corte. As imagens foram capturadas em microscópio de Luz Olympus BX41 acoplado à câmara digital Olympus Q Color 3 utilizando o software Image-Pro Plus 6.0. Para tal, foi utilizada uma grade reticulada e imagens capturadas em aumento de 200x. Os elementos quantificados foram os túbulos e espaço intertubular.

3.8.2. Diâmetro tubular e luminal e altura do epitélio na cabeça e cauda do epidídimo

O diâmetro tubular e luminal, por animal, foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 15 secções transversais de túbulos que apresentaram contorno o mais circular possível em cada região do epidídimo. Diâmetro tubular e luminal médio é representado pela média de duas medidas tomadas de forma diametralmente opostas. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio excluindo-se os estereocílios. A altura média do epitélio de cada túbulo corresponde à média de quatro medidas tomadas de forma diametralmente opostas. O diâmetro luminal foi obtido através da subtração do diâmetro tubular pela altura do epitélio.

3.9. Quantificação Histopatológica do Epidídimo

Os elementos quantificados foram classificados, segundo Creasy et al. (2012) e Kempinas e Klinefelter (2014), em sete categorias histopatológicas: (1) Cariomegalia; (2) hipertrofia de células claras; (3) mudança cribriforme; (4) microvacuolização epitelial; (5) infiltrado inflamatório; (6) restos celulares luminiais; (7) necrose de célula única. A quantificação foi estimada a partir da contagem de 2500 pontos (por animal) em 5 campos aleatórios. As imagens foram capturadas sob um microscópio Olympus BX41 Light acoplado à câmara digital Olympus Q Color 3 usando o software Image-Pro Plus 6.0. Para isso, foi utilizada uma grade reticulada e capturadas imagens em aumento de 200 x.

3.10. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Testículos e epidídimos fixados, inicialmente, em Karnovsky, foram seccionados e posteriormente parte de seus fragmentos permaneceram cerca de 24 horas em uma solução de tampão fosfato 0.2M, glutaraldeído 5% e sacarose 2%. Em seguida, os mesmos foram lavados no respectivo tampão e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por três horas à temperatura ambiente. Para finalizar o processo, os respectivos órgãos foram desidratados em séries crescentes de acetona (50 a 100%), infiltrados em soluções de resina/acetona e incluídos em resina Epoxy a 60°C por 72 horas para polimerização. Os cortes ultrafinos foram feitos em ultramicrótomo Ultracut UCT LEICA, sendo os mesmos contrastados em soluções de acetato de uranila aquoso 2% e citrato de chumbo 0,1%. Posteriormente tais cortes posicionados em telas de cobre foram analisados e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão LEO 906 no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo (UNICAMP).

3.11. Western Blotting

Amostras de testículo e epidídimo foram coletadas de 6 animais de cada grupo experimental, e posteriormente congeladas a -80°C. Em seguida, foram homogeneizadas através do homogeneizador Polytron (Kinematica Inc., Lucerne, Suíça), com a utilização de tampão de extração RIPA (Millipore, Temecula, CA, USA), e coquetel inibidor de protease (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Uma alíquota de cada amostra foi usada para determinação da concentração de proteínas, usando o reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), sendo estabelecido 30 µg de proteína para cada tecido.

As amostras foram misturadas (em uma proporção 1:1) com tampão de amostra 3X (100mM Tris-HCl pH 6.8, 10%β-mercaptoetanol, 4% SDS e 20% glicerol), incubadas em banho seco a 95°C, durante 5 minutos. O conteúdo extraído foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida, e submetido à eletroforese. Após esse processo, o material foi transferido eletricamente (via Sistema Hoefer) para membranas de nitrocelulose (Amersham) a 120 V por 1 hora e meia. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com albumina bovina sérica (BSA) 3% (para AR, COX-2, ERα e NF-κB) e 1% (para Aromatase, IL-17, PCNA e TNF-α), ambos diluídos em TBS-T por uma hora e incubadas *overnight* com os anticorpos primários, de acordo com o descrito na Tabela 1. Após lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por duas horas com os anticorpos secundários anti-rabbit e anti-mouse HRP conjugados, diluídos em BSA 1% (Tabela 1). Após uma série de seis lavagens com TBS-T, as bandas foram detectadas através da reação com solução quimioluminescente (Super Signal West Pico Chemiluminescent/ThermoScientific/34080) durante 5 minutos, e capturadas pelo software de aquisição de imagem GeneSys (Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK) no equipamento Gene Gnome.

O anticorpo para β -actina mouse monoclonal (sc-81178, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) foi usado como controle endógeno. A intensidade das marcações obtidas para as diferentes moléculas foi quantificada por densitometria através do programa de análise de imagens Image J (Image Analysis and Processing in Java), sendo expressa como a porcentagem média em relação à intensidade da marcação de β -actina.

Tabela 2. Anticorpos utilizados nas técnicas de Western Blotting.

Anticorpos	Órgãos	Especificações	Diluições
Anti-mouse (secundário)	Testículo/Epidídimo	W4021, Promega Corporation	1:5000
Anti-rabbit (secundário)	Testículo/Epidídimo	W4018, Promega Corporation	1:5000-6000
AR	Testículo/Epidídimo	sc-816 - Santa Cruz Biotechnology	1:350
Aromatase	Testículo/Epidídimo	ab18995, Abcam	1:350
COX-2	Testículo/Epidídimo	sc-376861 - Santa Cruz Biotechnology	1:350
ER α	Testículo/Epidídimo	ab 32063, Abcam	1:500-350
IL-17	Testículo/Epidídimo	ab79056, Abcam	1:500
NF- κ B	Testículo/Epidídimo	ab16502, Abcam	1:500
PCNA	Testículo/Epidídimo	ab 29, Abcam	1:500
TNF- α	Testículo/Epidídimo	ab8348, Abcam	1:350

3.12. Avaliação tecidual de antioxidantes e peroxidação lipídica

Para esta avaliação, os tecidos foram homogeneizados através do homogeneizador Polytron (Kinematica Inc., Lucerne, Suíça), com a utilização de tampão PBS. Em seguida foram centrifugados durante 20 minutos a 14000 rpm, e 4°C para a obtenção do sobrenadante. Este foi usado, primeiramente, para determinar a concentração de proteínas do extrato, usando o reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), e posteriormente para os testes bioquímicos.

Todas as leituras de absorbâncias e fluorescência para as análises bioquímicas foram determinadas no leitor de microplaca Synergy HT, Biotek (Winooski, VT, USA) com o software Gen5 2.0, para análise de dados.

3.12.1. TBARS (Ensaio das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)

Os níveis de TBARS no testículo e epidídimo foram determinados pelo método descrito por Ohkawa et al. (1979), com adaptações. Os tecidos congelados (10mg/ml) foram sonicados em tampão PBS, no gelo. Em seguida, foram acrescentados, às amostras, SDS (dodecil sulfato de sódio), TBA (ácido 2-tiobasbitúrico) em pó, 20% de ácido acético e 5% de hidróxido de sódio. Após um aquecimento de 95°C durante 60 minutos, em banho maria, as amostras foram arrefecidas em banho de gelo por 10 minutos, e então, centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O MDA-TBA resultante foi quantificado usando microplacas de 96 poços, em um comprimento de onda de 532 nm. A curva padrão foi preparada usando MDA padrão (#10009202, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA).

3.12.2. Conteúdo de Grupo Tiol (GSH)

Os níveis de GSH dos tecidos foram determinados nos homogenados de testículo e epidídimo usando DTNB (reagentes de Ellman) (Ellman 1959), com modificações. Solução de GSH (2.5-500 nMol/ml de GSH) foi usada como padrão e a absorbância foi lida em 412 nm. O conteúdo de grupo tiol reduzido foi expresso em nMol de GSH mg protein⁻¹.

3.12.3. Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi quantificada em homogenados de testículo e epidídimo, em tampão PBS. A oxidação de 10 nMol de glutathione reduzida pela glutathione peroxidase acoplada à oxidação de 4 mMol de NADPH pela atividade enzimática de GR na presença de 0.25 mMol de H₂O₂, foi medida nesse ensaio. A taxa de oxidação de NADPH foi monitorada pelo decréscimo na absorbância em 365 nm, segundo Flohe e Gunzler (1984). Os resultados foram expressos em nMol de NADPH consumidos min⁻¹ mg proteína⁻¹.

3.12.4. Atividade da Glutathione Reduzida (GR)

A atividade de GR foi medida nos homogenados teciduais, seguindo a redução na absorbância em 340 nm, induzida por 1 mMol de glutathione oxidada na presença de 0.1 mMol de NADPH em tampão PBS (Carlberg e Mannervik 1985). Os resultados foram expressos em nMol de NADPH consumidos min⁻¹ mg proteína⁻¹.

3.12.5. Atividade da SuperOxido Dismutase (SOD)

Nesse processo, amostras (100 µl de homogenado tecidual) foram pipetadas em microplacas de 96 poços, juntamente com 150 µL de solução de trabalho (0.1 mMol de hipoxantina, 0.07 U de xantina oxidase, e 0.6 mMol de NTB em tampão PBS, em proporção de 1:1:1). A reação cinética foi monitorada

a 560 nm (Winterbourn et al. 1975). A área abaixo da curva (AUC) foi calculada e a atividade da SOD foi expressa como U mg protein⁻¹.

3.12.6. Atividade da Catalase

O ensaio da catalase foi baseado na reação da enzima com metanol em concentrações ótimas de H₂O₂. O formaldeído produzido é medido colorimetricamente com o cromóforo, Purpald (Wheeler et al. 1990). Foram pipetados 20 µL de amostra homogeneizada com 100 µL de tampão PBS, 30 µL de metanol e 20 µL de H₂O₂. A reação ocorreu durante 20 minutos, no escuro, com o auxílio de um agitador. 30 µL de hidróxido de potássio foram usados para parar a reação. Em seguida, 30 µL de Purpald foram adicionados na placa e o conteúdo foi lido em um comprimento de onda de 540 nm. A curva padrão de formaldeído foi feita e usada para calcular a atividade da Catalase. Os resultados foram expressos como nMol min g proteína⁻¹.

3.13. Ensaio de TUNEL do epidídimo

Amostras de testículo e epidídimo de 5 animais por grupo foram coletadas e fixadas em paraformaldeído a 4%. A fragmentação do DNA de células apoptóticas foi detectada pelo sistema de TUNEL (Dead End™ Fluorometric TUNEL System, Promega, Madison WI, USA), de acordo com as instruções do fabricante. As células apoptóticas foram identificadas e capturadas pelo fotomicroscópio invertido Olympus IX71 inverted-II (Olympus, California, USA) equipado com sistema de fluorescência. Para a análise, 10 campos aleatórios para cada animal foram capturados no aumento de 40x. Para avaliar a apoptose das células epididimais, 100 diferentes túbulos foram selecionados aleatoriamente de cada grupo (10 túbulos / animal) e observados com uma ampliação de 400x. Para determinar o índice de células apoptóticas (AI), a porcentagem de células epiteliais marcadas foi calculada em 10 túbulos para cada camundongo.

3.14. Análise Estatística

As médias dos parâmetros obtidos foram comparadas entre os grupos JV e SE; e SE com SHP, pelo teste de t Students (limite de significância de 0.05). Já as diferenças entre os grupos tratados SJI, SJII, SHJI, SHJII, e seus respectivos controles, SE e SHP, foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. A análise de dados foi realizada com o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA). Para cada análise foi realizado teste de normalização, e todos os quais foram paramétricos. Por fim, todos os resultados foram divididos em 2 grandes artigos submetidos à declaração referente a direitos autorais (Encontra-se em Anexos IV).

Artigo Científico I. Submetido para a revista Andrology**Brazilian berry extract prevents damage on testes and epididymis of high-fat-fed aged mice**

Cuquetto-Leite, L. ^{a*}, Lamas, C.A. ^a, Collares-Buzato, C.B. ^b, Maróstica Jr, M. R. ^c, Cazarin, C. B. B. ^c, Cagnon, V. H. A. ^a, Dolder, H. ^a.

^a Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

^b Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

^c Department of Food and Nutrition, School of Food Engineering, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

E-mail Address: livia.cuquetto@gmail.com (Cuquetto-Leite L.), celina.lamas@gmail.com (Lamas C.A.), collares@unicamp.br (Collares-Buzato C.B.), mmarostica@gmail.com (Maróstica Jr. M. R.), cbetim@unicamp.br (Cazarin C. B. B.), quitete@unicamp.br (Cagnon V.H.A.), dolder1207@gmail.com (Dolder H.).

Short Title: Brazilian berry extract favors male reproductive system homeostasis.

Key words: Jaboticaba, Ageing, Obesity, Male Reproductive System, Polyphenols.

*Corresponding Author: Lívia Cuquetto-Leite, Department of Structural and Functional Biology, Biology Institute, 13083-865, Campinas State University (UNICAMP), São Paulo, Brazil. E-mail: livia.cuquetto@gmail.com.

Abstract

Background: Senescence and overweight compose two factors that favor alterations in several parameters in male reproductive system. However, jaboticaba peel is rich in polyphenols with antioxidant and anti-inflammatory activity. **Objective:** To verify the jaboticaba peel extract (PJE) effect, in epididymis and testis of aged and high-fat-fed aged mice, focusing on oxidative and inflammatory alterations. **Material and Methods:** 42 male FVB mice were distributed as follows: YG (juvenile; 3 months), AG (senile; 11 months), HfAG (senile+high-fat diet), JAGI (senile+2.9g PJE/Kg), HfJAGI (senile+high-fat diet+2.9g PJE/Kg), JAGII (senile+5.8g PJE/Kg) and HfJAGII (senile+high-fat diet+5.8g PJE/Kg). **Results:** The PJE treatment improved lipid peroxidation, Glutathione Reductase (GR) and Glutathione Peroxidase (GPx), and catalase activities in the epididymis of all treated groups. Regarding the testis, PJE lowered lipid peroxidation, increased GSH (Reduced L-Glutathione) levels and SOD (Superoxide Dismutase) activity in all treated groups, besides improving GR activity in JAGII and HfJAGI, and GPx activity in JAGI. All inflammatory markers (NFkB, TNF α , IL-17 and COX-2) were reduced after PJE treatment in the epididymis. Nevertheless, in the testis, NF- κ B, IL-17, and COX-2 levels decreased in all treated groups whereas TNF α levels declined only in JAGII and HfJAGII groups. Moreover, PJE increased daily sperm production in all treated groups, as well as testicular sperm count. The spermatid reserve in the caput and cauda epididymis decreased with ageing. The PJE treatment increased this parameter for JAGI, JAGII, and HfJAGII in caput, and for JAGI, HfJAGI and HfJAGII in the cauda. **Discussion and Conclusion:** Ageing and overweight led to deficiency of antioxidant and anti-inflammatory pathways. These processes could be reduced with antioxidant compound intake. Thus, PJE intake favored the recovery of testicular and epididymal homeostasis of ageing and overweight mice. Therefore, PJE exerted an anti-inflammatory and antioxidant effect, making this therapy a viable one to prevent damage associated to advanced age and overweight.

Introduction

Ageing constitutes a multi-factorial, progressive and irreversible process (Frungieri *et al.*, 2018). During late life, an upregulation of the inflammatory response has been described in the male reproductive tract, characterized by degeneration and apoptosis of germ cells, increase in the number of macrophages, dendritic cells and T cells, as well as the presence of antisperm antibodies and chemokines (Frungieri *et al.*, 2018). These factors, in turn, alter the immunosuppressive microenvironment of the testis, through the secretion of pro-inflammatory cytokines, such as IL-6, IL-17, and TNF α (Maggio *et al.*, 2005). Moreover, changes in aged Leydig cells lead to reduced capacity of androgen production, which in turn, result in the reduction of testis size, number of Sertoli cells, as well as in structural changes of the seminiferous tubules (Frungieri *et al.*, 2018). According to Kaushik and Bhartiya (2018), altered Sertoli cell function, in elderly men, affects germ cell differentiation and leads to infertility and testicular germ cell tumors, type 3 (T3GCT).

Recently, several molecular ageing mechanisms have been proposed, including the relationship between excessive generation of reactive oxygen species (ROS) (Amaral *et al.*, 2013; Santiago *et al.*, 2018). In the testicle, macrophages are the major source of ROS, which is mostly produced by the mitochondrial electron transport chain (Frungieri *et al.*, 2018). In Leydig cells, both ROS production and lipid peroxidation increase with age (Cao *et al.*, 2004) and the age-dependent reduction in Leydig cell function has been attributed to the free radical damage.

De la Fuente & Miquel (2009) have proposed the oxidation-inflammation theory as the main cause of ageing. In the human testis, proinflammatory prostaglandins have been reported to induce the generation of ROS (Schell *et al.*, 2010). In addition, Matzkin *et al.*, (2016) demonstrated that reduced longevity is directly associated with an increment in COX-2 expression, prostaglandin production, the overall macrophage population, lipid peroxidation, and the occurrence of apoptotic events (Matzkin *et al.*, 2016). However, with regard to the epididymis, the knowledge about these processes is very incipient. Mueller *et al.*, (1998) observed a low expression of Glutathione S-transferases (GSTs) in epididymis principal cells, suggesting that capacity of the epididymis to combat oxidative stress decreases with ageing.

Ageing leads to changes also in testicular cells that parallel the alterations seen in other parts of the body (Lawson & Fletcher, 2014). Advancing age is associated with a decline in semen quality and identifiable features include a decrease in the ejaculate volume, concentration of spermatozoa, and total sperm production as well as an increase in the percentage of nonviable and abnormal spermatozoa (Murray & Meacham, 1993). Hossain *et al.*, (2012) reported an inversely proportional relationship between senility and sperm count and production, similarly to

Mukhopadhyay *et al.*, (2012), which reported a significant decrease in the volume of semen produced and in sperm motility with increasing age. Recently, a meta-analysis was conducted to evaluate the effects of ageing on semen parameters including semen volume, sperm concentration, total sperm count, morphology, total motility, progressive motility, and DNA fragmentation. The results have demonstrated that paternal ageing leads to a decrease in sperm parameters, except for sperm concentration, associated with increased sperm DNA fragmentation and progressive motility. These two latter alterations seem to be important diagnostic parameters to be considered during fertility treatment of older men (Johnson *et al.*, 2015).

Oxidative stress has been pointed out as one of the major causes for the age-associated sperm dysfunction. Indeed, excessive ROS production could be detrimental to sperm viability and survival (Makker *et al.*, 2009). In addition, during ageing, the sperm are devoid of antioxidant defenses, making these cells susceptible to ROS-induced damages. ROS promotes the oxidation of biomolecules, such as polyunsaturated fatty acids, which are the major components of the sperm plasma membrane. Lipid peroxidation promotes changes in membrane fluidity, which causes loss of motility and the consequent impairment of fertilization (Lavranos *et al.*, 2012). Nevertheless, it is thought that low concentrations of ROS are essential for several sperm-related events. In fact, ROS regulate hyperactivation, capacitation, acrosome reaction and consequently fertilization capacity (Griveau & Lannou, 1997). Agarwal *et al.*, (2008) described increased sperm hyperactivation, acrosome reaction and capacitation after incubating them in a medium with low concentrations of hydrogen peroxide. Hence, oxidative stress has become a subject of great concern with several clinical and experimental studies indicating that there are significant changes that occur in spermatozoa as males enter advanced age and such changes have adverse reproductive outcomes (Kidd *et al.*, 2001; Wyrobek *et al.*, 2006).

According to the World Health Organization (WHO) the older population has increased exponentially worldwide in the past few years, (World Health Organization, 2018). This phenomenon is associated with an increase of obesity in the world population, as result of availability of fast foods, that leads to a series of chronic metabolic disorders (World Health Organization, 2018).

Obesity has been directly related to chronic inflammation and increased production of ROS (Sullivan, 2015; Liu & Ding, 2017). Thereby, proinflammatory cytokines such as $\text{TNF}\alpha$, IL-6, -8, -17 and their transcription factor NF- κ B, modify the physiology of the epididymal and testicular epithelium by triggering an exacerbated production of ROS, especially by attracting phagocytic leukocytes to the region. In addition, Vigueras-Villasenõr *et al.*, (2011) emphasized the direct relationship between feeding with a high-fat diet, accumulation of a large amount of scrotal fat and

overstimulation of oxidative stress, in agreement with other recent studies (Wang *et al.*, 2015; Asadi *et al.*, 2017; Liu & Ding, 2017). Therefore, excessive production of reactive oxygen species results in damage to the tissue structure of the testis and epididymis, especially as a result of high levels of H₂O₂ associated with relatively high apoptotic rate (Liu & Ding, 2017).

It is well known that there is an association between obesity, reduction in sperm concentration and quality (Fernandez *et al.*, 2011; Chambers & Anderson, 2015; Ferramosca *et al.*, 2016). However, the mechanisms involved in this relationship are poorly characterized (Vigueras-Villaseñor *et al.*, 2011). According to Vigueras-Villaseñor *et al.*, (2011), a high level of serum estradiol, results in a reduction in inhibin B production by Sertoli cells. This alteration could have an impact on the process of sperm production. In addition, these authors correlated the elevation of intratesticular oxidative stress levels in overweight Wistar rats with reduction of sperm viability and concentration in the testes and epididymis. In contrast other studies showed that overweight and increased body mass index did not significantly influence such parameters, - affecting only sperm motility (Tortoriello *et al.*, 2004; Ghanayem *et al.*, 2010). So, there are still controversies regarding the actual impact of obesity on male reproductive biology.

Ingestion of natural compounds has been associated with anti-inflammatory, antioxidant and anticancer actions in numerous organs (De Sá *et al.*, 2014; Lenquiste *et al.*, 2015). Fruits can act as a relevant source of bioactive compounds, mostly concentrated in the peel (Lenquiste *et al.*, 2012). These substances are mainly responsible for their beneficial effects to human health. Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) is a berry typical of the Brazilian *cerrado* (a savanna-like biome), being widely consumed throughout the country (Donadio, 2010). A large content of phenolic compounds is found in the peel of the fruit, including anthocyanins, quercetins, terpenes, gallic acid, ellagic acid and depsides (Lenquiste *et al.*, 2012). Lenquiste *et al.*, (2012) reported improvement in the functioning of the endogenous antioxidant system in overweight mice after ingestion of jaboticaba peel. Accordingly, Dragano *et al.*, (2013) have demonstrated that the introduction of jaboticaba peel into the diet of overweight rats contributed to the reduction of the inflammatory process in different organs.

Recently, a study by our research group (Lamas *et al.*, 2018) reported for the Patented Jaboticaba peel Extract (PJE) displayed a higher antioxidant property associated to a higher phenolic content in comparison with other jaboticaba peel extracts (Lenquiste *et al.*, 2012; Dragano *et al.*, 2013; Lenquiste *et al.*, 2015). In addition, the PJE administration resulted in a reduction in dyslipidemia, accompanied by an increase in HDL cholesterol levels, besides preventing liver steatosis and prediabetes in senile mice fed with the High-fat diet (Lamas *et al.*, 2018).

Therefore, taking into consideration the potential therapeutic effect of the Patented

Jaboticaba peel Extract, as well as the deleterious effects of obesity and ageing to the male reproductive system, the objective of this study was to evaluate the dose-dependent effect of PJE on the endogenous antioxidant activity and lipid peroxidation, as well as the inflammatory state in the testes and epididymis of senile and overweight mice.

2. Material and Methods

2.1. Patented Jaboticaba peel Extract (PJE)

The method used to prepare the PJE was patented and can be found in detail in Lamas *et al.*, (2018). The PJE bioactive compounds determination and their *in vitro* antioxidant activity were previously described (2018).

2.2. Animals and experimental design

The study was carried out using a total of 42 male FVB mice, obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation on Laboratory Animal Science of the University of Campinas (UNICAMP), Brazil. All the experimental procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use of UNICAMP/Protocol: #4038-1.

The animals were randomly distributed in the following experimental groups (n=6 animals/group): Young group (YG), 3-month-old mice, receiving the PJE vehicle (water) daily by gavage and a standard diet (Nuvital CR1, Colombo, Paraná, Brazil) (composition: 22 g% protein; 53 g% carbohydrate; 4.5 g% lipid; 20.5 g% fibers and mineral salts and 2.9 kcal/g); Aged group (AG), 11-month-old mice, receiving the PJE vehicle daily by gavage and the standard diet; High-fat diet group (HfAG), 11-month-old mice, receiving the PJE vehicle daily by gavage and a high-fat diet (20 g% protein; 50 g% carbohydrate; 21 g% lipid; 9 g% fibers and mineral salts and 4.5 kcal/g); Aged/PJE I group (JAG I), 11-month-old mice, receiving PJE (2.9 g PJE/Kg body weight) daily by gavage and the standard diet; Aged/PJE II group (JAG II), 11-month-old mice, receiving PJE (5.8 g PJE/Kg body weight) daily by gavage and the standard diet; High-fat diet/PJE I group (HfJAG I), 11-month-old mice, receiving PJE (2.9 g PJE/Kg body weight) daily by gavage and high-fat diet; High-fat diet/PJE II group (HfJAG II), 11-month-old mice, receiving PJE (5.8 g PJE/Kg body weight) daily by gavage and high-fat diet. All groups had free access to drinking water and the respective diets, either the standard or the high-fat diet, according to the specificity of each group.

The treatments lasted 60 days. The animals were housed one per cage, with a 12h light-dark cycle; water and food were provided *ad libitum*. The diets and PJE doses were determined based on a previous research by our group (Lamas *et al.*, 2018). After the treatment period, the mice were

weighed on a semi analytical scale (Marte AS 5500 – São Paulo, Brazil), anesthetized with xylazine hydrochloride (5 mg/kg i.m.; König, São Paulo, Brazil) and ketamine hydrochloride (60 mg/kg i.m.; Fort Dodge, Iowa, EUA). The animals were submitted to euthanasia by increasing the anesthetic level. The testicles and epididymis were collected and frozen at -80°C for Western-Blotting analyses, antioxidant activity and lipid peroxidation evaluation.

2.3. Protein extraction and Western Blotting for inflammatory factors

Testicular and epididymis samples (n=6 animals/group), previously frozen at -80°C, were homogenized by a Polytron homogenizer (Kinematica Inc., Lucerne, Switzerland) in a RIPA extraction buffer (Millipore, Temecula, CA, USA), with a protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). An aliquot of each sample was obtained to determine protein concentration using Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), and 30 µg of protein was established for testicle and epididymis. These samples were mixed (in a 1:1 ratio) with 3X sample buffer (100mM Tris-HCl pH 6.8, 10% β-mercaptoethanol, 4% SDS and 20% glycerol), incubated in a 95°C dry bath for 5 minutes. The extracted content was applied in SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham). Subsequently, the membranes were blocked with bovine serum albumin (BSA: 1-3%), diluted in T-TBS buffer for 1h and incubated overnight with the primary antibodies diluted in 1% BSA solution: β-actin (mouse monoclonal; sc-81178, Santa Cruz Biotechnology); COX-2 (mouse monoclonal; sc-376861, dilution 1:500 for testicle and 1:350 for epididymis, Santa Cruz Biotechnology), IL-17 (rabbit polyclonal; ab79056, dilution 1:500 for both organs, Abcam), NF-κB (rabbit polyclonal; ab16502, dilution 1:500 for both organs, Abcam), and TNFα (mouse monoclonal; ab8348, dilution 1: 350 for both organs, Abcam). The membranes were then washed in T-TBST buffer and incubated for 2h with the secondary antibodies diluted in 1% BSA solution (dilution range of 1:5000–1:6000): anti-mouse (W4021 – Promega) or anti-rabbit (W4018 – Promega). The membranes were incubated with chemiluminescence solution (Pierce Biotechnology Western Blotting) for 5 minutes and the blots were captured using the G-Box Chemi associated with the GeneSnap (Syngene, Cambridge, UK) image acquisition software. β-actin was used as an endogenous control. The labeling intensity was identified by densitometry using the Image J software (USA).

2.4. Enzymatic and non-enzymatic endogenous antioxidant system and lipid peroxidation

Testicle and epididymis frozen samples (n=6 animals/group) were added to a phosphate buffer and homogenized by a Polytron homogenizer (Kinematica Inc., Lucerne, Switzerland). They

were centrifuged at 14.000 rpm for 20 minutes at 4 °C to obtain the supernatant, which was used to determine the protein concentration of the extract using Bradford Reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), and subsequently for the biochemical tests.

All absorbance and fluorescence readings for the biochemical analyses were determined using the Synergy HT microplate reader, Biotek (Winooski, VT, USA) with Gen5 2.0 software, for data analysis.

2.4.1. Lipid peroxidation by Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS) assay

TBARS levels in the testis and epididymis were determined by the method described by Ohkawa *et al.*, (1979), with adaptations. After homogenization, 8.1% SDS (sodium dodecyl sulfate), 0,530g TBA (2-thiobarbituric acid), 20% acetic acid and 5% sodium hydroxide were added to the samples. After heating at 95°C for 60 minutes in a water bath, the samples were cooled in an ice bath for 10 minutes, then centrifuged at 10.000 rpm for 10 minutes at 4°C. The resulting MDA-TBA was quantified using 96-well microplates at a wavelength of 532 nm. The standard curve was prepared using standard MDA (1,1,3,3-tetramethoxypropane) (# 10009202, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA).

2.4.2. Tiol (GSH) Content of the Groups

Tissue GSH levels were determined in testicular and epididymal homogenates using the DTNB reagent (Ellman reagents) (Ellman, 1959), with modifications. GSH solution (2.5-500 nMol / mL GSH) was used as the standard and the absorbance was read at 412 nm. The reduced thiol group content was expressed in nMol of GSH mg protein⁻¹.

2.4.3. Activity of Glutathione Peroxidase (GPx)

GPx activity was quantified in testicular and epididymal homogenates in phosphate buffer. The oxidation of 10 nMol of glutathione was measured by reducing with glutathione peroxidase coupled to the oxidation of 4 mMol of NADPH by the enzymatic activity of GR in the presence of 0.25 mMol H₂O₂. The oxidation rate of NADPH was monitored by the decrease in absorbance at 365 nm, according to Flohe & Gunzler (1984). The results were expressed as nMol of NADPH consumed min⁻¹ mg protein⁻¹.

2.4.4. Activity of Reduced Glutathione (GR)

GR activity was measured in the organ homogenates, following the diminished absorbance at 340 nm induced by 1 mMol oxidized glutathione in the presence of 0.1 mMol NADPH in phosphate buffer (Carlberg & Mannervik, 1985). The results were expressed in nMol of NADPH consumed per min^{-1} mg protein $^{-1}$.

2.4.5. Superoxide Dismutase Activity (SOD)

For this procedure, samples (100 μL tissue homogenate) were pipetted into 96-well microplates along with 150 μL working solution (0.1 mMol hypoxanthine, 0.07 μL xanthine oxidase, and 0.6 mMol NTB in PBS buffer, in a ratio of 1:1:1). The kinetic reaction was monitored at 560 nm (Winterbourn, Hawkins) (Winterbourn *et al.*, 1975). The area under the curve (AUC) was calculated and the SOD activity was expressed as U mg protein $^{-1}$.

2.4.6. Catalase Activity

The catalase assay was based on the enzyme reaction with methanol at optimum H_2O_2 concentrations. The formaldehyde produced was measured colorimetrically with the chromophore, Purpald (Wheeler *et al.*, 1990). An aliquot of 50 μL of homogenized samples was pipetted with 100 μL of PBS buffer, 30 μL of methanol and 20 μL of H_2O_2 . The reaction occurred for 20 minutes in the dark under agitation with the aid of a magnetic stirrer. A volume of 30 μL of potassium hydroxide solution was used to stop the reaction. Then, 30 μL of Purpald were added to the plate and the contents read at a wave length of 540 nm. The formaldehyde standard curve was made and used to calculate catalase activity. The results were expressed as nMol min g protein $^{-1}$.

2.5. Determination of Sperm Count, Daily Sperm Production and Sperm Transit Time

Spermatids resistant to homogenization (stage 19 of spermiogenesis) in the testis, and spermatozoa of caput/body and cauda portions of epididymis were counted in Neubauer chambers (4 fields per animal) after organ homogenization (Ultra-Turrax homogenizer - Janke & Kunkel IkaWerk) in a mixture of 0.9% NaCl, 0.05% Triton X 100, according to the previously described method (Robb *et al.*, 1978).

For determination of the daily sperm production (DSP), the number of spermatozoa per testis was divided by 4.84, which is the number of days in which the mature spermatids are present in the seminiferous epithelium of mice.

For calculation of sperm transit time (STT) in the caput/body and cauda of the epididymis, the number of spermatozoa was divided in each portion by the DSP (Modified from Kempinas *et al.*,

1998).

2.6. Spermatic Ultrastructure in Transmission Electron Microscope

Epididymis fragments fixed with Karnovsky were sectioned and subsequently part of their small blocks remained for 24 hours in a solution of 0.2M phosphate buffer, 5% glutaraldehyde and 2% sucrose. Thereafter, they were washed in the respective buffer and post-fixed in 1% osmium tetroxide for three hours at room temperature. To complete the process, epididymis blocks were dehydrated in increasing series of acetone (50 to 100% for 10 minutes each), infiltrated in resin/acetone solution bath and included in Epoxy resin at 60°C for 72 hours to polymerization. Ultrathin sections (70 nanometers of thickness) were made with a Ultracut UCT LEICA ultramicrotome and were placed on 300 mesh copper grids. They were contrasted in solutions of 2% aqueous uranyl acetate and 0.1% lead citrate. Subsequently, these sections were analyzed and photographed in the LEO 906 transmission electron microscope at the Electronic Microscopy Center of the Biology Institute of State University of Campinas, São Paulo (UNICAMP).

2.7. Statistical Analyses

The statistical analyses of the results were performed using the Student's t-test to compare a pair of data or the variance analysis (One-Way ANOVA) followed by Tukey's Multiple Range Post-Test for multiple comparison. The significance limit was set at $p < 0.05$ and the data were expressed as mean \pm standard deviation. All the statistical analyses were performed by GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1. Testicle

3.1.1. Enzymatic and non-enzymatic endogenous antioxidant system and lipid peroxidation

The GSH, SOD and catalase activity reduced during ageing, in AG group compared to YG group (Figures 1B; 1E-F), whereas the HfAG group showed higher GSH and lower GPx than the AG group (Figures 1B-C). The treatment with both PJE doses increased the GSH, GPx, GR and SOD activity in JAGI and JAGII in relation to AG group, although there was a reduction of GPx and GR in JAGII compared to JAGI (Figures 1B-E). Regarding the groups treated with high-fat diet and PJE, an increase of GR, SOD and catalase activity was observed in the HfJAGI and HfJAGII groups when compared to the HfAG group (Figures 1D-F). The GSH in these PJE treated groups showed a lower activity than the HfAG group (Figure 1B).

Considering the lipid peroxidation results, an increase in the AG and HfAG groups was noticed in relation to their respective control groups, YG and AG group. Also, a significant reduction in lipid peroxidation was observed in JAGI and JAGII groups compared to AG group, and in HfJAGI and HfJAGII groups compared to HfAG group (Figure 1A).

3.1.2. Evaluation of the Inflammatory Pathway

3.1.2.1. NF- κ B

The AG group exhibited increased levels of NF- κ B compared to the YG group. After the ingestion of the high-fat diet, an even higher level of this molecule was observed in the HfAG group in relation to the AG group. In turn, the PJE treatment led to a reduction in NF- κ B levels in the JAGI group when compared to the AG group. Moreover, this treatment also favored reduced levels of NF- κ B in HfJAGI and HfJAGII groups in relation to the HfAG group (Figure 2A).

3.1.2.2. TNF α

The intratesticular content of TNF α increased in aged individuals compared to young individuals. Regarding the PJE treatment, only the higher dosage reduced the level of testicular TNF α in JAGII mice in relation to the AG group, as well as in HfJAGII compared to HfAG group (Figure 2B).

3.1.2.3. IL-17

The AG group exhibited increased levels of IL-17 compared to the YG group. After the ingestion of high-fat diet, an even higher level of IL-17 was observed in the HfAG group compared to the AG group. In turn, the PJE treatment favored the reduction of the levels of this molecule in JAGI and JAGII groups compared to the AG group, and in HfJAGI and HfJAGII groups compared to the HfAG group (Figure 2C).

3.1.2.4. COX-2

Considering the COX-2 concentration, an increase was observed in the AG individuals compared to the YG, whereas in the JAGI, JAGII, HfJAGI, and HfJAGII groups, this enzyme showed a significant reduction in relation to their respective control groups, the AG and HfAG groups. Furthermore, PJE dose-dependency was verified, since COX-2 levels were reduced in the JAGII group compared to the JAGI group (Figure 2D).

3.2. Epididymis

3.2.1. Enzymatic and non-enzymatic endogenous antioxidant system and lipid peroxidation

GPx, GR and catalase activities were reduced in the AG group compared to the YG group, as well as in HfAG mice compared to AG mice (Figures 3C-D; 3F). Concerning the GSH concentration, the AG group presented a significant reduction when compared to the YG group, exhibiting values similar to HfAG group (Figure 3B).

The treatment with the PJE favored a significant increase in the activity of GPx, GR and catalase in JAGI and JAGII groups compared to AG group (Figures 3C-D; 3F). The concentration of GSH showed an increase only in the JAGII group compared to AG group (Figures 3B). In relation to the groups treated with high-fat diet and PJE, a significant increase in the activities of GR, GPx and catalase were observed in the HfJAGI and HfJAGII groups when compared to HfAG group (Figures 3C-D; 3F). This effect was accompanied by a dose-dependent increase in the activity of catalase in the HfJAGII group compared to the HfJAGI group (Figure 3F). However, SOD activity showed a significant reduction in the HfJAGI and HfJAGII groups in comparison to their respective control group, exhibiting values close to the AG group (Figure 3E). Regarding the concentration of GSH, a significant increase was found for HfJAGII when compared to HfAG (Figure 3B).

Considering the lipid peroxidation assay, an increase was observed in the AG and HfAG groups when compared to the YG and AG groups, respectively (Figure 3A). Moreover, a significant reduction of the same parameter was observed in all PJE treated groups, a decrease in epididymis lipid peroxidation being verified in JAGI and JAGII groups compared to the AG group, and in HfJAGI and HfJAGII groups compared to the HfAG group (Figure 3A). A significant dose-dependent reduction was also observed since the JAGII and HfJAGII groups showed lower lipid peroxidation in relation to JAGI and HfJAGI groups, respectively (Figure 3A).

3.2.2. Evaluation of the Inflammatory Pathway

3.2.2.1. *NF- κ B*

Epididymal content of NF- κ B increased in aged animals compared to young ones (Figure 4A). Both PJE treatments reduced the level of this molecule in aged mice. Similarly, the HfJAGI and HfJAGII mice exhibited reduced NF- κ B values compared to the aged mice receiving the high-fat diet (Figure 4A). Moreover, in this analysis, a PJE dose-dependent effect was observed due to the fact that the HfJAGII group showed lower NF- κ B levels than that observed in the HfJAGI group (Figure 4A).

3.2.2.2. *TNF α*

The AG group showed increased levels of TNF α compared to the YG group (Figure 4B). PJE treatment led to the reduction of the epididymal levels of this molecule in the JAGI and JAGII animals

compared to the AG animals (Figure 4B). In addition, a reduction in TNF α level was also observed in HfJAGI and HfJAGII animals in relation to HfAG animals (Figure 4B).

3.2.2.3. *IL-17*

Epididymal content of IL-17 increased in aged animals compared to the young ones (Figure 4C). Both PJE treatments reduced the level of this molecule in JAGI and JAGII groups in relation to aged mice (Figure 4C). Similarly, the HfJAGI and HfJAGII mice exhibited reduced IL-17 levels compared to the aged mice receiving the high-fat diet only (Figure 4C).

3.2.2.1. *COX-2*

The AG group showed higher COX-2 levels in relation to the YG group, as well as in the HfAG compared to the AG group (Figure 4D). Among the PJE treated groups, JAGI, JAGII, HfJAGI and HfJAGII exhibited a significant reduction of COX-2 when compared to their control groups, AG and HfAG, respectively (Figure 4D).

3.3. *Sperm Changes*

Daily Sperm Production (DSP) exhibited reduced values in the AG control group compared to the YG; meanwhile a significant increase in DSP was observed in HfAG compared to AG, which did not exceed the productivity of young individuals. In turn, it was observed that treatment with the patented jaboticaba peel extract favored an expressive improvement in the daily sperm production of the groups JAGI, JAGII, HfJAGI, and HfJAGII (Figure 5A). Likewise, testicular sperm counts also increased after PJE treatment in all experimental groups (Figure 5B).

In addition, the number of spermatozoa stored in the caput/cauda regions exhibited relevant differences among groups. In the caput region, ageing resulted in the reduction of spermatid reserve, while the treatment with the patented jaboticaba peel extract favored a significant increase of this parameter in HfJAGII, JAGI and JAGII groups compared to their respective control groups, HfAG and AG (Figure 5C). In the cauda region, a significant increase in spermatid reserve was observed in both treated groups, HfJAGI and HfJAGII, in comparison with HfAG (Figure 5D).

Considering sperm transit time, some relevant variations were observed (Figures 5E-F). In the caput region, this parameter was increased in HfAG compared to AG, as well as in HfJAGII in relation to HfAG, and also JAGI and JAGII, which stand out from AG (Figure 5E). In the cauda region, there was a significant increase in the HfJAGII group in relation to HfJAGI (Figure 5F).

3.4. *Analysis of Sperm Ultrastructure*

The AG individuals presented several spermatic anomalies (Figures 6C-G; 7C-D) in relation to the YG group (Figures 6A-B; 7A-B). Many spermatozoa have tails with multiple axonemes and large accumulation of cytoplasmic content, denominated cytoplasmic droplet (Figures 6D-G; 7C-D). Also, others exhibit lack of alignment between the head and the flagellum (Figure 6D). In addition, the presence of acrosomal changes was observed, such as in the acrosomal droplet, and acrosomal perforation (Figures 6C; 6E).

In the HfAG group, the presence of breaks in the acrosomal structure in the head was observed, as well as multiple axonemes in the tail region (Figures 6I; 7E). Accompanying such alterations, nucleus duplication was observed with different degrees of chromatin compaction (Figure 6H), as well as an excess of cytoplasmic content in both the head (proximal cytoplasmic droplet) and the tail (distal cytoplasmic droplet) (Figures 6H; 6J-K).

Otherwise, the groups treated with PJE exhibited relative improvements in the sperm ultrastructure, such as a lower accumulation of cytoplasmic content in both the head and the tail, as well as the absence of acrosomal changes (Figures 8A-G). The presence of several spermatozoa with nuclear perforations was observed in the HfJAGI and HfJAGII groups (Figures 8A-C).

4. Discussion

The present study is the first that relates the effect of ageing and the high-fat diet intake on the male reproductive system and the repercussion of treatment with the Patented Jaboticaba peel Extract (PJE) treatment. We found that ageing, potentially reduces intratesticular and epididymal antioxidant activity in mice, associated with a higher rate of lipid peroxidation, which corroborates the direct relationship between increased oxidative stress and ageing. Lipid peroxidation is modulated not only by ROS concentration, but also by the enzymatic and non-enzymatic antioxidant system, especially in reproductive organs, which have high mitotic division and metabolic rates (Weir & Robaire, 2007; Aydin *et al.*, 2015). Antioxidant enzymes such as SOD, GPx, GR, and catalase play a key role in this process (Aydin *et al.*, 2015).

We observed herein that the increase of testicular lipid peroxidation was accompanied by a reduction in the levels of SOD and GSH, together with an increase of GR. In relation to the epididymis, we observed reduced activity of GSH, GPx, GR and catalase during ageing, while SOD was elevated. Considering that the GR main function is to prevent paralysis of the metabolic cycle of glutathione (Aydin *et al.*, 2015), its increased activity might be a compensatory response to the reduction of GSH. Thus, GR would be overexpressed in order to recover the normal GSH concentration (Aydin *et al.*, 2015).

Studies that encompass the expression and action of the endogenous antioxidant system in the

testes of senescent individuals have reported results that were diverse results (Aydin *et al.*, 2015). Weir and Robaire (2007) demonstrated a significant increase in ROS generation accompanied by greater fragmentation of sperm DNA, as well as lower activity of the GPx and SOD enzymes in the sperm of senile Brown Norway rats. Accordingly Cao *et al.*, (2004) and Aydin *et al.*, (2015) have shown a significant increase in lipid peroxidation in the testes of senescent rats compared to juveniles, supporting our results. These authors showed that most components of the antioxidant system, except catalase, exhibited a decline in activity in Leydig cells of aged mice. Gedik *et al.*, (2005) also reported the reduction in GPx and GSH activity, while SOD and catalase remained unchanged in rats. In another study, expression as well as activities of GPx and SOD were reduced with ageing in Brown Norway rats (Luo *et al.*, 2006). Aydin *et al.*, (2015) research, non-enzymatic catalysts such as GSH, vitamin C and E showed no changes, whereas GPx and GST activities were reduced in addition to elevated SOD. Taken altogether, these results corroborate the idea that an imbalance in the endogenous antioxidant activity caused by ageing can result in oxidative stress induction in this organ.

Few studies that quantified the activity of the endogenous antioxidant system on the epididymis of aged animals (Mueller *et al.*, 1998; Jervis & Robaire, 2002; Cao *et al.*, 2004; Zubkova & Robaire, 2004). Mueller *et al.*, (1998) reported a reduced activity for GPx, GR, SOD, and catalase, depending on the epididymis portion, with the cauda region being more affected than the caput. In the study developed by Zubkova and Robaire (2004), the GSH concentration reduction as well as GPx and SOD activity appear accompanied by functional GR increase as a compensatory response to GSH reduction in senescent Brown Norway rats. In Cao *et al.*, (2004), most of the antioxidant system components, except for catalase, showed declined activity in the main cells of the epididymis of aged Wistar rats.

In parallel to the increase in lipid peroxidation rates and oxidative stress in the testis and epididymis of aged mice, we observed an increased expression of many pro-inflammatory modulators, such as NF- κ B, TNF α , IL-17, and COX-2. The relationship between ageing and inflammation in has been widely studied in several organs, but scarcely in the testis and epididymis (Santiago *et al.*, 2018). Numerous molecular ageing mechanisms have recently been proposed, including the relationship between excessive generation of reactive oxygen species and activation of inflammatory pathways (Amaral *et al.*, 2013; Santiago *et al.*, 2018). According to Chung *et al.*, (2002), the inflammatory process acts as a protective mechanism in response to tissue injury, caused, among other factors, by the excessive ROS production, associated with the lower activity of the endogenous antioxidant system. Chung *et al.*, (2002) associated the redox imbalance, that occurs during the ageing process, with the increase in transcription factor NF- κ B stimulation. This factor, therefore, enhances the synthesis of the signaling proteins, such as TNF α , IL-17, and COX-2, in order to put the system on alert for the injury caused. Thus, the injury processes due to ageing can result in a persistent

proinflammatory state, as observed in the present study.

We also observed in our study that the ageing negatively affected the daily sperm production (DSP) and the sperm transit time (STT) as well as induced altered sperm ultrastructure and decreased viability. It is already known that daily sperm production, total sperm count, and sperm viability are negatively correlated with age. Daily sperm production decreases more than 30% in men over the age of 50 and is negatively correlated to age in men in general (Johnson *et al.*, 1984; Cooper *et al.*, 2010). Stone *et al.*, (2013) observed that after the age of 45, semen quality gradually decreases due to functional decline of the accessory glands. In addition, sperm morphology was also affected with ageing and the percentage of sperm with normal morphology begins to decrease after age of 40 (Stone *et al.*, 2013). In agreement, Hossain *et al.*, (2012), Johnson *et al.*, (2015) and Verón *et al.*, (2018) correlated lower sperm count, motility and viability with increased age in men. Furthermore, the increased lipid peroxidation and the reduction in levels of endogenous antioxidant enzymes noted in our study for the AG group, seems to be related with the alterations of sperm parameters. Several studies have already reported the direct relationship between ageing, ROS, increased oxidative stress, and reduced sperm count (Agarwal *et al.*, 2005; Durairajanayagam *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2015). According to Sharma *et al.*, (2015), these factors culminate with the elevation of lipid peroxidation, reduction in membrane fluidity of spermatozoa and damage to sperm DNA, which ultimately result in loss of sperm motility and vitality. Weir & Robaire (2007) demonstrated a significant increase in ROS generation accompanied by greater sperm DNA fragmentation, as well as by a lower activity of GPx and GR enzymes in spermatozoa of aged brown Norway rats. In agreement, the studies developed by Cao *et al.*, (2004) and Aydin *et al.*, (2014) showed significant increase in lipid peroxidation, observed by TBARS method, in the testes of ageing Wistar rats compared to juveniles, similar to the observations of Vernet *et al.*, (2004) for the epididymis of ageing Wistar rats.

Several studies have already shown the direct relationship between feeding with a high-fat diet, inflammation, increase of the scrotal temperature and the increase in the ROS generation (Vigueras-Villaseñor, 2011; Asadi *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2018). Vigueras-Villaseñor *et al.*, (2011) and Asadi *et al.*, (2017) highlighted that the conditions mentioned above are associated with reduced SOD, catalase and GPx activity. In the present study, a significant increase in testicular lipid peroxidation and GSH was observed in high-fat-fed aged mice. In addition, these animals also exhibited reduced GPx, GR, and catalase activities in the testis, indicating that high-fat-diet intake negatively interfered with the glutathione cycle in this organ. Among the few studies on the influence of obesity on the epididymis, Liu & Ding (2017) reported an increase in epididymal temperature, accompanied by a reduction in the activity of the endogenous antioxidant system, as observed in the present study. These events combined could culminate in the reduction of membrane fluidity, damage to sperm DNA, loss of spermatozoa

vitality and impaired tissue homeostasis (Sharma *et al.*, 2015).

There are few studies that analyzed the impact of a high-fat diet intake in aged mice, especially regarding the inflammatory parameters in the sexual organs (Chung *et al.*, 2002; Viguera-Villaseñor *et al.*, 2011). In our study, we reported a significant increase in NF- κ B and COX-2 levels in the testes of high-fat-fed aged mice, although in the epididymis only IL-17 levels showed a significant increase in the same animals. The overweight is highlighted as a condition that tends to increase, in frequency, with advancing age, being related to the systemic accumulation of inflammatory markers due to the extensive infiltration of inflammatory cells in white adipose tissue (Fan *et al.*, 2018).

In the male reproductive tract, testicular macrophages and some proinflammatory cytokines, such as IL-8 and IL-17, produced by Leydig and Sertoli cells, contribute to chronic inflammation development (Salomon *et al.*, 2013). Regulatory immune factors can be secreted by these cells as a way of balancing the injury generated. Together, all these factors contribute to the regulation of testicular function (Maegawa *et al.*, 2002; Salomon *et al.*, 2013). Moreover, other regulatory factors and proinflammatory cytokines are secreted by epididymal principal cells (Maegawa *et al.*, 2002; Fraczek & Kurpisz, 2015). In fact, elevations in pro- and anti-inflammatory cytokines are one of the first signals released by the organic defense system to neutralize the inflammatory process of the genital tract (Fraczek & Kurpisz, 2015). Consistent with this, Fan *et al.*, (2018) reported an increase in the expression levels of NF- κ B, IL-6 and TNF α in the testis and epididymis of mice fed with a high-fat diet. Additionally, Liu *et al.*, (2012) showed that the exposure to a high-fat diet increased intestinal secretion of proinflammatory cytokines in mice. Fan *et al.*, (2018) reported that obesity induced by a high-fat diet led to impaired sperm function, including reduction in motility and acrosomal reaction, as well as an abnormal sperm morphology. Moreover, there is supporting evidence that NF- κ B and TNF α are apoptotic regulators of male germ cells (Fan *et al.*, 2018), contributing to limit the excessive expansion of germ cells during spermatogenesis. In general, it is believed that the exacerbated increase of such molecules tends to increase tissue apoptosis, leading to organ destruction (Maegawa *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2012; Salomon *et al.*, 2013; Fraczek & Kurpisz, 2015; Sharma *et al.*, 2015; Liu & Ding, 2017). Therefore, we believe that the endogenous antioxidant imbalance, potentiated by the high-fat diet intake during ageing, could have stimulated increased levels of molecules from different pro-inflammatory pathways in the testis and epididymis, potentiating inflammation in these organs.

It has been reported a decrease in sperm motility (Bakos *et al.*, 2010; Ghanayem *et al.*, 2010) and fertilization rate (Bakos *et al.*, 2010) have been associated with increase in sperm DNA damage and sperm intracellular reactive oxygen species (ROS) in diet-induced overweight male mice (Bakos *et al.*, 2010). However, Tortoriello *et al.*, (2004) found no impairment in the fertility of male DBA/2J mice after they were fed a high-fat diet. According to Tortoriello *et al.*, (2004), the amount of high-fat diet

administered was not enough to reach a higher pathological level. In accordance with the results described by Tortoriello *et al.*, (2004), our results did not show alterations to the sperm count in testicle and epididymis caput/cauda of HfAG animals when compared to AG animals. In fact, the HfAG group had higher daily sperm production than the AG group. Nevertheless, the HfAG animals exhibited alterations in sperm ultrastructure, which were much more severe and in greater proportion as compared to its control. Therefore, although the amount of spermatozoa produced was higher, the sperm quality was impaired after the high-fat diet consumption.

Moreover, the administration of PJE to aged or high-fat-fed aged mice, as well as to senescent overweight mice, resulted in lower levels of TNF α , NF- κ B, COX-2, and IL-17 in combination with the recovery of the endogenous antioxidant system activity. The PJE was revealed to be an excellent source of polyphenols, as tested by Lamas *et al.*, (2018), and to display high anti-oxidant and anti-inflammatory capacity particularly in the liver of overweight animals (Lenquiste *et al.*, 2012; Dragano *et al.*, 2013; Lenquiste *et al.*, 2015; Lamas *et al.*, 2018). However, to the best of our knowledge, there are no studies in the literature concerning the influence of jaborcaba on organs of male reproductive system, under conditions of obesity and ageing.

In general, several publications have shown that antioxidants improve various processes of the male reproductive function, mainly by reducing the oxidative damage, and as a consequence led to improvement in sperm count and viability (Chenniappan & Murugan, 2017; Lamas *et al.*, 2017; Archana *et al.*, 2018; Selmi *et al.*, 2018). In this context, Chenniappan and Murugan (2017) observed that the treatment with *Ionidium suffruticosum* extract improved catalase and SOD levels in the testicles and epididymis, as well as the epididymal sperm count, in albino Wistar rats. Selmi *et al.*, (2018) reported a reduction in the free radical levels as well as improved levels of GPx, catalase and total SOD, both in the testis and in the epididymis of Wistar rats intoxicated with malathion and treated with *Lavandula stoechas* essential oil. Lamas *et al.*, (2017) observed that the treatment with grape juice favored the reduction of lipid peroxidation level accompanied by the improvement in sperm count and STT in testis and epididymis of Wistar rats intoxicated with cadmium chloride. Another study observed that grape seed extract increased sperm count, viability and motility in albino Sprague Dawley rats contaminated with aluminum chloride (Hala *et al.*, 2010). In addition, according Archana *et al.*, (2018) the co-administration of resveratrol has been shown to result in a significant improvement in steroidogenesis and spermatogenesis and mitigation of oxidative stress in polyvinyl chloride (PVC) exposed rats. So, these data are corroborating the evidence that lifestyle adopted as well as the quality of diet are crucial factors to protect the body against some changes observed during ageing.

The action mechanisms of polyphenols in cells and tissues are not yet fully understood, but several possibilities have been proposed and they constitute an area of intense research. Polyphenols

may interact directly with proteins, such as enzymes, receptors or transcription factors, and affect signaling pathways (Fraga *et al.*, 2010). They can interact with nucleic acids (epigenetic mechanisms) affecting DNA methylation, histone modifications or modulate the levels of noncoding regulatory molecules such as microRNAs (Fraga *et al.*, 2010). Bayatli *et al.*, (2013) reported that grape seed extract, that has a high level of flavonoids, prevents nitric oxide production in the testes by reducing the activities of nitric oxide synthase. This action of grape seed extract resulted in protection of the sperm cells against DNA damage, and consequently a decrease in oxidative harm. Chenniappan & Murugan (2017) showed that the flavonoids present in the leaf extract of *Ionidium suffruticosum* have a stimulating role on microtubule polymerization and increase the formation of mitotic spindle by binding to tubulin, which thereby increased the sperm count. Similarly, Triparthy *et al.*, (1996) reported that *Withania somnifera* has steroidal lactones with structural similarities to androgens, which stimulate the enzymes related to steroidogenesis, such as glucose 6-phosphate dehydrogenases, and thereby, improve sperm production. Kim *et al.*, (2011) showed that dietary polyphenols attenuated high-fat diet-induced adipogenesis and inflammation in the epididymal fat tissues of mice. In overweight mice treated with resveratrol, the elevated levels of IL-6, IL-17A and TNF- α in adipose tissue were reduced. Moreover, polyphenols in general induce the marker genes of M2 macrophages (alternatively activated macrophages), whereas the genes of M1 macrophages (classically activated macrophages) were decreased, which indicate that polyphenols could induce the macrophage switch in white adipose tissue (Liu *et al.*, 2016). Indeed, polyphenols have been shown to reduce inflammation through the disruption of the crosstalk between adipocytes and macrophages, which occurs via a decrease in pro-inflammatory cytokines and the suppression of inflammatory signaling, in an experimental model using macrophage-conditioned medium. Therefore, the phenolic compounds are known by the high antiobesogenic potential. Accordingly, in the present study, both PJE doses administered to overweight aged mice exhibited a reduction in lipid peroxidation and increased activity levels of the endogenous antioxidant system, both in the testis and in the epididymis. Moreover, all the groups treated with PJE exhibited improvement in daily production sperm, sperm count and the STT, besides displaying fewer abnormalities in sperm ultrastructure in relation to the control groups. Therefore, we could say that the PJE chronic treatment reverses the deficient endogenous activity of the antioxidant enzymes seen in aged and overweight aged mice.

In addition, we observed that the PJE exerted a dose-dependent beneficial anti-inflammatory effect, specially related to the molecular markers NF- κ B and COX-2, on the epididymis and inhibited the oxidative stress in both epididymis and testes. The levels of thiobarbituric acid significantly reduced, to below the values found in young individuals, for the epididymis, but similar to young values in the testicles. In addition, levels of GPx and GR in the testis of JAGII and HfJAGII, in relation to

JAGI and HfJAGI respectively, have reached values closer to those exhibited by the YG group. Although the PJE dose-dependency was statistically significant mainly in the parameters described above, both PJE doses were effective and did not show apparent side effects or toxicity signs. Hence, considering the PJE benefits verified in the present research we encourage the development of human studies since life expectancies and obesity have increased in the world, and both are directly associated with inflammation and oxidative stress processes affecting all body systems, including the reproductive tract.

5. Conclusion

Ageing led to changes in oxidative stress and inflammatory processes, with reduction of the endogenous antioxidant system, accompanied by increases of proinflammatory molecules, that reflected in sperm count and quality. Likewise, a high-fat diet intake worsened the oxidative stress and inflammatory processes in the testis and epididymis. PJE administration associated with a high-fat diet intake resulted in the reduction of lipid peroxidation, as well as the regularization of enzyme activity involved in the endogenous antioxidant system. Moreover, proinflammatory molecule levels were significantly reduced in the organs of the reproductive tract studied, indicating that PJE components display high anti-inflammatory activity, counterbalancing the tissue inflammation exhibited by senescent and overweight senescent animals. Consequently, these antioxidant and anti-inflammatory actions lead to better daily sperm production, sperm count, in the testes and epididymis, and sperm quality. In addition, considering the ageing process alone, PJE intake also had positive effects on both organs by reducing the levels of pro-inflammatory molecules and in the activity of enzymes of the endogenous antioxidant system. Thus, PJE reversed the typical ageing process, reducing the overload on these organs, which reflected on sperm viability. Therefore, our results pointed to beneficial anti-inflammatory and antioxidant effects on the functioning of the testis and epididymis of aged and overweight animals. Further studies with this PJE in human beings could lead to new therapeutic alternatives to treat metabolic disorders that affect the organs of the male reproductive system.

Funding

This work was supported by the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq – 142329/2017-7) and the São Paulo Research Foundation (FAPESP – 2016/18201-0).

Acknowledgment

We would like to thank Dr. Raquel Frenedoso who helped us with the sperm count protocols.

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to disclose.

References

- Agarwal A, Makker K & Sharma R. (2008) Review article: clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* 59, 2-11.
- Agarwal A, Prabakaran SA & Said TM. (2005) Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl* 26, 654–60.
- Amaral A, Lourenço B, Marques M & Ramalho-Santos J. (2013). Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction* 146, 163–174.
- Archana D, Supriya C, Girish BP, Kishori B & Sreenivasula R. (2018) Alleviative effect of resveratrol on polyvinyl chloride-induced reproductive toxicity in male Wistar rats. *Food Chem Toxicol* 116, 173–181.
- 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. *J Clin Diagn Res* 11, IE01- IE05.
- Aydın AF, Çoban J, Doğan-Ekici I, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M & Koçak-Toker N. (2015) Carnosine and vitamin E—a promising pair in the combat against testicular oxidative stress in aged rats. *Andrologia* 47, 1131-1138.
- Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP & Lane M. (2010) The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int J Androl* 34, 402-410.
- Cao L, Leers-Sucheta S & Azhar S. (2004). Ageing alters the functional expression of enzymatic and non-enzymatic anti-oxidant defense systems in testicular rat Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1, 61-67.
- Carlberg I & Mannervik B. (1985) Glutathione-reductase. *Methods Enzymol* 113, 484–490.
- Chambers TJ & Richard RA. (2015) The impact of obesity on male fertility. *Hormones* 14, 563–568.
- Chenniappan K & Murugan K. (2017) Therapeutic and fertility restoration effects of *Ionidium suffruticosum* on sub-fertile male albino Wistar rats: effects on testis and caudal spermatozoa. *Pharm Biol* 55, 946-957.
- Chung HY, Kim HJ, Kim KW, Choi JS & Yu BP. (2002) Molecular inflammation hypothesis of ageing based on the anti-ageing mechanism of calorie restriction. *Microsc Res Tech* 59, 264-272.
- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizyo MT & Vogelsong KM. (2010) World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 16, 231–45.
- De la Fuente M & Miquel J. (2009). An update of the oxidation-inflammation theory of ageing: The involvement of the immune system in oxi-inflamm-ageing. *Curr Pharm Des* 15, 3003–3026. Doi: <https://doi.org/10.2174/138161209789058110>
- De Sá L, Castro PFS, Lino FMA, Bernardes MJC, Viegas JCJ, Dinis TCP, Santana MJ, Romão W, Vaz BG, Lião LM, Ghedini PC, Rocha ML & Gil ES. (2014) Antioxidant potential and vasodilatory activity of fermented beverages of jaboticaba berry (*Myrciaria jaboticaba*). *J Funct Foods* 8, 169-179.
- Donadio LC. (2010) Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg. (1st Edition), FUNEP, Jaboticabal.
- Dragano NRV, Marques AC & Cintra DEC. (2013) Freeze-dried jaboticaba peel powder improves

- insulin sensitivity in high fat-fed mice. *Br J Nutr* 110, 447–455.
- Durairajanayagam D, Agarwal A, Ong C & Prashast P. (2014) Lycopene and male infertility. *Asian J Androl* 16, 420–5.
- Ellman GL. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82, 70–77.
- Fan W, Xu Y, Liu Y, Zhang Z, Lu L & Ding Z. (2018) Obesity or Overweight, a Chronic Inflammatory Status in Male Reproductive System, Leads to Mice and Human Subfertility. *Front Physiol* 8, 1117–1123.
- Fernandez CD, Bellentani FF, Fernandes GS, Perobelli JE, Favareto APA, Nascimento AF & Kempinas WD. (2011) Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reprod Biol Endocrinol* 9, 32–40.
- Ferramosca A, Moscatelli N, Di Giacomo M, & Zara V. (2016) Dietary fatty acids influence sperm quality and function. *Androl* 5, 423–430.
- Flohe L & Gunzler WA. (1984) Assays of glutathione-peroxidase. *Methods Enzymol* 105, 114–121.
- Fraczek M & Kurpisz M. (2015) Cytokines in the male reproductive tract and their role in infertility disorders. *J Reprod Immunol* 108, 98–104.
- Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV & Oteiza PI. (2010) Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med* 31, 435–445.
- Frungieri MB, Calandra RS, Bartke A & Matzkin ME. (2018). Ageing and inflammation in the male reproductive tract. *Andrologia* 50, e13034. Doi: <https://doi.org/10.1111/and.13034>
- Gedik CM, Grant G, Morrice PC, Wood SG & Collins AR. (2005) Effects of age and dietary restriction on oxidative DNA damage, antioxidant protection and DNA repair in rats. *Eur J Nutr* 44, 263–272.
- Ghanayem BI, Bai R, Kissling GE, Travlos G & Hoffler U. (2010) Diet-induced obesity in male mice is associated with reduced fertility and potentiation of acrylamide-induced reproductive toxicity. *Biol Reprod* 82, 94–104. Doi: 10.1095/biolreprod.109.078915.
- Griveau J & Lannou D. (1997) Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 20, 61–9.
- Hossain MM, Fatima P, Rahman D & Hossain HB. (2012) Semen parameters at different age groups of male partners of infertile couples. *Mymensingh Med J* 21, 306–315.
- Hossain A, Bhaumik D, Selukar R, Huff C, Rizk B & Thorneycroft I. (1997) Assessment of the relationship of sperm morphology with seminal and other clinical conditions of semen donors. *Arch Androl* 39, 111–7.
- Jervis KM & Robaire B. (2002) Changes in gene expression during ageing in the brown Norway rat epididymis. *Exp Gerontol* 37, 897–906.
- Johnson L, Petty CS & Neaves WB. (1984) Influence of age on sperm production and testicular weights in men. *J Reprod Fertil* 70, 211–8.
- Johnson SL, Dunleavy J, Gemmell NJ & Nakagawa S. (2015) Consistent age-dependent declines in human semen quality: a systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev* 19, 22–33.
- Kaushik A & Bhartiya D. (2018) Pluripotent Very Small Embryonic-Like Stem Cells in Adult Testes – An Alternate Premise to Explain Testicular Germ Cell Tumors. *Stem Cell Rev Rep* 14, 793–800. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12015-018-9848-3>
- Kempinas WDG, Suarez JD, Roberts NL, Strader L, Ferrell J, Goldman JM & Klinefelter GR. (1998) Rat epididymal sperm quantity, quality, and transit time after guanethidine-induced sympathectomy. *Biol Reprod* 59, 890–896.

- Kidd SA, Eskenazi B & Wyrobek AJ. (2001) Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil Steril* 75, 237-48.
- Kim S, Jin Y, Choi Y & Park T. (2011) Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. *Biochem Pharmacol* 81, 1343–1351.
- Lamas CA, Gollucke APB & Dolder H. (2017) Grape Juice Concentrate Alleviates Epididymis and Sperm Damage in Cadmium-Intoxicated Rats. *Int J Exp Pathol* 98, 86–99.
- Lamas CA, Lenquiste SA, Baseggio AM, Cuquetto-Leite L, Kido LA, Aguiar MN, Collares-Buzato MR, Maróstica Jr MR & Cagnon VHA. (2018) Jaboticaba extract prevents prediabetes and liver steatosis in high-fat-fed ageing mice. *J Funct Foods* 47, 434–446.
- Lavranos G, Balla M, Tzortzopoulou A, Syriou V & Angelopoulou R. (2012) Investigating ROS sources in male infertility: a common end for numerous pathways. *Reprod Toxicol* 34, 298-307.
- Lawson G & Fletcher R. (2014) Delayed fatherhood. *J Fam Plann Reprod Health Care* 40, 283-288.
- Lenquiste SA, Batista AG, Marineli RS, Dragano NRV & Maróstica Jr MR. (2012) Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. *Food Res Int* 49, 153–160.
- Lenquiste SA, da Silva MR, Moraes ÉA, Dionísio AP, de Brito ES & Maróstica MR. (2015) Jaboticaba peel and jaboticaba peel aqueous extract shows in vitro and in vivo antioxidant properties in obesity model. *Food Res Int* 77, 162-170.
- Liu Y & Ding Z. (2017) Obesity, a serious etiologic factor for male subfertility in modern society. *Reproduction* 154, R123-R131.
- Liu Z, Brooks RS, Ciappio ED, Kim SJ, Crott JW & Bennett G. (2012) Diet-induced obesity elevates colonic TNF- α in mice and is accompanied by an activation of Wnt signaling: a mechanism for obesity-associated colorectal cancer. *J Nutr Biochem* 23, 1207–1213.
- Liu Z, Gan L, Liu G, Chen Y, Wu T, Feng F, *et al.* (2016) Sirt1 decreased adipose inflammation by interacting with Akt2 and inhibiting mTOR/S6K1 pathway in mice. *J Lipid Res* 57, 1373–1381.
- Luo L, Chen H, Trush MA, Show MD, Anway MD & Zikrin BR. (2006) Ageing and the Brown Norway rat Leydig cell antioxidant defense system. *J Androl* 27, 240–247.
- Maegawa M, Kamada M, Irahara, M. *et al.* (2002) A repertoire of cytokines in human seminal plasma. *J Reprod Immunol* 54, 33–42. Doi: 10.1016/S0165-0378(01)00063-8
- Maggio M, Basaria S, Ceda GP, Ble A, Ling SM, Bandinelli S & Ferrucci L. (2005). The relationship between testosterone and molecular markers of inflammation in older men. *J Endocrinol Invest* 28, 116-119.
- Makker K, Agarwal A & Sharma R. (2009) Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res* 129, 357-67.
- Matzkin ME, Miquet JG, Fang Y, Hill CM, Turyn D, Calandra RS, Bartke A & Frungieri MB. (2016) Alterations in oxidative, inflammatory and apoptotic events in short-lived and long-lived mice testes. *Ageing (Albany NY)* 8, 95-110.
- Mueller A, Hermo L & Robaire B. (1998) The effects of ageing on the expression of glutathione S-transferases in the testis and epididymis of the Brown Norway rat. *J Androl* 19, 450–465.
- Mukhopadhyay D, Varghese AC, Pal M, Banerjee SK, Bhattacharyya AK, Sharma RK & Agarwal A. (2010) Semen quality and age-specific changes: a study between two decades on 3,729 male partners of couples with normal sperm count and attending an andrology laboratory for infertility-related problems in an Indian city. *Fertil Steril* 93, 2247–54.

- Murray MJ & Meacham RB. (1993) The effect of age on male reproductive function. *World J Urol* 11, 137-40.
- Ohkawa H, Ohishi N & Yagi K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal-tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95, 351–358.
- Robb GW, Amann RP & Killian GJ. (1978) Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fert* 54, 103–107.
- Salomon TB, Hackenhaar FS, Almeida AC, Schüller AK, Alabarse VG, Ehrenbrink G & Benfato MS. (2013) Oxidative stress in testis of animals during ageing with and without reproductive activity. *Exp Geront* 48, 940-946.
- Santiago J, Silva JV, Alves MG, Oliveira PF & Fardilha M. (2018). Testicular ageing: an overview of ultrastructural, cellular and molecular alterations. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci A* 93, 234-245.
- Schell C, Albrecht M, Spillner S, Mayer C, Kunz L, Köhn FM & Mayerhofer A. (2010). 15-Deoxy-delta12–14-prostaglandin-J2 induces hypertrophy and loss of contractility in human testicular peritubular cells: Implications for human male fertility. *Endocrinology* 151, 1257–1268. Doi: <https://doi.org/10.1210/en.2009-1325>
- Selmi S, Rtibi K, Grami D, Sbai H & Marzouki L. (2018) *Lavandula stoechas* essential oils protect against Malathion-induced reproductive disruptions in male mice. *Lipids Health Dis* 8, 253-266. Doi: 10.1186/s12944-018-0891-5
- Sharma R, Agarwal A, Rohra VK, Assidi M, Abu-Elmagd M & Turki RF. (2015) Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 13-35.
- Stone BA, Alex A, Werlin LB & Marrs RP. (2013) Age thresholds for changes in semen parameters in men. *Fertil Steril* 100, 952–8.
- Sullivan R. (2015) Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. *Asian J Androl* 17, 726–729.
- Tortoriello DV, McMinn J & Chua SC. (2004) Dietary-Induced Obesity and Hypothalamic Infertility in Female DBA/2J Mice. *Endocrinol* 145, 1238–1247. Doi: <https://doi.org/10.1210/en.2003-1406>
- Verón GL, Tissiers AD, Bello R, Beltramone F, Estofan G, Molina RI & Vazquez-Levin MH. (2018) Impact of age, clinical conditions, and lifestyle on routine semen parameters and sperm kinematics. *Fertil Steril* 110, 68–75. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.03.016>
- Vigueras-Villaseñor RM, Rojas-Castañeda JC & Chavez-Saldana M. (2011) Alterations in the spermatogenic function generated by obesity in rats. *Acta Histochem* 113, 214-220.
- Vigueras-Villaseñor RM, Rojas-Castañeda JC, Chavez-Saldana M, Gutiérrez-Pérez O, García-Cruz ME, Cuevas-Alpuche O & Zambrano E. (2011) Alterations in the spermatogenic function generated by obesity in rats. *Acta Histochem* 113, 214–220.
- Wang HJ, Wang Q, Lv ZM, Wang CL, Li CP & Rong YL. (2015) Resveratrol appears to protect against oxidative stress and steroidogenesis collapse in mice fed high-calorie and high-cholesterol diet. *Andrologia* 47, 59-65.
- Weir CP & Robaire B. (2007) Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during ageing in the Brown Norway rat. *J androl* 28, 229-240.
- Wheeler CR, Salzman JA, Elsayed NM, Omayse ST & Korte DW Jr. (1990) Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Anal Biochem* 184, 193–199.

- Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M & Carrell RW. (1975) Estimation of red-cell superoxide-dismutase activity. *J Lab Clin Med* 85, 337–341.
- World Health Organization. (2018) The Nutrition Challenge: Food System Solutions. 1st ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations 1-12.
- Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim I, Tiemann-Boege I, Jabs EW, Glaser RL, Pearson FS & Evenson D. (2006) Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 9601-6.
- Zubkova EV & Robaire B. (2004) Effect of glutathione depletion on antioxidant enzymes in the epididymis, seminal vesicles, and liver and on spermatozoa motility in the ageing brown Norway rat. *Biol Reprod* 1, 1002–1008.

Figures and Legends

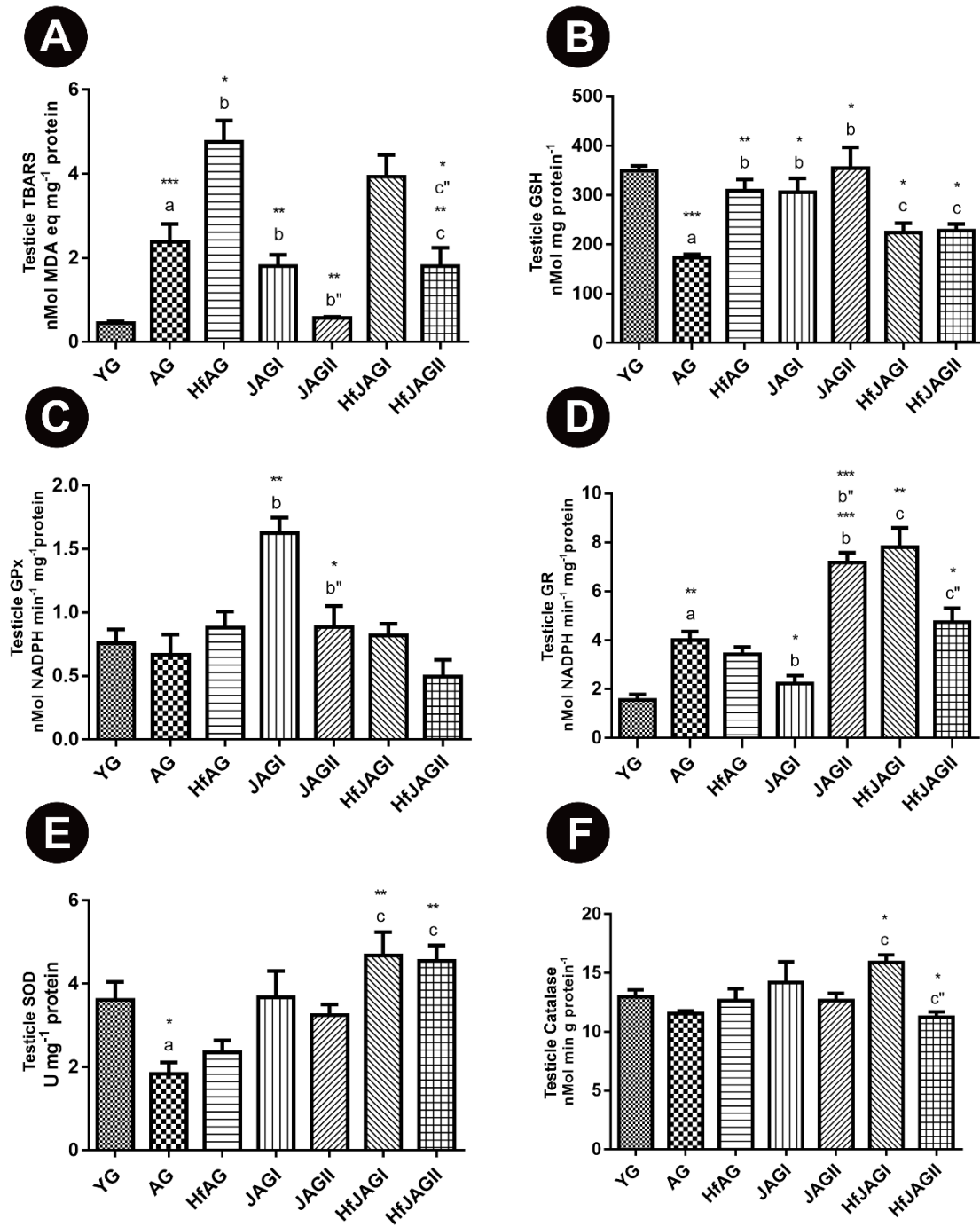


Figure 1. Oxidative Stress analyzes of TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances), GSH (reduced glutathione) levels, and the GPx (Glutathione Peroxidase), GR (Glutathione Reductase), SOD (Superoxide Dismutase), and Catalase enzymes activity, in testicle of the experimental groups. (A) TBARS. (B) GSH. (C) GPx. (D) GR. (E) SOD. (F) Catalase. Significant differences: ^arelative to YG group; ^brelative to AG group. ^{b''}relative to JAGI. ^crelative to HfAG group. ^{c''}relative to HfJAGI group. Considering: **p* < 0.05; ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001.

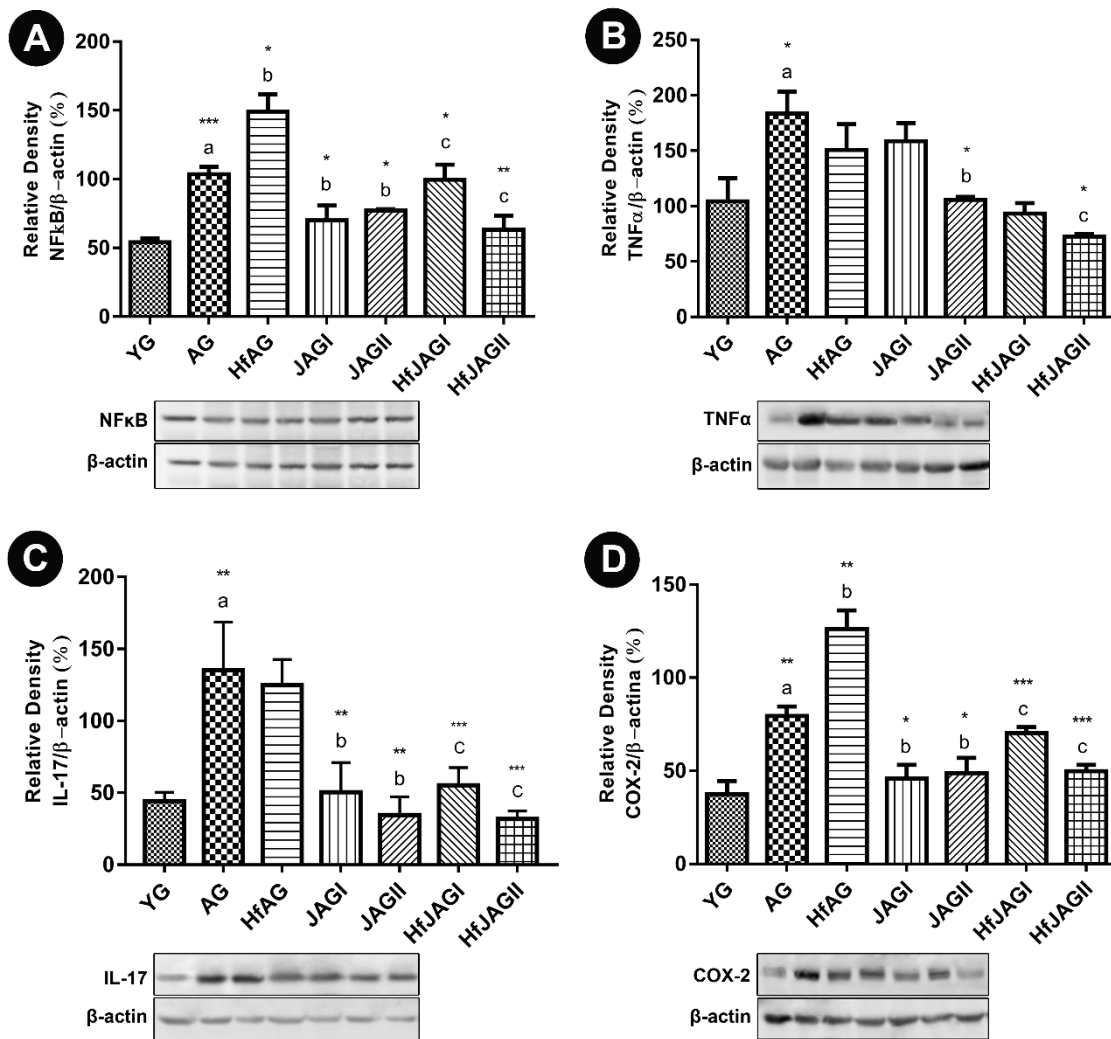


Figure 2. Western blotting analysis of NF- κ B, TNF α , IL-17 and COX-2 levels from testicle of the experimental groups. (A) NF- κ B. (B) TNF α . (C) IL-17. (D) COX-2. Significant differences: ^arelative to YG group; ^brelative to AG group. ^crelative to HfAG group. Considering: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

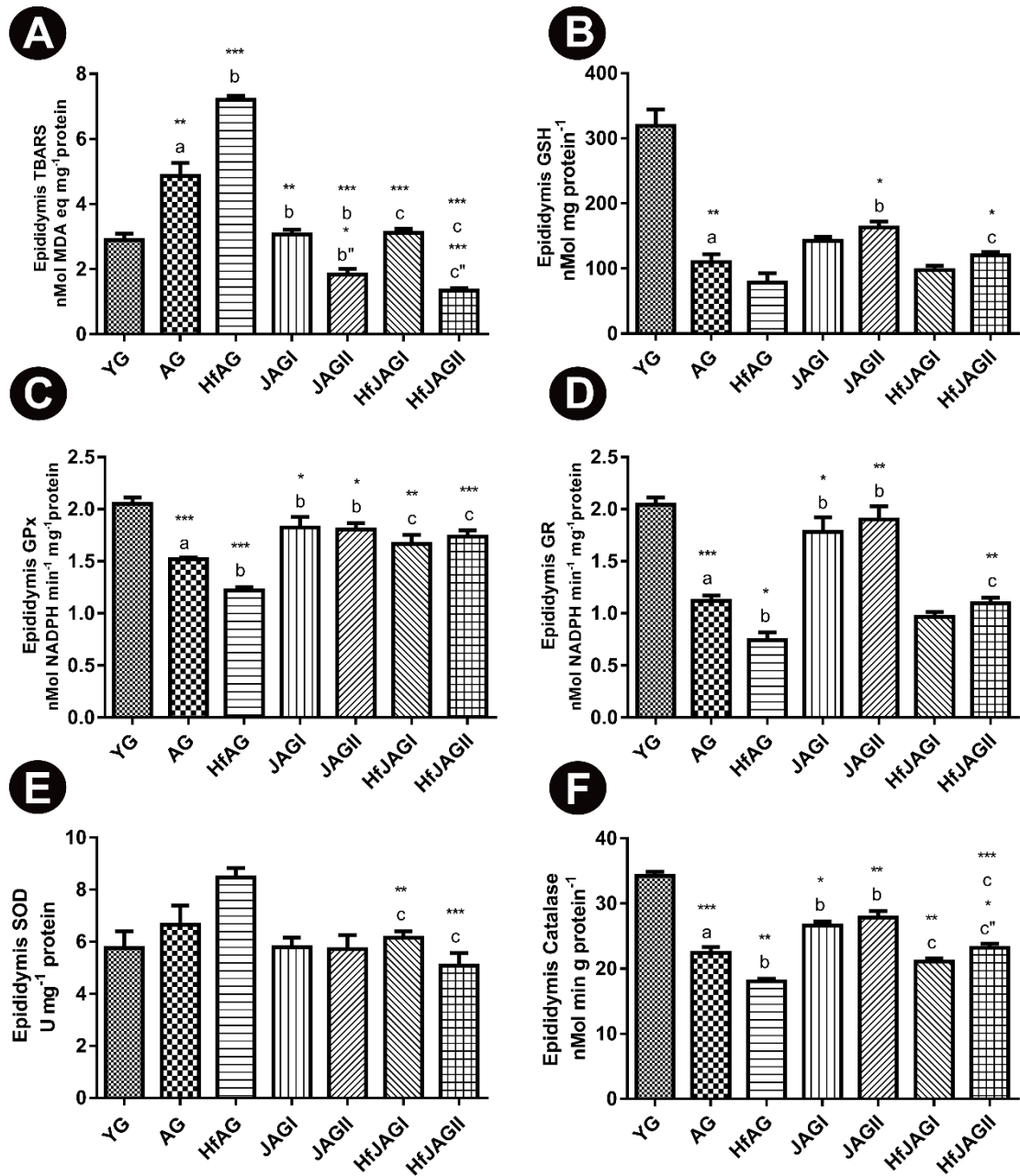


Figure 3. Oxidative Stress analyzes of TBARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substances), GSH (reduced glutathione) levels, and the GPx (Glutathione Peroxidase), GR (Glutathione Reductase), SOD (Superoxide Dismutase), and Catalase enzymes activity, in epididymis of the experimental groups. (A) TBARS. (B) GSH. (C) GPx. (D) GR. (E) SOD. (F) Catalase. Significant differences: ^arelative to YG group; ^brelative to AG group. ^{b''}relative to JAGI. ^crelative to HfAG group. ^{c''}relative to HfJAGI group. Considering: **p* < 0.05; ***p* < 0.01 and *** *p* < 0.001.

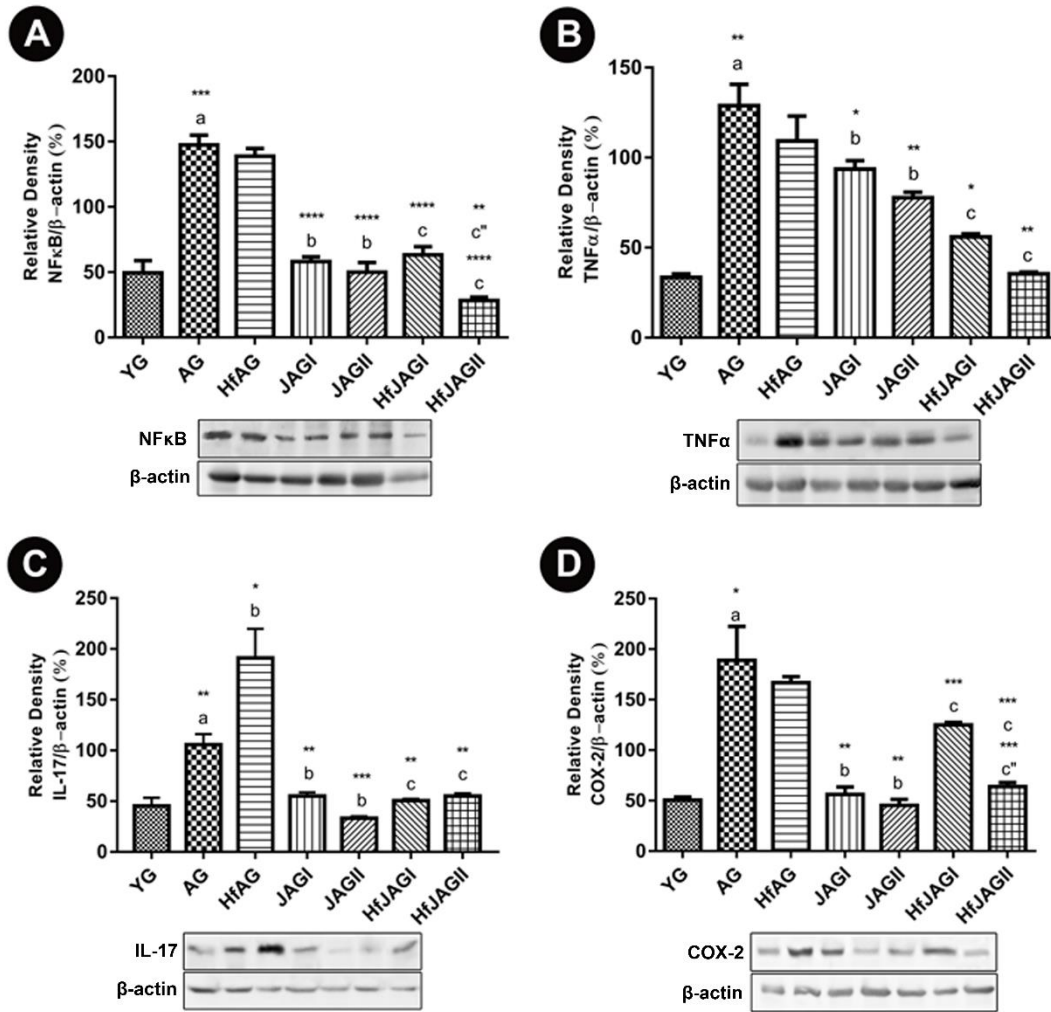


Figure 4. Western blotting analysis of NF- κ B, TNF α , IL-17 and COX-2 levels from epididymis of the experimental groups. (A) NF- κ B. (B) TNF α . (C) IL-17. (D) COX-2. Significant differences: ^arelative to YG group; ^brelative to AG group. ^crelative to HfAG group. ^{c'}relative to HfJAGI group. Considering: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

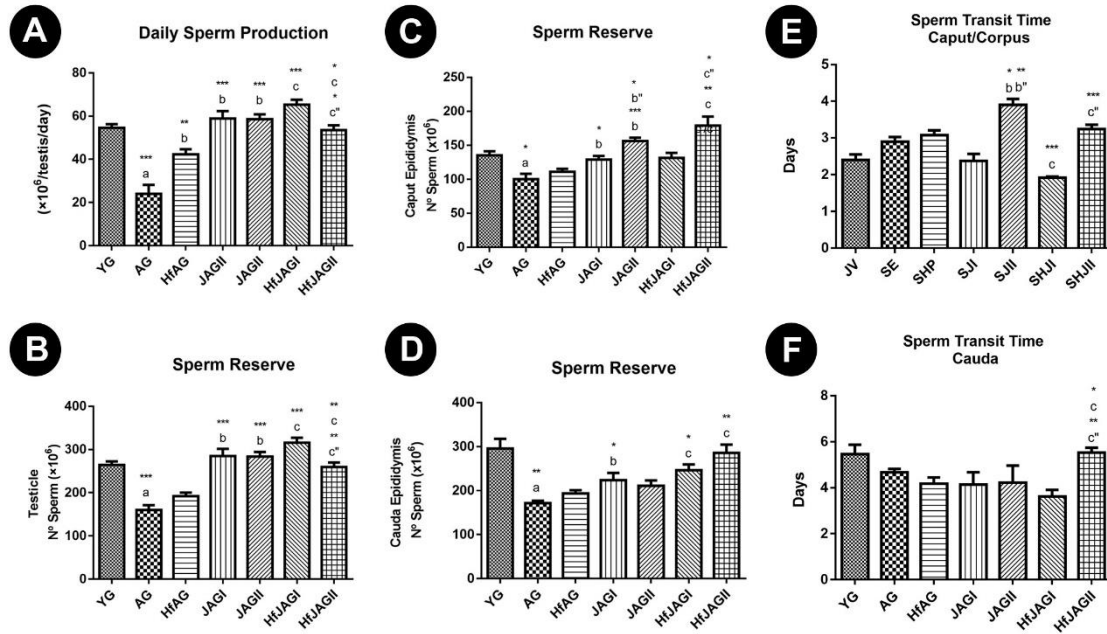


Figure 5. Analysis of spermiatic parameters between the experimental groups from testicle and epididymis caput/cauda. (A) Daily Sperm Production from testicle. (B) Sperm Reserve from testicle. (C) Sperm Reserve from the Caput region. (D) Sperm Reserve from Cauda region. (E) Sperm Transit Time from Caput/Corpus region. (F) Sperm Transit Time from Cauda region. Significant differences: ^arelative to YG group; ^brelative to AG group. ^crelative to HfAG group. ^{c'}relative to HfJAGI group. Considering: *p < 0.05; **p < 0.01 and *** p < 0.001.

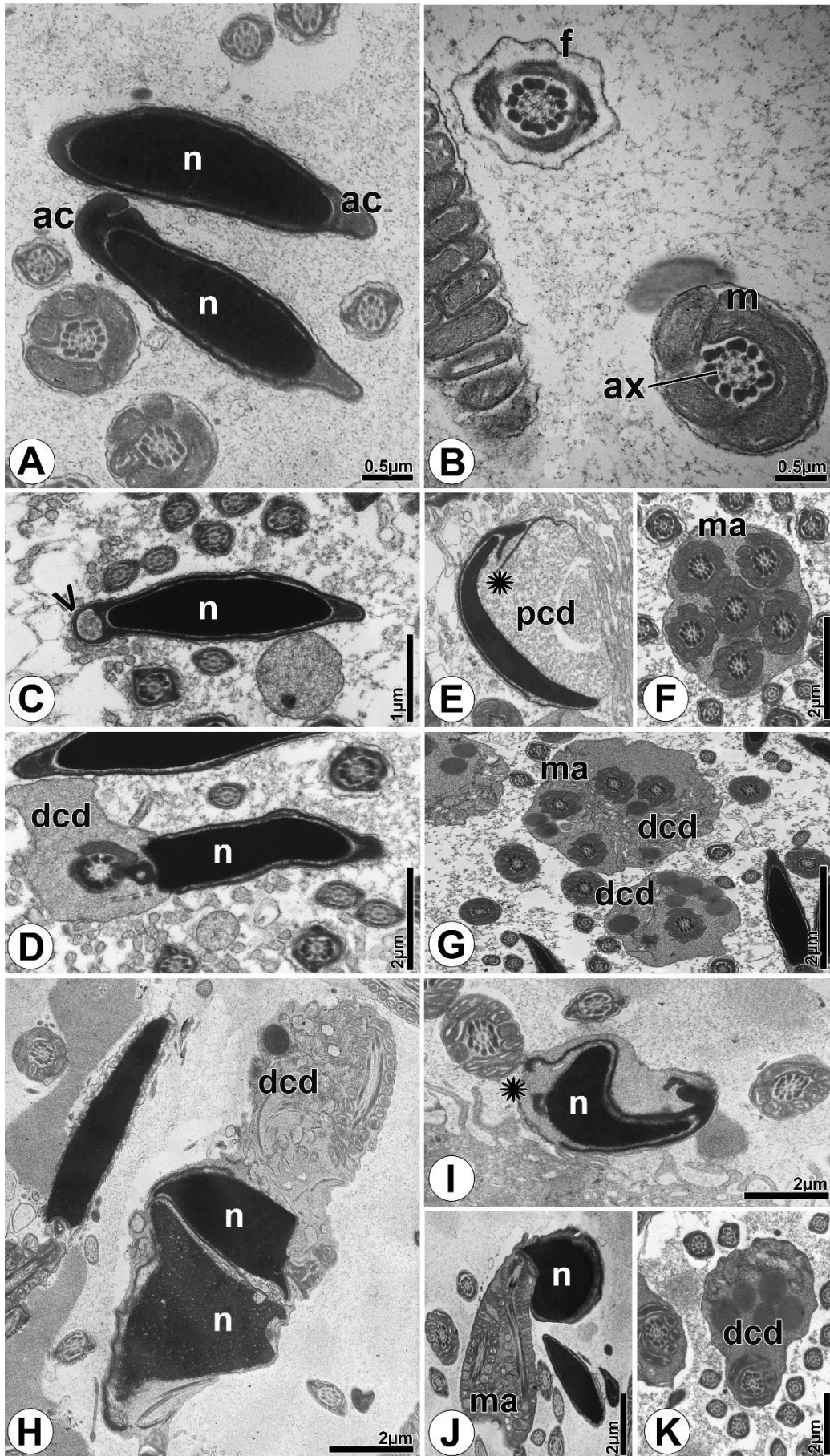


Figure 6. Ultrastructure of the sperm changes observed in the epididymis caput of the control groups. (A-B): YG group. Sperms with nucleus (n), acrosome (ac) and flagellum (f), without alterations. (C-G): AG group. Spermatozoa with acrosomal droplet (arrowhead), acrosomal perforation (asterisk), multiple axonemes in the tail (ma), and proximal cytoplasmic droplet (pcd) and distal cytoplasmic droplet (dcd). (H-K): HfAG group. (H): Note spermatozoa with two nuclei in different stages of chromatin compaction; (I): acrosomal perforation (asterisk), and (K): distal cytoplasmic droplet (dcd).

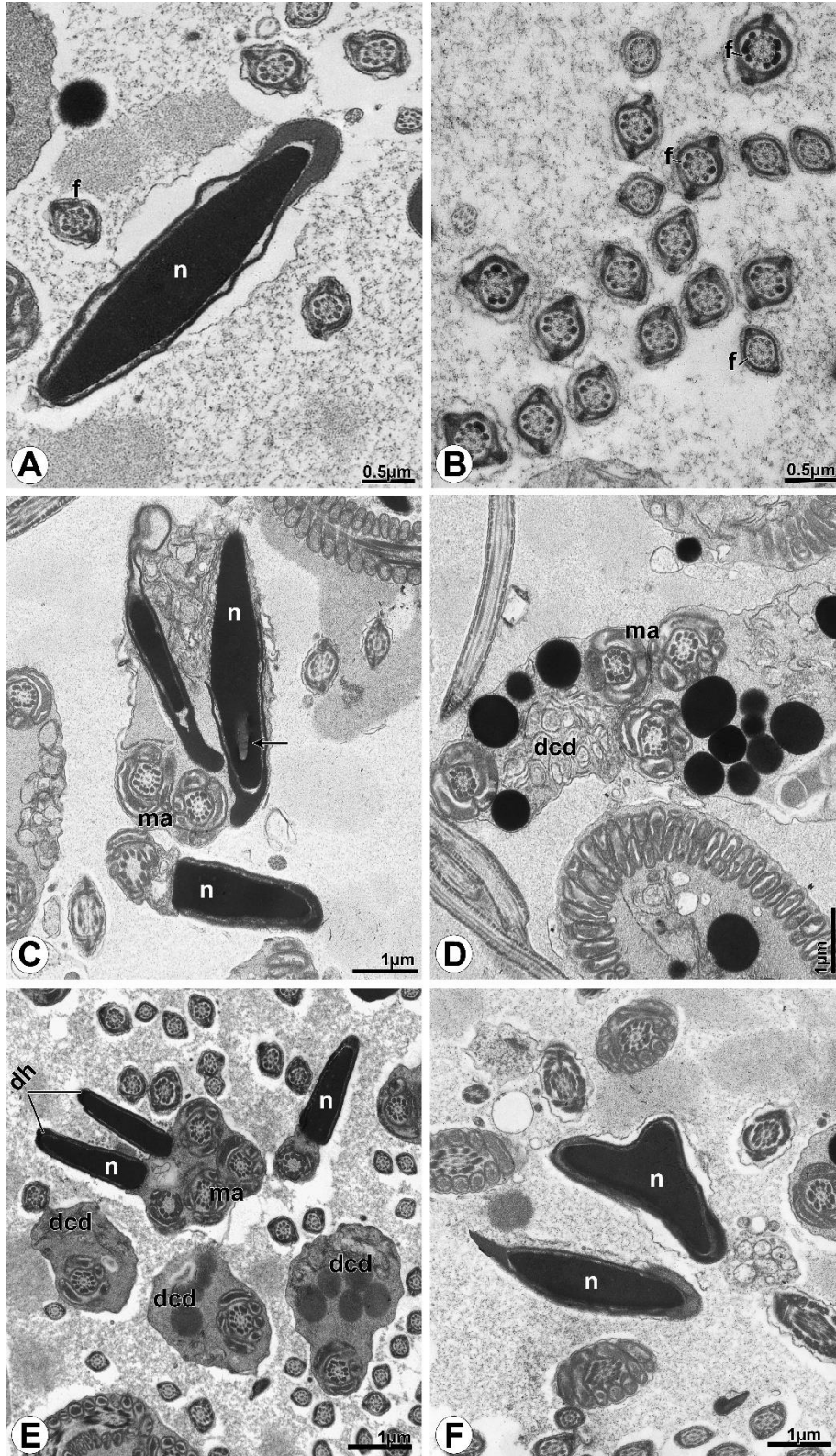


Figure 7. Ultrastructure of the sperm found in the epididymis cauda of the control groups. (A-B): YG group. Few sperm alterations, with nucleus (N), acrosome (AC) and flagellum (F), without anomalies. (C-D): AG group. Spermatozoa with abnormal chromatin condensation (short arrow), and multiple axonemes (ma) within a distal cytoplasmic droplet (dcd). (E-F): HfAG group. (E): Note multinucleated spermatozoa (dh) with multiple axonemes (ma), and distal cytoplasmic droplet (dcd). (F): Detail of the variation in nuclear shape.

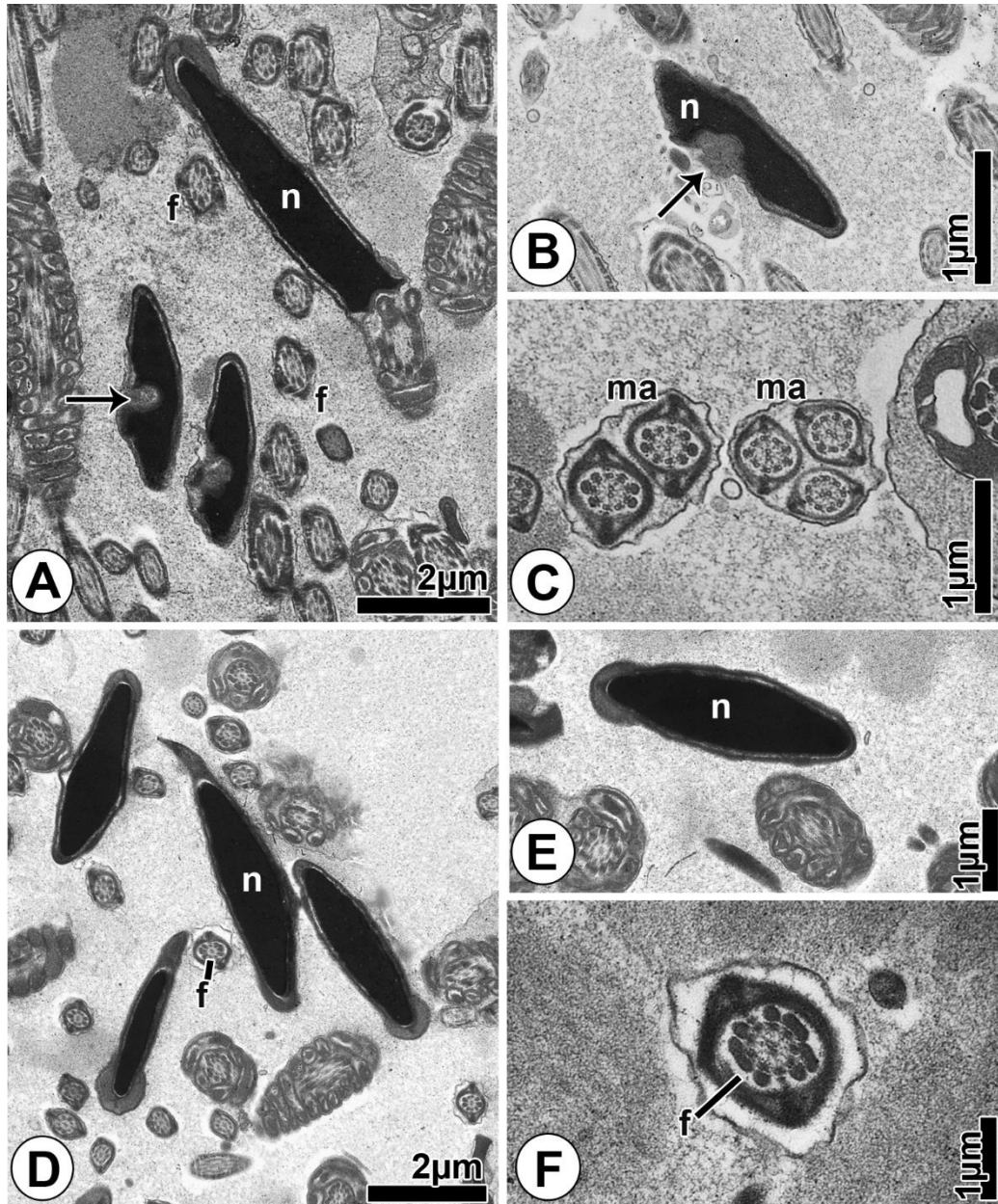


Figure 8. Sperm ultrastructure in the epididymis caput and cauda of the groups treated with PJE. (A-C): HfJAGI and HfJAGII groups. Note the nuclear perforations (arrow) and the presence of multiple axonemes (ma). (D-G): JAGI and JAGII. Sperm nuclei (n) and flagella (f) with few abnormalities.

Artigo Científico II

Jaboticaba Peel Extract Improves Epididymes Injured by Age and High-Fat Diet

Cuquetto-Leite, Livia^a., Lamas, Almeida Celina^a., Collares-Buzato, Carla^b., Maróstica Jr, Mário Roberto^c., Cazarin, Cínthia Betim^c., Cagnon, Valéria Helena^a., Dolder, Heidi^a.

^a Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

^b Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

^c Department of Food and Nutrition, School of Food Engineering, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

E-mail Address: livia.cuquetto@gmail.com (Cuquetto-Leite L.*), celina.lamas@gmail.com (Lamas C.A.), collaresbuzato@gmail.com (Collares-Buzato C.B.), mmarostica@gmail.com (Maróstica Jr. M. R.), quitete@unicamp.br (Cagnon V.H.A.), dolder1207@gmail.com (Dolder H.).

Highlights

- Aging has led to a series of histopathological epididymal alterations.
- High-fat diet aggravated some epididymal conditions already altered by aging.
- The Jaboticaba Peel Extract has shown a strong recuperative effect for the epididymis.
- Epididymis ultrastructural and functional changes occur in a segment-specific manner.

Abstract

This research investigated the effect of patented jaboticaba peel extract (PJE), on the epididymis of aged and/or high-fat-fed mice, focusing on pathological and hormonal alterations. This experiment used 70 male FVB mice distributed as follows: YG (juvenile; 3 months), AG (senile; 11 months), HfAG (senile+high-fat diet), JAGI (senile+2.9g PJE/Kg), HfJAGI (senile+high-fat diet+2.9g PJE/Kg), JAGII (senile+5.8g PJE/Kg) and HfJAGII (senile+high-fat diet+5.8g PJE/Kg). The changes caused by both aging and high-fat diet occurred differently in each epididymal segment. Aging and overweight due to the chronic consumption of high-fat diet caused alterations, observed ultrastructurally, that include epithelial intercellular separations, thickening of the basement membrane, accumulation of lipofuscin granules, alteration of the lysosomal-endosomal cycle throughout the epididymis, with accumulation of giant vacuoles in the cauda principal cells. Otherwise, in the caput, the JPE favored the reduction of epithelial microvacuolization, single cell necrosis, luminal cell debris, cardiomegaly and inflammatory infiltrate in the HfJAGI and HfJAGII groups. For the cauda, JPE favored the reduction of single cell necrosis and inflammatory infiltrate in all the treated groups. In the caput, the JPE favored the reduction of epithelial microvacuolization, single cell necrosis, luminal cell debris, cardiomegaly and inflammatory infiltrate, in the HfJAGI and HfJAGII groups. In addition, this treatment favored the reduction of luminal cell debris and clear cell hypertrophy, in JAGI, JAGII, and HfJAGII. Epithelial microvacuolization was reduced in the HfJAGI and HfJAGII groups, while the cribriform modifications were significantly reduced in JAGII, HfJAGI and HfJAGII. The apoptotic index decreased in all groups treated with JPE in the caput region, whereas in the cauda this index increased in these groups compared to the AG and HfAG groups. AR level increased in all groups treated with JPE, whereas levels of Aromatase and ER α increased significantly in JAGII and was reduced in HfJAGI and HfJAGII. With extract treatment, the level of PCNA was significantly reduced in all groups treated with JPE. So, aging and overweight led to ultrastructural changes, which resulted in functional epididymal problems. Also, PJE intake favored recovery of epididymal homeostasis of aged and overweight mice. Whereupon, PJE exerted an important effect on hormonal regulation and epididymal restructuring, making this therapy a viable one to better damage associated with aging and overweight.

Keywords: Jaboticaba Peel Extract; Male reproductive system; Overweight; Senescence.

1. Introduction

The development of structural alterations of the male reproductive tract during aging is closely associated with endocrine changes, especially steroidogenesis (Perheentupa and Huhtaniemi, 2009), a process that is controlled by gonadotrophins (LH and FSH) and testosterone as well as by autocrine factors (Carreau et al., 2011). Previous studies in rodents have demonstrated a reduction in serum and intratesticular testosterone levels resulting from impairment of steroidogenesis during aging (Perheentupa and Huhtaniemi, 2009, Banerjee et al., 2012). According to Chen et al. (2009), aging attenuates GnRH release by the hypothalamus, due to the reduction of its hypothalamic gene expression (Gruenewald and Matsumoto, 1991), associated to diminished testicular expression of GnRH (GnRH-R) receptors, which impairs testicular responsiveness to LH pulses and reduces negative androgen feedback.

The epididymis is regulated by androgens and estrogens via signaling through androgen receptor and multiple estrogen receptors. Additionally, the epididymis expresses 5 α -reductase to locally produce dihydrotestosterone (DHT). According to Robaire and Hamzeh (2011) testosterone and DHT signal through the androgen receptor, which is expressed throughout the epididymis in many species, including rats and mice. Estrogens, such as estradiol, may signal through two nuclear receptors, estrogen receptor alpha (ER α) and estrogen receptor beta (ER β), or through a G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) (Davis and Pearl, 2018).

On the other hand, androgens and their receptors are involved in regulating many epididymal functions, including epithelial cell morphology and cellular apoptosis (Fan and Robaire, 1998; Ezer and Robaire, 2002). Epididymal protein expression and secretion are also regulated by androgens (Syntin et al., 1999). Compared to the effects of androgens on epididymal function, the role of estrogen has only more recently begun to be understood. Estrogens have been demonstrated to regulate efferent duct fluid reabsorption, cauda sperm motility, and luminal fluid parameters (Joseph et al., 2010, Cooke et al., 2017). Therefore, both androgens and estrogens are essential for male reproductive structure and fertility. Nevertheless, although the expression of androgen and estrogen receptors is relatively well known in the epididymis of young and adult individuals (Zaya et al., 2012; Martinez-Traverso and Pearl, 2015), little is known about the effect of aging under these parameters. Only Davis and Pearl (2018) have reported that in aging Sprague-Dawley male rats there was no significant variation in ER α / β expression in the epididymis when compared to adult animals. In concordance, a few other studies were conducted involving the expression of androgen receptors (AR). Robaire et al. (2006) associated the progression of senescence with reduction in the expression of the AR ligand and consequently the AR in the epithelial cells of the Wistar rat epididymis. Meanwhile, Bhanmeechao et

al. (2018) observed that aging results in a reduction of testosterone synthesis, and therefore, lower expression of AR, accompanied by ER α , in the epididymis of dogs.

During aging, the variations in the hormonal signaling pathways discussed above, corroborate the development of epididymal histopathological changes. However, few studies have addressed this type of outcome in their research. Thus, Serre and Robaire (1998) reported an increase in basement membrane thickness in the epididymal epithelium of Brown Norway rats, accompanied by the emission of basal pseudopodia by epithelial cells. They also highlighted the increase of halo cells infiltrated in epididymal epithelium, and the large accumulation of lipofuscin granules throughout the epithelial extension. On the other hand, Kempinas and Klinefelter (2014) emphasized intense variations in tubular height, due to epithelial hyperplasia, in elderly Wistar rats.

Overweight and obesity have become major public health problems, and the prevalence of related chronic diseases is increasing throughout the world (WHO, 2018). In 2016, more than 1.9 billion adults aged 18 years and older were overweight. Of these over 650 million adults were obese. The worldwide prevalence of obesity nearly tripled between 1975 and 2016 (WHO, 2018).

It has often been observed that the degree of overweight influences the intensity of male hormonal imbalance, favoring a reduced hormonal profile for testosterone and LH, and a high estradiol profile (Wang et al., 2005; Viguera-Villaseñor et al., 2011). According to Vermeulen et al. (1996), this imbalance is due to the overexpression of aromatase in obese or overweight individuals, since the increased activity results in high aromatization of testosterone into estradiol, affecting the entire hypothalamic-pituitary-gonadal axis. Marchiani et al. (2015) associated the ingestion of a high-fat diet with the increase in AR expression in rabbit epididymis, in addition to the increase in sperm DNA fragmentation. In turn, Viguera-Villaseñor et al. (2011) reported no change in AR epididymal levels in Sprague-Dawley male obese rats. However, they related the increase in epididymal apoptotic index to the ingestion of a high-fat diet, given the increase in the expression of *Bax* and *BCL2* genes in obese individuals. Finally, it is worth mentioning that these factors contribute to the development of epididymal physiological disturbances, affecting negatively the sperm morphology by favoring the production of spermatozoa with caudal alterations (Yeung et al., 2009; Marchiani et al., 2015).

Despite extensive knowledge about the relationship between chronic ingestion of high-fat diet with metabolic damage in various organs, there are no studies in the literature that address the morphological and morphometric alterations in the epididymis of overweight individuals.

Dietary polyphenols are mostly known for their antioxidant properties and have been studied in a variety of clinical settings to determine whether these compounds bestow anti-inflammatory activity in humans, as well (Joseph et al., 2015). Fruits can act as relevant source of bioactive compounds, mostly concentrated in the peel (Lenquist et al., 2012). Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*

(Vell.) Berg) is a berry typical of the Brazilian *cerrado* (a savanna-like biome), whose peel is rich in phenolic compounds, specially flavonoids and anthocyanins. Research with animals, both *in vitro* (Giménez-Bastida et al., 2012; Varshneya et al., 2012; Lenquiste et al., 2015) and *in vivo* (Lenquiste et al., 2012; Dragano et al., 2013; Batista et al., 2014; Lenquiste et al., 2015; Lamas et al., 2018), support the proposition that polyphenols have an expressive potential to alter disease risk profiles in humans through their ability to modulate various biological pathways. Recently, Lamas et al. (2018) reported that the Patented Jaboticaba peel Extract (PJE)(ou JPE?), developed by our research group, displayed a higher antioxidant property associated to a higher phenolic content in comparison to other jaboticaba peel extracts (Lenquiste et al., 2012; Dragano et al., 2013; Lenquiste et al., 2015). In addition, the PJE administration resulted in a reduction in dyslipidemia, accompanied by an increase in HDL cholesterol levels, besides preventing liver steatosis and prediabetes in senile mice fed with the High-fat diet (Lamas et al., 2018).

Therefore, taking into consideration the potential therapeutic effect of the Patented Jaboticaba peel Extract, the few studies involving epididymal alterations, as well as the deleterious effects of overweight and/or ageing to the male reproductive system, the objective of this research was to evaluate the histopathological and ultrastructural changes of the epididymis, as well as the tissue hormonal alterations in response to overweight and aging.

2. Material and Methods

2.1. Patented Jaboticaba peel Extract (PJE)

The method used to prepare the PJE was patented and can be found in detail in Lamas et al., (2018). The PJE bioactive compounds determination and their *in vitro* antioxidant activity were previously described (2018).

2.2. Animals and experimental design

The study was carried out using a total of 70 male FVB mice, obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation on Laboratory Animal Science of the University of Campinas (UNICAMP), Brazil. All the experimental procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use of UNICAMP/Protocol: #4038-1.

The animals were randomly distributed in the following experimental groups (n=6 animals/group): Young group (YG), 3-month-old mice, receiving the PJE vehicle (water) daily by gavage and a standard diet (Nuvital CR1, Colombo, Paraná, Brazil) (composition: 22 g% protein; 53 g% carbohydrate; 4.5 g% lipid; 20.5 g% fibers and mineral salts and 2.9 kcal/g); Aged group (AG), 11-month-old mice, receiving the PJE vehicle daily by gavage and the standard diet; High-fat diet

group (HfAG), 11-month-old mice, receiving the PJE vehicle daily by gavage and a high-fat diet (20 g% protein; 50 g% carbohydrate; 21 g% lipid; 9 g% fibers and mineral salts and 4.5 kcal/g); Aged/PJE I group (JAG I), 11-month-old mice, receiving PJE (2.9 g PJE/Kg body weight) daily by gavage and the standard diet; Aged/PJE II group (JAG II), 11-month-old mice, receiving PJE (5.8 g PJE/Kg body weight) daily by gavage and the standard diet; High-fat diet/PJE I group (HfJAG I), 11-month-old mice, receiving PJE (2.9 g PJE/Kg body weight) daily by gavage and high-fat diet; High-fat diet/PJE II group (HfJAG II), 11-month-old mice, receiving PJE (5.8 g PJE/Kg body weight) daily by gavage and high-fat diet. All groups had free access to drinking water and their respective diets, either the standard or the high-fat diet, according to the specificity of each group.

The treatments lasted 60 days. The animals were housed one per cage, with a 12h light-dark cycle; water and food were provided *ad libitum*. The diets and PJE doses were determined based on a previous research by our group (Lamas *et al.*, 2018). After the treatment period, the mice were weighed on a semi analytical scale (Marte AS 5500 – São Paulo, Brazil), anesthetized with xylazine hydrochloride (5 mg/kg i.m.; König, São Paulo, Brazil) and ketamine hydrochloride (60 mg/kg i.m.; Fort Dodge, Iowa, EUA). The animals were submitted to euthanasia by increasing the anesthetic level. After anesthesia, the chest cavity was opened. The right epididymes were removed, weighed with an analytical scale (Ohaus®, Barueri, São Paulo, Brazil), and processed for histopathological and stereological analyses. A small part from caput and cauda right epididymis was separated for electron microscopy processing. The left epididymes were collected for processing of TUNEL assays. Other right epididymes were collected and frozen at -80°C for Western-Blotting analyses.

2.3. Tissue preparation for light microscopy analysis

After removal, the right epididymes were fixed by immersion with Karnovsky fixative [5% glutaraldehyde, 2,5% paraformaldehyde 0.2M in sodium phosphate buffer (pH 7.2)] for 48 hours. After that, they were submitted to increasing alcoholic dehydration, followed by overnight resin infiltration, and were included in glycol methacrylate (Leica® Historesin Kit). They were sectioned with the microtome (*Leica RM2255*) at 3 µm of thickness and stained with Hematoxylin and Eosin (HE) (Junqueira *et al.*, 1979). Subsequently, the material was photographed under the Olympus BX41 Light microscope attached to the Olympus Q Color 3 digital camera.

Meanwhile, the left epididymes were fixed by immersion with 4% paraformaldehyde solution [diluted from concentrated aqueous solution of 20% paraformaldehyde, 2% sucrose in sodium phosphate buffer (pH 7.2)]. Subsequently, the specimens were diaphanized in an alcohol/xylol solution, followed by Xylol solutions for two hours and embedded in paraffin and plastic polymer (Paraplast

Plus, St. Louis, MO, USA). They were sectioned with the microtome (*Leica RM2255*) at 5 μm of thickness and, finally, separated for TUNEL assays.

2.4. Determination of Absolute and Relative Weight of Organs

The absolute weights of right epididymis were initially determined by means of an analytical balance (Ohaus®, Barueri, São Paulo, Brazil).

For the calculation of the relative weights, the absolute weights and the body weights of the animals were considered (body weight/body weight \times 100). This measurement is called the Epididymisomatic Index (EI).

2.5. Morphometry and Stereology of Epididymis

2.5.1. Volumetric proportions (%) of the compartments in the head and tail of the epididymis

These proportions were estimated from the count of 1000 points (per animal) in 10 random fields. The images were captured under an Olympus BX41 Light microscope attached to the Olympus Q Color 3 digital camera using Image-Pro Plus 6.0 software. For this, a reticulated grid was employed, and images captured at over 200 x. The elements quantified were the tubules and intertubular space.

2.5.2. Tubular and luminal diameter and height of the epithelium in the caput and cauda of the epididymis

The tubular and luminal diameters, per animal, were obtained from the random measurement of 15 transverse sections of tubules with as circular a contour as possible in each region of the epididymis. Tubular and median luminal diameters are represented by the mean of two diametrically opposed measurements. In the same sections used to measure the tubular diameter, the height of the epithelium was measured, excluding stereocilia. The mean height of the epithelium of each tubule corresponds to the average of four diametrically opposed measurements. The luminal diameter was obtained by subtraction of the tubular diameter by the height of the epithelium.

2.6. Histopathological quantification

The quantified elements were classified, according to Creasy et al. (2012) and Kempinas and Klinefelter (2014) studies, in seven histopathological categories: (1) Cariomegaly; (2) Clear cell hypertrophy; (3) Cribriform change; (4) Epithelial microvacuolization; (5) Inflammatory infiltrate; (6) Luminal cell debris; (7) Single cell necrosis. The quantification was estimated from the count of 2500 points (per animal) in 5 random fields. The images were captured with an Olympus BX41 Light microscope attached to the Olympus Q Color 3 digital camera using Image-Pro Plus 6.0 software. For

this, a reticulated grid was used, and images were captured at over 200 x.

2.7. Epididymis Ultrastructure in Transmission Electron Microscope

Epididymis fragments initially fixed with Karnovsky were sectioned and subsequently part of the small blocks remained for 24 hours in a solution of 0.2M phosphate buffer, 5% glutaraldehyde and 2% sucrose. Thereafter, they were washed in the respective buffer and post-fixed in 1% osmium tetroxide for three hours at room temperature. To complete the process, epididymis blocks were dehydrated in an increasing series of acetone (50 to 100% for 10 minutes each), infiltrated in resin/acetone solution bath and included in Epoxy resin at 60°C for 72 hours for polymerization. Ultrathin sections (70 nanometers thick) were made with a Ultracut UCT LEICA ultramicrotome and were placed on 300 mesh copper grids. They were contrasted in solutions of 2% aqueous uranyl acetate and 0.1% lead citrate. Subsequently, these sections were analyzed and photographed in the LEO 906 transmission electron microscope at the Electronic Microscopy Center of the Biology Institute of State University of Campinas, São Paulo (UNICAMP).

2.8. Protein extraction and Western Blotting for the hormonal signaling pathway

Epididymis samples (n=6 animals/group), previously frozen at -80°C, were homogenized by a Polytron homogenizer (Kinematica Inc., Lucerne, Switzerland) in a RIPA extraction buffer (Millipore, Temecula, CA, USA), with a protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). An aliquot of each sample was obtained to determine protein concentration using Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), and 30 µg of protein was established for testicle and epididymis. These samples were mixed (in a 1:1 ratio) with 3X sample buffer (100mM Tris-HCl pH 6.8, 10% β-mercaptoethanol, 4% SDS and 20% glycerol), incubated in a 95°C dry bath for 5 minutes. The extracted content was applied in SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions then transferred to nitrocellulose membranes (Amersham). Subsequently, the membranes were blocked with bovine serum albumin (BSA: 1-3%), diluted in T-TBS buffer for 1h and incubated overnight with the primary antibodies diluted in 1% BSA solution: β-actin (mouse monoclonal; sc-81178, Santa Cruz Biotechnology); AR (mouse monoclonal, sc-7305, Santa Cruz Biotechnology; dilution 1:350 for both organs); ERα (rabbit monoclonal, ab32063, Abcam; dilution 1:500 for the testis and 1:350 for epididymis); PCNA (mouse monoclonal, ab29, Abcam; dilution 1:500 for both organs); and Aromatase (rabbit polyclonal, ab18995, Abcam; dilution 1:350 for both organs). The membranes were then washed in T-TBST buffer and incubated for 2h with the secondary antibodies diluted in 1% BSA solution (dilution range of 1:5000–1:6000): anti-mouse (W4021 – Promega) or anti-rabbit (W4018 – Promega). The membranes were incubated with the chemiluminescence solution (Pierce

Biotechnology Western Blotting) for 5 minutes and the blots were captured using the G-Box Chemi associated with the GeneSnap (Syngene, Cambridge, UK) image acquisition software. β -actin was used as an endogenous control. The labeling intensity was identified by densitometry using the Image J software (USA).

2.9. TUNEL Assay

Testicular cell apoptosis was measured using a TUNEL assay kit (n° G7360; Promega) according to the manufacturer's protocol. To assess testicular cell apoptosis, 100 different tubules were selected randomly from each group (10 tubules/rat) and observed at a magnification of 400 \times . To determine the apoptotic cell index (AI), the percentage of labeled epithelial cells was calculated in 10 tubules for each mouse.

2.10. Statistical Analyses

The statistical analyses of the results were performed using the Student's t-test to compare a pair of data or the variance analysis (One-Way ANOVA) followed by Tukey's Multiple Range Post-Test for multiple comparison. The significance limit was set at $p < 0.05$ and the data were expressed as mean \pm standard deviation. All the statistical analyses were performed by GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1. Biometric evaluation

Among the AG, JAGI and JAGII groups, the EI was increased in JAGI compared to AG, and, decreased in JAGII compared to JAGI. When comparing HfAG, HfJAGI and HfJAGII an increase of this index was observed in the groups treated with PJE over the HfAG. Regarding the absolute weight of epididymis, there was a significant increase of this parameter in HfAG compared to AG. Among PJE treated groups, the absolute epididymis weight was increased in JAGI as opposed to AG as well as HfJAGI in relation to HfAG. In the JAGII and HfJAGII groups, this measure showed a significant reduction when compared to JAGI and HfJAGI, respectively (These data are displayed in **Table 1**).

3.2. Morphometric evaluation

In the caput region, tubular diameter decreased significantly in AG compared to YG, and increased for HfAG in relation to AG. Among aged groups treated with PJE, JAGI and JAGII, there was an increase in tubular diameter in both, when compared to the AG group. For the groups HfAG, HfJAGI and HfJAGII, it was significantly increased in HfJAGI compared to HfAG. The height of the tubular epithelium did not show significant differences between the control and treated groups.

In the cauda region changes in the height of the tubular epithelium were observed between some of the groups analyzed. In AG, epithelial height increased significantly in relation to YG. In HfAG, this parameter was reduced, compared to the AG group. Among JAGI, JAGII, HfJAGI and HfJAGII there was no significant difference in the tubular epithelium height. Regarding the tubular diameter, there were no significant differences between the control groups. Among the treaties, there was an increase in tubular diameter for JAGII compared to JAGI. Similarly, the tubular diameter increased in HfJAGII compared to its control, HfAG.

All these data are plotted in **Table 1**.

3.3. Volumetric proportion of epididymis' caput and cauda compartments

In the caput region, the tubular epithelium had a significant reduction in the HfAG group compared to the AG. JAGI and JAGII showed no significant changes in epithelial proportions, among themselves and in the AG group. Otherwise, the tubular epithelium proportion underwent an increase in HfJAGI and HfJAGII in relation to HfAG. For the tubular luminal proportion, a significant reduction was found for AG compared to YG. In this parameter, HfAG showed an increase in relation to AG, as did the JAGI and JAGII groups. Finally, the interstitial compartment decreased in the AG group compared to the YG, in addition to increasing in HfAG, when it is compared to the AG. Among the treatments, a significant increase in this parameter was observed for JAGI in relation to AG, as well as a reduction in HfJAGII compared to the HfAG control group.

The cauda region was also marked by stereological variations between the groups analyzed. Increased tubular epithelium was observed in AG group in relation to YG, as well as in JAGI when compared to AG. For JAGII the epithelium proportion was reduced in relation to JAGI. The lumen was marked by a significant reduction in its proportion for the AG group compared to the YG, in addition to an increase in HfAG in relation to the AG. Finally, the interstitial compartment was significantly increased in AG compared to YG and reduced in HfAG, when compared to AG group. Among the PJE treated groups, there was a significant reduction of this parameter for JAGI in relation to the AG, as well as for HfJAGI and HfAG. In addition, an increase of the interstitial compartment was observed in HfJAGII compared to HfJAGI.

This entire category of data is organized in **Table 2**.

3.4. Light Microscopy and Histopathological Characterization

Typical tissue morphology was found in the entire epididymis structure of young animals analyzed (**Figures 1A1-1A3; 2A1-2A3**). Epithelial cells were organized in a pseudostratified columnar arrangement, with their respective nuclei located at their cellular base (**Figure 1A1**). In the apical portion of the tubular epithelium, stereocilia were observed oriented towards the tubular lumen containing spermatic cells (**Figure 1A1**). However, in other groups some histopathological changes were observed (**Figures 1B1-1B3; 1C1; 2B1-2B3; 2C1-2C3**).

In the epithelium of the cauda region of AG and HfAG groups, the tubular epithelium showed hyperplasia in numerous portions of its extension, which favors a deformed aspect of the tubules, classified as cribriform change (**Figures 2B1; 2C1**). In addition, there was significant epithelial microvacuolization, in order to alter the height of the tubular epithelium in the portions of greater vacuolar accumulation in comparison to the tubular areas without this alteration (**Figures 2B3; 2C2**). Moreover, some of these vacuoles have developed into tubular intraepithelial cysts, a character known as macrovacuolization (**Figure 2C3**). In both AG and HfAG, inflammatory infiltrates were distributed in restricted regions of the interstitial compartment (**Figure 2C1, inset**), as well as clear cell hypertrophy in the cauda tubular epithelium (**Figure 2C1**). In AG, there was a frequent luminal accumulation of germ cells and other cellular debris along the epididymal extension (**Figures 1B1, inset; 2B1**).

In the entire epididymis structure of HfAG group, the luminal accumulation of cellular debris occurred in a smaller proportion when compared to the AG group. In AG and HfAG, several of these changes were predominated in the cauda region when compared to their caput (**Figures 1B1-1B3, 1C1; 2B1-2B3, 2C1-2C3**).

In the groups treated with PJE, the histopathological changes observed in the control groups occurred to a lesser extent (**Figures 1D1-1G2; 2D1-2G1**). The apparent reduction in germ cells, desquamation and inflammatory infiltration along the epididymis and the diminished clear cell hypertrophy in the caudal region were some of the differences found between control groups and their treated counterparts (**Figures 1D1-1G2; 2D1-2G1**).

3.5. Histopathological Quantification

3.5.1. Caput Region

Aging led to histopathological changes such as increased single cell necrosis and inflammatory infiltrates. The aged animals that ate a chronic high-fat diet had a significant increase in the proportion of inflammatory infiltrates compared to aged animals. Treatment with JPE favored the reduction of

epithelial microvacuolization, single cell necrosis, presence of luminal cell debris, and inflammatory infiltrates in the HfJAGI and HfJAGII groups.

All these data are displayed in **Table 3**.

3.5.2. *Cauda Region*

Young animals have shown no significant variation in the quantification of histopathological characters.

Compared to the YG group, the AG group presented significant increase in cribriform changes, epithelial microvacualization, clear cell hypertrophy, luminal accumulation of cellular debris, presence of epithelial karyomegaly, as well as inflammatory infiltrates.

The HfAG animals, in relation to the AG, presented a significant increase of cribriform alterations, besides reduction in the luminal accumulation of cell debris.

Treatment with PJE has promoted a reduction in the proportion of single cell necrosis and inflammatory infiltrates in all treated groups. In addition, clear cell hypertrophy as well as accumulation of cell debris was reduced for the JAGI, JAGII, and HfJAGII groups. Cribriform changes were significantly reduced for the groups JAGII, HfJAGI and HfJAGII, and epithelial microvacuolization was reduced in the HfJAGI and HfJAGII groups. The frequency of cells in the condition of karyomegaly was reduced in JAGII.

These data are organized in **Table 3**.

3.6. *Analysis of Ultrastructural Changes*

3.6.1. *Epididymis Caput*

This region of the epididymis showed evident variations between groups. In YG individuals, an intact epithelium was observed, in which the principal cells were strongly united laterally with each other and basal cells, with clearly visible tight junctions. In addition, there was a strong basal connection with the basal membrane (**Figure 1A2**). A very evident nucleolus was observed, as well as well-developed Rough Endoplasmic Reticulum (RER), a Golgi complex (Gc) and many mitochondria (**Figures 1A2-1A3**).

AG animals have an epithelium with extensive intercellular separations, although the tight junctions were intact. In addition, this group also showed large separation *foci* at the cell-basal membrane contact, resulting in an irregular cell base (**Figures 1B4-1B5**). The principal cells have highly developed Smooth Endoplasmic Reticulum (SER), widely distributed throughout the cytoplasm, with only a few RER areas. Moreover, the cells exhibit accumulations of lipofuscin granules

in addition to large endosomal-lysosomal vesicles, laden with membranous material (**Figures 1B4-1B5**).

Among the HfAG individuals, the epithelium presented sites of separation, both at the intercellular and cell-basal membranes, except for the tight junctions, which remained intact. The principal cells show an accumulation of lipid droplets throughout the cytoplasm, in addition to lipofuscin granules with intense saturated fat agglomeration (**Figures 1C2-1C3**). In addition, stereocilia at the apical pole of principal cells are reduced.

The groups treated with patented jaboticaba peel extract showed relatively improved epithelial structure. The JAGI and JAGII animals exhibited an intact epithelium, with close cell-cell and cell-basal membrane contacts (**Figures 1D2-1D4; 1E3-1E5**). The principal cells have an evident nucleolus, besides a well-developed RER and CG, accompanied by few lipofuscin granules and absence of large vacuoles (**Figures 1D2-1D4; 1E3-1E5**). The HfJAGI and HfJAGII individuals also shared several characteristics, exhibiting an epithelium with tightly attached cells, both laterally and basally attached (**Figures 1F2-1F3; 1G3-1G4**). The HfJAGI also present, in some epithelial regions, basal intercellular separation sites (**Figure 1F2-1F3**). The principal cells have well-developed CG, with some isolated lipofuscin granules. In contrast, some HfJAGII epithelial regions have a few principal cells with large endosomal-lysosomal vesicles, especially near their apical portion (**Figures 1G3-1G4**).

3.6.2. *Cauda Region*

Among YG animals, the epithelium has close cell-cell and cell-basal membrane contacts. The principal cells have shown a cytosolic organization very similar to the caput region, with well-developed RER and CG, accompanied by extensive stereocilia, at the apical cell portion (**Figures 2A2-2A3**). The clear cells have a conventional ultrastructure, with large numbers of secretory vesicles and many mitochondria.

The AG group has shown an epithelial structure similar to the caput region, in addition to the principal cells presenting giant vacuoles and a large nuclear deformity, that is, nuclei with many basal recesses (**Figures 2B4-2B5**).

The HfAG individuals presented an epithelial disorganization similar to that reported for the epididymal caput, besides the presence of halo cells (**Figures 2C4-2C5**). A more intense accumulation of lipofuscin granules was observed, also in basal cells, and a high concentration of mitochondria, especially near the apical portion of principal cells (**Figure 2C4**). Moreover, there was a higher frequency of clear cells, which exhibited intense peripheral accumulation of lipofuscin granules and large lysosomal vesicles near the apical portion, accompanied by numerous mitochondria (**Figure 2C5**).

Among groups treated with the PJE, JAGI and JAGII groups have exhibited cell-cell and cell-basal membrane union, with clearly visible tight junctions. The principal cells have well-developed CG and RER, accompanied by a few exaggeratedly large lysosome vesicles, besides isolated lipofuscin granules and a high mitochondrial concentration (**Figures 2D2-2D3; 2E2-2E3**). Clear cells in the other groups have shown little lipid accumulation, together with a small number of lysosome vesicles, as seen in these two groups (**Figure 2D3**). The HfJAGI and HfJAGII individuals show considerable epithelial integrity, although a few cell separations were visible in some HfJAGI (**Figures 2F2-2F3; 2G2-2G3**). The principal cells have well-developed RER and CG, accompanied by a few giant vacuoles, as well as lipofuscin granules (**Figures 2F2-2F3; 2G2-2G3**).

3.7. Analysis of hormone pathway markers

3.7.1 Androgen Receptor (AR)

Between control groups, a significant reduction in AR concentration was observed for AG animals, when compared to YG; and a significant increase occurred in its marking in the HfAG group, when compared to the AG. Among the groups treated with PJE, there was a significant increase for JAGI, JAGII and HfJAGII individuals, compared to their respective controls, AG and HfAG. In addition, between the treated groups, HfJAGI and HfJAGII, a significant, dose-dependent increase in AR concentration was observed (**Figure 3A**).

3.7.2. Aromatase

The AG group showed a significant reduction of Aromatase concentration in relation to the YG. In contrast, the HfAG presented a significant increase when compared to the AG group. The treatment with PJE favored the increase of Aromatase in JAGII. It was reduced in HfJAGI and HfJAGII (**Figure 3B**).

3.7.3. Estrogen Receptor- α (ER α)

Among the control groups, the concentration of ER α has presented variable responses, being significantly reduced in AG, compared to YG; and higher in HfAG, in relation to AG. Treatment with PJE has favored a significant increase in ER α concentration for the HfJAGI and HfJAGII groups when compared to their controls, AG and HfAG, respectively. In addition, between SJI and SJII there was a significant dose-dependent increase in ER α concentration (**Figure 3C**).

3.7.4. Proliferative Nuclear Cell Antigen (PCNA)

The groups, AG and HfAG, have shown a significant increase in PCNA concentration, compared to their respective controls, YG and AG. Treatment with PJE have favored a significant reduction of PCNA in the treated groups, JAGI, JAGII, HfJAGI, and HfJAGII, in relation to AG and HfAG, respectively (**Figure 3D**).

4. Analysis of apoptotic index (TUNEL assay)

Aging promoted a significant increase in apoptosis index in the epithelium, in both, caput and cauda regions (**Figures 4A-O; 5A-O**). However, the HfAG group did not show significant increase of epithelial apoptotic cells when compared to the AG group, in both epididymis regions (**Figures 4A-O; 5A-O**). The caput and cauda epididymis have responded differently to PJE treatment. In the caput, there was a reduction of the apoptotic index in JAGI and JAGII when compared to the AG group, as well as in HfJAGI and HfJAGII in relation to the HfAG group (**Figure 4A**). In the cauda, there was an increase in apoptotic cell index in JAGII relative to AG and JAGI, as well as in HfJAGI and HfJAGII compared to the HfAG group (**Figure 5A**).

5. Discussion

The present study is the first that relates the effect of ageing and the high-fat diet intake on the epididymis and the repercussion of treatment with the Patented Jaboticaba peel Extract (PJE) treatment. We found that aging reduced the epididymal tubular diameter of AG group mice and reduced the protein expression of AR, ER α and aromatase, which resulted in the development of severe ultrastructural and histopathological changes in both the epididymal head and tail regions. This cascade of events involves a decrease in the androgenic stimulatory effect on secretory epithelium renewal, which reduces the cellular protective effect against apoptosis and results in a progressive reduction in epithelial functionality and an increase in the rate of cell death (Serre and Robaire, 1998; Jelinsky et al., 2007; Hamzeh and Robaire, 2009). However, numerous studies have already shown aging as one of the natural causes for progressive reduction in androgenic biosynthesis (Nielsen et al., 2007, Chen et al., 2009, Perheentupa and Huhtaniemi, 2009, Carreau et al., 2011). Thus, in the epididymis, hormonal androgen deprivation, both by natural causes and by intoxicating events, could result in epithelial apoptosis and a significant reduction of tubular diameter in all epididymal segments (Serre and Robaire, 1998; Hamzeh and Robaire, 2009).

The most notable histological changes in the epididymis have been documented through complete androgen deprivation induced by castration, testosterone-estradiol replacement, and

administration of EDS (Ethane-dimethanesulfonate) a potent agent toxic to Leydig cells. In addition, several chemical compounds have been shown to alter the structure and function of the epididymis (Kurowicka et al., 2015). However, very few studies have been done on morphometric alterations associated with aging. Only Serre and Robaire (1998) and Calvo et al. (1999) reported structural and ultrastructural changes due to aging in the epididymis of Brown Norway rats and hamsters, respectively.

According to Serre and Robaire (1998), in the epididymis of young animals, as the luminal volume increases, the epithelial height decreases, whereas the luminal proportion tends to reduce in time. This finding corroborates the stereological data generated by our study, in which the volume of the tubular lumen was reduced in both head and tail of the AG group. In addition, Serre and Robaire (1998) have also observed an increase in epithelial height accompanied by luminal reduction of the tubules located in the corpus and cauda epididymis. Garcia et al. (2012) have reported a reduction in tubular diameter as well as tubular luminal volume in the epididymis of mice with cryptorchidism associated with androgenic dysregulation. On the other hand, Hamzeh and Robaire (2009), when performing the surgical removal of the Sprague-Dawley rat's testicles, also reported reduction of luminal volume as well as tubular diameter for the cauda region. According to them, this reduction resulted in a decrease in intraluminal pressure, which favored the increase in tubular epithelial height of the caudal region, accompanied by luminal reduction. Similar results occurred in our research, considering that these luminal and epithelial variations were significant in the cauda region of the AG group. We believe that these characters indicate the organism's response to the progressive reduction of the spermatogenic process, due to the natural androgenic depletion of aging.

Although there are numerous descriptive studies on the epididymal histology of young and adult mammals, both in humans and rodents, few works are involved in the ultrastructural changes of the epididymis with aging (Cran and Jones, 1980; Robaire and Hermo, 1988; Serre and Robaire, 1998).

In this study, we observed that the epididymal ultrastructure is intensely modified by advancing age. Among the main alterations, the accumulation of lipofuscin granules, the presence of giant vesicles, and the irregularity of the basal membrane stand out. According to Serre and Robaire (1998), the presence of recesses in the basement membrane corresponds to pseudopodia emissions by the basal cells towards the membrane, in response to progressive decline in circulating testosterone and estradiol levels accompanied by basement membrane thickening, which occurs as age increases. In this way, the basal cells emit membrane extensions in order to increase contact with blood vessels, via basement membrane, and thus capture the missing amount of hormone for its regulation. In addition, it is believed that there is a decrease in proteolytic efficiency as age progresses, which leads to modifications in the

renewal of protein content of the basal laminae, thus contributing to its irregularity (Serre and Robaire, 1998).

The accumulation of lysosomal lipofuscin granules observed in the epididymal epithelium is more intense for aged animals and is considered a sign of progressive aging, as already reported by Serre and Robaire (1998). Lysosomes are characterized by containing hydrolytic enzymes responsible for the digestion of cellular organelles and extracellular products. Because of aging, lysosomes lose their proteolytic capacity, and therefore accumulate undigested material in the form of lipofuscin. It is now well established that lipofuscin accumulation progressively occurs with senility in post-mitotic cells of different tissue types from the retina to the kidneys (Weisse, 1995; Ivy et al., 1996; Serre and Robaire, 1998). Thus, lipofuscin is partly responsible for the cell's senescent phenotype and is then known as the "aging pigment" (Terman and Brunk, 1998).

Although lipofuscin accumulation is a multifactorial process, several studies have already shown the relationship of oxidative damage and the decline of intracellular degradation pathways as causal factors of aging (Ivy et al., 1996; Serre and Robaire, 1998; Jara et al., 2004). Increased oxidative stress, together with reduction in the proteolytic activity of lysosomal enzymes, is known to be directly associated with aging in both humans and rodents (Robaire and Hinton, 2001). Moreover, both factors are known to induce accumulation of lipofuscin in a wide variety of cell types (Banerjee et al., 1995; Serre and Robaire, 1998). In addition, Ivy et al. (1996) reported the accumulation of lipofuscin granules in renal proximal tubule cells during treatment with lysosomal enzyme inhibitors in young Wistar rats. Thus, we can speculate that the accumulation of lipofuscin in the lysosomal vesicles during aging may be a result of tissue oxidative stress. The impaired activity of the endogenous antioxidant system increases the accessibility of cellular organelles to attack by reactive oxygen species, in order to impair all intracellular functioning, including the synthesis and glycosylation of acidic lysosomal hydrolases, which ultimately interferes with lysosomal proteolytic activity.

Another characteristic observed in the epididymal epithelium of aged animals was the presence of giant vesicles in principal cells, especially in the cauda. However, only two studies have related the presence of these vesicles with aging, whereas no study has described the ultrastructural changes in the epididymis of aged overweight animals. Cran and Jones (1980) reported the occurrence of vacuoles, although small, in the main cells of the distal epididymal region of aged rabbits. Also, Serre and Robaire (1998) described the presence of giant vacuoles in principal cell cytoplasm in the cauda of Brown Norway rats, similarly to that seen in the AG group. The presence of these vesicles indicates a rupture of the cyclic endosomal-lysosomal system with advancing age (Serre and Robaire, 1998). In addition, Serre and Robaire (1998) noted the fusion of endosomal and lysosomal vesicles within large vacuoles of main cells, although they had well developed endoplasmic reticulum and Golgi complex.

Similarly, in the present study we observed the existence of large vacuoles with translucent content, as well as the fusion of endosomal vesicles, in the principal epididymal cells of AG mice. Thus, these events, associated with the higher concentration of dense lysosomes in comparison to the endosomes, suggest that the mechanisms of vesicular fusion control and endosomal maturation are impaired by cellular aging.

When analyzing the histopathology of the epididymis specific segments of the different groups, a series of alterations was evidenced in the AG group, both in histopathological characterization and quantification, these being more evident in the epididymis cauda.

Among the epididymal modifications observed, epithelial vacuolization, of the microvacuolization type, occurs predominately in the AG group and especially in the cauda region. This change is characterized by the accumulation of intracytoplasmic vacuoles in the apical cell portion, being directly related to aging in rodents (Creasy et al., 2012, Kempinas and Klinefelter, 2014). Vacuolization of the epididymal epithelium results from innumerable degenerative changes, among which the intracellular accumulation of fluids, glycoproteins, lipids and phospholipids are highlighted (Robaire et al., 2002). In animals of the AG group, vacuolization is mediated by the mixed accumulation of fluid, glycoproteins and lipids, whose retention is age dependent.

Another prominent feature noticed in the AG group was the significant increase in the accumulation of rounded germ cells in the lumen of epididymal cauda. Normally, testicular germ cell detachment and their consequent accumulation in the epididymal lumen of the caput and cauda regions occur in animals at peripuberal age due to the inefficiency of the first spermatogenic cycle. In contrast, this event may result, secondarily, from lesions in the testicular germinal epithelium, reflecting the continuous degeneration and testicular atrophy, which are caused by the androgenic decrease during aging as well as by the action of toxic agents (de Andrade et al., 2006; Kempinas and Klinefelter, 2014, Zhang et al., 2015).

According to Kempinas and Klinefelter (2014), the accumulation of luminal cell debris is closely associated with clear cell hyperplasia, since they are involved in the endocytosis of luminal components. Thus, under such conditions a greater number of lysosomes are required to enhance endocytosis and digestion of debris, which favors the hyperplastic condition of clear cells (Kempinas and Klinefelter, 2014). In fact, in the AG group the quantitative increase of luminal cell debris in the cauda region was accompanied by significant increase in clear cell hyperplasia.

Another histopathological characteristic significantly increased in AG animals was the cribriform changes, in the cauda. These are characterized by the folding and attachment of epithelial segments towards the tubular lumen, which were submitted to contraction (Foley, 2001). According to Kempinas and Klinefelter (2014), this invagination may act as a secondary response to luminal

reduction of sperm cells and testicular fluid, as well as to epididymal atrophy, which lead to disturbance of the epididymis microenvironment. However, according to Kempinas and Klinefelter (2014) this condition may have many causes and it is often associated with androgen depletion, aging, testicular atrophy and germ cell tumors.

In addition to these changes, we observed that aging reduced the protein expression of AR, ER α , and Aromatase in the AG group in relation to young animals. Despite the explicit importance of estrogen receptors in epididymal activity, since they act together with estrogens in regulating the expression of genes involved in transporting water and solutes to the epididymal lumen (Joseph et al., 2011), the variety of studies involving the ER α function in the epididymis is very small. In this context, only research with knockout mice for ER α has been performed (Mahato et al., 2000; Hess et al., 2003; Weiss et al., 2008; Lee et al., 2009; Joseph et al., 2010, 2011), and there were no studies of the effect of aging on the metabolism of estrogens in the epididymal environment. Eddy et al. (1996) have related the deficiency in ER α gene expression occurring in the epididymis in the case of male infertility, associated with low sperm motility as well as reduced sperm concentration in the epididymis cauda, as the mouse ages. Mahato et al. (2000) and Joseph et al. (2010), when studying germ cells in knockout mice for ER α , reported a direct relationship between absence of estrogen receptor α expression with changes in epididymal transit time and morphological abnormalities in spermatozoa. It is believed that such effects are due to defects in the luminal environment, hypo-osmotic and highly alkaline condition along the epididymis due to the absence of estrogen receptors, rather than the direct effect of defective spermatogenesis (Joseph et al., 2010).

Moreover, other studies associate segment-specific abnormalities in epididymal morphology with reduced ER α expression (Hess et al., 2000; 2011). According to Hess et al. (2011), this condition is closely associated with hyperplasia of clear and narrow cells, as well as the accumulation of granules and vacuoles inside them, as a result of the greater alkalinity of the lumen. In our experiment, AG individuals exhibited both histopathological changes similar to those described above and a significant reduction in epididymal ER α levels. This correlation is considered indicative of abnormal transport of ions and excessive endocytosis exerted by epididymal epithelium, since estrogen receptors help to control the cellular transport of water and ions.

All epididymal structure and functionality is known to be androgen dependent, so that its secretory and absorptive functions are closely dependent on androgen receptor (AR) regulation (Robaire and Hamzeh, 2011). The expression and activity of AR is modulated by endocrine and paracrine factors, secreted directly by the testes (Robaire and Hamzeh, 2011), which reach the epididymis through the luminal portion. Together with ERs, the activity of the ARs influences the entire luminal dynamics of the epididymis, furnishing a balance between the functionality of both

hormones, required for maintenance of a functional epididymis (Joseph et al., 2011; Robaire et al., 2006).

Following the reduction of ER α , the epididymal tissue of AG animals showed a significant reduction of AR and Aromatase. According to Gunes et al. (2016), senility causes a reduction in GnRH hormone secretion, which results in lower pulses of LH and testosterone, resulting in a lower density of RA and ER in target organs. Despite the importance of androgen receptors for epididymal activity, as well as its regulation with α -estrogen receptors, there are few studies involving its activity with epididymal aging (Robaire et al., 2006; Robaire and Hamzeh, 2011; Bhanmeechao et al., 2018). Robaire et al. (2006) associated the progression of senility with the reduction in the expression of the enzymes responsible for the conversion of testosterone to DHT (dihydrotestosterone), the ligand to AR; this process resulted in reduction of AR in the cells of the epididymal epithelium. In agreement, Bhanmeechao et al. (2018) have observed that aging results in a reduction in testosterone production, and, therefore, lower expression of AR, accompanied by ER α , in the epididymis of dogs.

Regarding the epididymal changes due to aging associated with the ingestion of high-fat diet, there are no studies, which highlights our research as being the first in this field. We observed that the HfAG animals have several aggravations of the structural and ultrastructural histopathological conditions exhibited by AG animals. HfAG animals exhibited a significant increase in the proportion of the tubular lumen in both the caput and the cauda, accompanied by an increase in the interstitial proportion of the caput and a reduction in the cauda region. These stereological changes were consistent with the histopathological changes, such as the increase of inflammatory infiltrates in the caput, as well as of the cribriform alterations in tubular epithelia of the cauda region.

Several times, the cribriform modification is associated with androgen depletion, aging, testicular atrophy, and germ cell tumors (Creasy et al., 2012, Kempinas and Klinefelter, 2014). Thus, the increase of this histopathological condition in the epididymis of HfAG mice indicates that the chronic ingestion of a high-fat diet by aged animals intensifies the pathologies naturally caused by aging.

Concerning the development of inflammatory infiltrates, the HfAG animals exhibited a significant increase of this condition in the caput region. The inflammatory process generally consists of the response to necrosis or tissue damage, which occurs secondary to rupture of the blood-epididymal barrier in the epididymis (Creasy et al., 2012, Kempinas and Klinefelter, 2014). Numerous degrees of inflammation have already been related to epididymal damage, ranging from focal to diffuse accumulation, with interstitial, epithelial and/or luminal coverage (Creasy et al., 2012). The inflammatory infiltrates correspond, to small focal accumulations of inflammatory cells, usually lymphocytes, neutrophils and plasma cells, in the epididymis interstitium as well as in the perivascular

space. Thus, the increase of inflammatory infiltrates in the HfAG group demonstrates the beginning of the imbalance in epididymal homeostasis caused by aging and its association with a high-fat diet (Foley, 2001; Jiménez-Trejo et al., 2007; Kempinas and Klinefelter, 2014).

On the other hand, in relation to the epididymal ultrastructure, the HfAG animals presented innumerable alterations in relation to the AG group. In the caput region, intense intercellular separation was observed, in addition to large expansion of smooth endoplasmic reticulum (SER), and large lipid accumulations together with the lipofuscin granules. These characters indicate that SER was being intensively required for lipid metabolism, considering this to be one of its main known functions (Junqueira and Carneiro, 2012), and that chronic ingestion of a high-fat diet may be affecting lysosomal functioning. The accumulation of lipofuscin in cells is already known to occur with the advancement of aging, due to lysosomal maldigestion (Ivy et al., 1996; Serre and Robaire, 1998). Thus, lipofuscin is known as the "aging pigment", and is considered partially responsible for the cell's senescent phenotype (Brunk et al., 1992; Terman and Brunk, 1998). The process of accumulation of lipofuscin is multifactorial, being also influenced by the increase of oxidative stress (Serre and Robaire, 1998; Jara et al., 2004). It is known that obesity is closely related to the activation and increase of local and systemic inflammatory processes (Angelopoulou et al., 2009; Adewoyin et al., 2017), by the synthesis of proinflammatory cytokines such as TNF α and IL-17. Otherwise, inflammation leads to an increase in the generation of reactive oxygen species, which overload the endogenous antioxidant activity, and consequently the increase of oxidative stress. Therefore, through this route, overweight affects all intracellular homeostasis, resulting, in the accumulation of lipofuscin granules filled with the lipid accumulations observed.

In the cauda region of HfAG animals, a higher increase of halo cells in the epithelium was noted. Previous studies have previously associated aging with a reduction in the ratio of principal, clear and narrow cells, and the increase in number of halo cells in a segment-specific manner (Serre and Robaire, 1998; Serre and Robaire, 1999). According to Serre and Robaire (1999) there was a segment-specific recruitment of cytotoxic T lymphocytes and monocytes-macrophages in the epididymal epithelium of aged Brown Norway rats whose epididymal lumen contained few spermatozoa. Thus, accumulation of damaged epithelial cells and antigens of germ cell origin, leaking through a dysfunctional blood-epididymis barrier, may contribute to the active recruitment of immune cells with age. However, in this study we did not observe presence of Halo cells in the epididymis of aged animals, but they occurred in aged animals that had chronic ingestion of the high-fat diet (HfAG group). Hence, we can affirm that feeding with high-fat diet and consequently the overweight impairs the structuring of blood-epididymal barrier, favoring the development of open spaces in the same, which would lead to the epithelial penetration of Halo cells in different segments.

As in AG animals, the HfAG presented, in the cauda region, an expressive quantity of giant vesicles in the cytoplasm of principal cells and in the intercellular space. However, there are no studies of epididymal ultrastructural changes due to chronic ingestion of high-fat diets, but only as a consequence of aging (Serre and Robaire, 1998). In this way, we can highlight that the rupture of the endosomal-lysosomal cyclic system, indicated by the presence of giant vesicles, promoted by the advancement of age (Serre and Robaire, 1998) is maintained and reinforced by overweight during aging.

Contrary to the investigations carried out in aged animals, there is no research data on the effect of obesity or overweight on the expression of AR, ER α/β , and Aromatase in the epididymis. The present data corresponds to investigations of Knockout mice for the isoforms of ERs and Aromatase in the testes of primates and rodents (Lubahn et al., 1993; Eddy et al., 1996; Hess et al., 1997; Robertson et al., 2002). Lambard et al. (2003; 2004) reported the expression of Aromatase and ER α / β on spermatids and spermatozoa present in the testis and semen of men of reproductive age. Thus, the Aromatase protein expression observed in the epididymis may be the sum of its expression occurring in both the epithelium and the maturing spermatozoa.

Many investigations have been made regarding the effect of polyphenol-rich compounds on the integrity of the male reproductive system (Zepeda et al., 2014; Lamas et al., 2015, 2017; Zheng-mei et al., 2015; Wang et al., 2016; Simas et al., 2017). However, most who take this approach focus on the effect of phenolic compounds on improvements in the endogenous antioxidant system as well as on sperm count and viability (Adewoyin et al. 2017). Lamas et al. (2017) reported that grape juice concentrate improved the ultrastructural integrity of the epithelium of both the epididymal head and tail, as well as the morphology and sperm count of Wistar rats intoxicated with cadmium chloride. Reddy et al. (2016) observed that the administration of resveratrol improved the endogenous antioxidant activity in the testis and epididymis as well as the sperm count and viability in Wistar rats contaminated with cisplatin. Similarly, Simas et al. (2017) observed that the administration of resveratrol improved the levels of nitric oxide and malonaldehyde in the reproductive tissues, as well as the sperm count and morphology in Wistar rats with type I diabetes. In turn, Zheng mei et al. (2015) reported that administration of phenolic compounds in obese mice reduced inflammation as well as oxidative stress levels in epididymal white adipose tissue.

Despite this, there are no studies on the effect of polyphenols on different epididymal parameters in aged animals under the effect of chronic ingestion of high-fat diet, emphasizing this as the first study with this focus. We observed that continuous administration of PJE in all groups favored the epithelial restructuring of both the caput and the epididymal cauda, improving intercellular junctions, cribriform alterations, reducing the number of prevailing vacuoles, as well as

microvacuolization, and the accumulation of luminal cell debris. In addition, PJE favored increased levels of AR, ER α and Aromatase especially in the old animals treated with the double dose of extract. In the aged animals treated with a high-fat diet and PJE, the extract contributed to the normalization of aromatase levels, as well as of AR and ER α , since the HfAG group presented an overexpression of Aromatase.

Regarding PCNA levels and apoptosis index, PJE treatment led to different results in the epididymal caput and cauda. In the caput region, the JAGI, JAGII, HfJAGI and HfJAGII groups showed a reduction in the apoptotic cell index, which was high in the AG and HfAG groups. On the other hand, in the cauda, there was a significant increase in the apoptotic index for the groups treated with PJE. These results were accompanied by a significant reduction in PCNA levels for the groups JAGI, JAGII, HfJAGI and HfJAGII.

Some studies have reported the antiproliferative effect of plants of the *Myrciaria* genus against different tumor cell lines (Leite-Legatti et al., 2012; Wang et al., 2014; Tietbohl et al., 2017). In all these researches, the plants used for the treatments had high phenolic content. It has been recognized that polyphenols are the main agents responsible for the "anti-cancer" effect of this type of treatment (Joseph et al. 2015). Leite-Legatti et al. (2012) reported that the frozen jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel is rich in ellagic acid, anthocyanins and volatile terpenes, capable of acting against leukemia proliferation (K-562 line), and prostatic neoplastic cells (PC-3 line). These phenolic compounds penetrate tumor cells and cause increased oxidative stress within them, which ultimately leads to their apoptosis (Leite-Legatti et al., 2012). Tietbohl et al. (2017) observed that the extract of guavaberry leaves (*Myrciaria floribunda*) has a greater antiproliferative effect against lineages of breast cancer tumor cells (MCF-7 line) when compared to its effect on normal cells. Similarly, Wang et al. (2014) showed that the water extract of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) seeds possesses appreciable antioxidant activity, besides inducing the apoptosis of oral carcinoma cells (HSC-3 line), by reducing survival levels, known to inhibit apoptosis by inactivation of the caspase pathway.

In a preliminary study by our research group, we have observed that the patented extract of jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba*) (PJE) has a high concentration of phenolic compounds (Lamas et al., 2018). In our present study, the reduction in epididymal levels of PCNA, together with the increase in the level of apoptotic cells in the cauda region in JAGI, JAGII, HfJAGI and HfJAGII groups, allows us to affirm that PJE presented a prominent anti-proliferative capacity, thereby assisting in combating cells potentially dangerous for the homeostasis of the epididymal microenvironment.

In addition, the treatment with the patented jaboticaba peel extract favored dose-dependent epididymal improvements in several parameters. JAGII exhibited increased tubular diameter in the cauda region as well as reduction in epithelial and tubular proportion. It increases the ER α level and

the apoptotic index compared to JAGI. Similarly, HfJAGII animals exhibited a significant reduction in epithelium and tubule proportion in the epididymis cauda, as well as an increase in AR level when compared to HfJAGI. Thus, considering the benefits of PJE that we observed in the present research, we encourage the use of this extract for human studies, since the life expectancy and the consumption of diets rich in processed fats has increased in the world population, in addition to the statistically significant delay of maternity and paternity.

6. Conclusion

Aging caused a series of histopathological and ultrastructural changes in the epididymis studied. In addition, a diet based on high-fat diet favored the worsening of many epididymal pathological conditions already developed by aging. In turn, we have seen that the patented jaboticaba peel extract (PJE) favored the recovery or normalization of the levels of androgen and α -estrogen receptor, aromatase, and the anti-proliferative action, as well as reducing epididymal epithelial cell hyperplasia. Consequently, these improvements resulted in greater integrity of the epididymal tissue, accompanied by the reduction of histopathological characters. Moreover, this study stands out as the first to analyze the action of antioxidant compounds, the PJE, on the epididymis, in general, and under conditions of aging and overweight. Therefore, we strongly recommend PJE as a chemiopreventative agent acting against epididymal cell proliferation, in addition to favoring the ultrastructural and histological recovery of this tissue.

Funding

This work was supported by the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq – 142329/2017-7) and the São Paulo Research Foundation (FAPESP – 2016/18201-0).

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to disclose.

References

- Adewoyin, M., Ibrahim, M., Roszaman, R., Isa, M.L.M., Alewi, N.A.M., Rafa, A.A.A., Anuar, M.N.N., 2017. Male infertility: The effect of natural antioxidants and phytochemicals on seminal oxidative stress. *Diseases* 5, 9-19. Doi: 10.3390/diseases5010009.
- Angelopoulou, R., Giagkos, L., Panagiota, M. 2009. ROS in the aging male: model diseases with ROS-related pathophysiology. *Reproductive Toxicol.* 28, 167-171. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.04.003>.
- Banerjee, P.P., Banerjee, S., Tilly, K.I., Tilly, J.L., Brown, T.R., Zirkin, B.R., 1995. Lobe-specific apoptotic cell death in rat prostate after androgen ablation by castration. *Endocrinol.* 136, 4368–4376.
- Batista, Â. G., Lenquiste, S. A., Cazarin, C. B. B., da Silva, J. K., Luiz-Ferreira, A., Bogusz, S., Maróstica, M. R., 2014. Intake of jaboticaba peel attenuates oxidative stress in tissues and reduces circulating saturated lipids of rats with high-fat diet-induced obesity. *J. Funct. Foods.* 6, 450-461. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.11.011>.
- Bhanmeechao, C., Srisuwatanasagul, S., Prapaiwan, N., Ponglowhapan, S., 2018. Reproductive aging in male dogs: The epididymal sperm defects and expression of androgen receptor in reproductive tissues. *Theriogenol.* 108, 74-80. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.011.
- Calvo, A., Pastor, L.M., Martínez, E., Vázquez, E.M., Roca, J. 1999. Age-Related changes in the hamster epididymis. *Anat. Rec.* 256, 335-346.
- Carreau, S., Bouraima Lelong, H., Delalande, C., 2011. Estrogens: New players in spermatogenesis. *Reprod. Biol.* 11, 174-93. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1642-431X\(12\)60065-5](https://doi.org/10.1016/S1642-431X(12)60065-5).
- Chen, H., Ge, R.S., Zirkin, B.R., 2009. Leydig cells: From stem cells to aging. *Mol. Cell. Endocrinol.* 306, 9–16. Doi: 10.1016/j.mce.2009.01.023.
- Cooke, P.S., Nanjappa, M.K., Ko, C., Prins, G.S., Hess, R.A., 2017. Estrogens in Male Physiology. *Physiol. Rev.* 97, 995–1043. Doi: 10.1152/physrev.00018.2016.
- Cran, D.G., Jones, R., 1980. Aging of male reproductive system: changes in the epididymis. *Exp. Gerontol.* 15, 93-101.
- Creasy, D. M., 2001. Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicol. Pathol.* 29, 64–76.
- Creasy, D., Bube, A., de Rijk, E., Kandori, H., Kuwahara, M., Masson, R., Rogerson, P., 2012. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system. *Toxicol. Pathol.* 40, 40-121. Doi: 10.1177/0192623312454337.
- Davis, K., Pearl, C.A., 2018. Effects of Estrogen Treatment on Aging in the Rat Epididymis. *Anat. Rec. (Hoboken)* 1, 1-11. Doi: 10.1002/ar.24004.
- De Andrade, S.F., Oliva, S.U., Klinefelter, G.R., Kempinas, W.G., 2006. Epididymis-specific pathologic disorders in rats exposed to gossypol from weaning through puberty. *Toxicol. Pathol.* 34, 730-7. Doi: <https://doi.org/10.1080/01926230600932455>.
- Dragano, N.R.V., Marques, A.C., Cintra, D.E.C., Solon, C., Morari, J., Leite-Legatti, A.V., Velloso, L.A., Maróstica-Jr, M.R., 2013. Freeze-dried jaboticaba peel powder improves insulin sensitivity in high fat-fed mice. *Br. J. Nutr.* 110, 447–455. Doi: 10.1017/S0007114512005090.
- Eddy, E.M., Washburn, T.F., Bunch, D.O., Goulding, E.H., Gladen, B.C., Lubahn, D.B., 1996. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinol.* 137, 4796-805.
- Ezer, N., Robaire, B., 2002. Androgenic regulation of the structure and function of the epididymis. In: Robaire B, Hinton BT, editors. *The epididymis: From molecules to clinical practice*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 297–316pp.
- Fan, X.P., Robaire, B., 1998. Orchiectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinol.* 139, 2128–2136.
- Foley, G.L., 2001. Overview of male reproductive pathology. *Toxicol. Pathol.* 29, 49-63.
- Garcia, P.V., Barbieri, M.F., Perobelli, J.E., Consonni, S.R., Mesquita, S. de F., Kempinas, W. de G., Pereira, L.A., 2012. Morphometric-stereological and functional epididymal alterations and a decrease in fertility in rats treated with finasteride and after a 30-day post-treatment recovery period. *Fertil. Steril.* 97, 1444-1451. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.03.025.
- Giménez-Bastida, J.A., González-Sarriás, A., Larrosa, M., Tomás-Barberán, F., Espín, J.C., García-Conesa, M.T., 2012. Ellagitannin metabolites, urolithin A glucuronide and its aglycone urolithin A, ameliorate TNF α -induced inflammation and associated molecular markers in human aortic endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 784–796. Doi: 10.1002/mnfr.201100677.

- Gruenewald, D.A., Matsumoto, A.M., 1991. Age-related decreases in serum gonadotropin levels and gonadotropin-releasing hormone gene expression in the medial preoptic area of the male rat are dependent upon testicular feedback. *Endocrinol.* 129, 2442–2450.
- Gunes, S., Hekim, G. N. T., Arslan, M. A., Asci, R., 2016. Effects of aging on the male reproductive system. *J. Assist. Reprod. Genet.* 33, 441–454. Doi: 10.1007/s10815-016-0663-y.
- Hamzeh, M., Robaire, B., 2009. Effect of testosterone on epithelial cell proliferation in the regressed rat epididymis. *J. Androl.* 30, 200–212. Doi: 10.2164/jandrol.108.006171.
- Hess, R.A., 2003. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 52–69.
- Hess, R.A., Bunick, D., Lee, K.H., Bahr, J., Taylor, J.A., Korach, K.S., Lubahn, D.B. 1997. A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* 390, 509–512.
- Hess, R.A., Fernandes, S.A.F., Gomes, G.R.O., Oliveira, C.A., Lazari, M.F.M., Porto, C.S., 2011. Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis. *J. Androl.* 32, 600–613. Doi: 10.1095/biolreprod.110.087353.
- Hess, R.A., Nakai, M., 2000. Histopathology of the male reproductive system induced by the fungicide benomyl. *Histol. Histopathol.* 15, 207–224.
- Ivy, G.O., Roopsingh, R., Kanai, S., Ohta, M., Sato, Y., Kitani, K., 1996. Leupeptin causes an accumulation of lipofuscin substances and other signs of aging in kidneys of young rats: further evidences for the protease inhibitor model of aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 786, 12–23.
- Jara, M., Carballada, R., Esponda, P., 2004. Age-induced apoptosis in the male genital tract of the mouse. *Reproduct.* 127, 359–366.
- Jelinsky, S.A., Turner, T.T., Bang, H.J., Finger, J.L., Solarz, M.K., Wilson, E., 2007. The rat epididymal transcriptome: comparison of segments gene expression in rat and mouse epididymis. *Biol. Reprod.* 4, 561–570.
- Jiménez-Trejo, F., Tapia-Rodríguez, M., Queiroz, D.B.C., Padilla, P., Avellar, M.C.W., Manzano, P.R., Manjarrez-Gutiérrez, G. e Gutiérrez-Opsina, G., 2007. Serotonin concentration, synthesis, cell origin, and targets in the rat caput epididymis during sexual maturation and variations associated with adult mating status: Morphological and biochemical studies. *J. Androl.* 28, 136–49.
Doi: <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000653>
- Joseph, A., Barry, D., Hess, A.R., 2011. Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. *Biol. Reprod.* 84, 207–217. Doi: 10.1095/biolreprod.110.087353.
- Joseph, A., Shur, B.D., Ko, C., Chambon, P., Hess, R.A., 2010. Epididymal hypoosmolality induces abnormal sperm morphology and function in the estrogen receptor alpha knockout mouse. *Biol. Reprod.* 82, 958–967. Doi: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080366>.
- Joseph, S.V., Edirisinghe, I., Burton-Freeman, B.M., 2015. Fruit Polyphenols: A review of anti-inflammatory effects in humans. *Food Sci. Nutr.* 56, 419–444. Doi: 10.1080/10408398.2013.767221.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., 2012. *Histologia Básica*. 11^{ed}. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan 524pp.
- Junqueira, L.C.V., Bignonas, G., Bretan, R.P., 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in the tissue sections. *Histochem. J.* 11, 447–255.
- Kempinas, W.G., Klinefelter, G.R., 2014. Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis* 4, 1–32. Doi: 10.4161/21565562.2014.979114.
- Kurowicka, B., Dietrich, G.J., Kotwica, G., 2015. Effect of neonatal or adult heat acclimation on testicular and epididymal morphometry and sperm production in rats. *Reprod. Biol.* 15, 1–8. Doi: 10.1016/j.repbio.2015.01.001.
- Lamas, C.A., Gollucke, A.P.B., Dolder, H., 2015. Grape juice concentrate (G8000) intake mitigates testicular morphological and ultrastructural damage following cadmium intoxication. *Int. J. Exp. Pathol.* 95, 301–310. Doi: 10.1111/iep.12141.
- Lamas, C.A., Gollucke, A.P.B., Dolder, H., 2017. Grape Juice Concentrate Alleviates Epididymis and Sperm Damage in Cadmium-Intoxicated Rats. *Int. J. Exp. Pathol.* 98, 86–99. Doi: 10.1111/iep.12227.
- Lamas, C.A., Lenquiste, S.A., Baseggio, A.M., Cuquetto-Leite, L., Kido, L.A., Aguiar, M.N., Collares-Buzato, M.R., Maróstica, Jr. M.R., Cagnon, V.H.A., 2018. Jaboticaba extract prevents prediabetes and liver steatosis in high-fat-fed ageing mice. *J. Funct. Foods* 47, 434–446. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.06.005>.
- Lambard, S., Galeraud-Denis, I., Bouraima, H., Bourguiba, S., Chocat, A., Carreau, S., 2003. Expression of aromatase in human ejaculated spermatozoa: a putative marker of motility. *Mol. Hum. Reprod.* 9, 117–124.

- Lambard, S., Galeraud-Denis, I., Saunders, P.T., Carreau, S., 2004. Human immature germ cells and ejaculated spermatozoa contain aromatase and oestrogen receptors. *J. Mol. Endocrinol.* 32, 279-289.
- Lee, K.H., Park, J.H., Bunick, D., Lubahn, D.B., Bahr J.M., 2009. Morphological comparison of the testis and efferent ductules between wild-type and estrogen receptor alpha knockout mice during postnatal development. *J. Anat.* 214, 916–925. Doi: 10.1111/j.1469-7580.2009.01080.x
- Leite-Legatti, A.V., Batista, A.G., Dragano, N.R.V., Marques, A.C., Malta, L.G., Riccio, M. F., Eberlin, M.N., Machado, A.R.T., Carvalho-Silva, L.B., Ruiz, A.L.T.G., Carvalho, J.E., Pastore, G.M., Maróstica Jr, M.R., 2012. Jaboticaba peel: antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. *Food Res. Inter.* 49, 596–603.
- Lenquiste, S. A., da Silva Marineli, R., Moraes, É. A., Dionísio, A. P., de Brito, E. S., Maróstica, M. R., 2015. Jaboticaba peel and jaboticaba peel aqueous extract shows in vitro and in vivo antioxidant properties in obesity model. *Food Res. Int.* 77, 162-170. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.023>.
- Lenquiste, S.A., Batista, A.G., Marineli, R.S., Dragano, N.R.V., Maróstica Jr., M.R., 2012. Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. *Food Res. Int.* 49, 153–160. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.052>.
- Lubahn, D.B., Moyer, J.S., Golding, T.S., Couse, J.F., Korach, K.S., Smithies, O., 1993. Alteration of reproductive function but not sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1162-11166.
- Mahato, D., Goulding, E.H., Korach, K.S., Eddy, E.M., 2000. Spermatogenic cells do not require estrogen receptor-alpha for development or function. *Endocrinol.* 141, 1273–1276.
- Marchiani, S., Vignozzi, L., Filippi, S., Gurrieri, B., Comeglio, P., Morelli, A., Danza, G., Bartolucci, G., Maggi, M., Baldi, E., 2015. Metabolic syndrome-associated sperm alterations in an experimental rabbit model: Relation with metabolic profile, testis and epididymis gene expression and effect of tamoxifen treatment. *Mol. Cell. Endoc.* 401, 12-24. Doi: 10.1016/j.mce.2014.11.005.
- Martinez-Traverso, G.B., Pearl, C.A., 2015. Immunolocalization of G protein-coupled estrogen receptor in the rat epididymis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 13, 48-69. Doi: 10.1186/s12958-015-0042-z.
- Nielsen, T.L., Hagen, C., Wraae, K., Brixen, K., Petersen, P.H., Haug, E., Larsen, R. e Andersen M., 2007. Visceral and subcutaneous adipose tissue assessed by magnetic resonance imaging in relation to circulating androgens, sex hormone-binding globulin, and luteinizing hormone in young men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 2696–2705.
- Perheentupa, A., Huhtaniemi, I., 2009. Aging of the human ovary and testis. *Mol. Cell Endocrinol.* 299, 2–13. Doi: 10.1016/j.mce.2008.11.004.
- Reddy, K. P., Madhu, P., Reddy, P. S. (2016). Protective effects of resveratrol against cisplatin-induced testicular and epididymal toxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* 91, 65-72. Doi: 10.1016/j.fct.2016.02.017.
- Robaire, B., 2002. Aging of the epididymis. In: *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice* (B. Robaire and B. T. Hinton, eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, 285–96.
- Robaire, B., Hamzeh, M., 2011. Androgen action in the epididymis. *J. Androl.* 32, 592-599. Doi: 10.2164/jandrol.111.014266.
- Robaire, B., Hermo, L., 1988. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens structure, functions, and their regulation. In: Knobil E, Neill J (eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 999-1080.
- Robaire, B., Hinton, B.T., 2002. *The Epididymis: from Molecules to Clinical Praticce*. New York: Kluwer Academic Plenum Publishers.
- Robaire, B., Hinton, B.T., Orgebin-Crist, M.C. *The epididymis.*, 2006. In: Neill JD, ed. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Vol 1. St Louis, MO: Elsevier Academic Press; 1071–1148.
- Robertson, K.M., O'Donnell, L., Simpson, E.R., Jones, M.E., 2002. The phenotype of the aromatase knockout mouse reveals dietary phytoestrogens impact significantly on testis function. *Endocrinol.* 143, 2913-2921.
- Serre, V., Robaire, B., 1999. Distribution of Immune Cells in the Epididymis of the Aging Brown Norway Rat is segment-specific and related to the luminal content. *Biol. Reprod.* 61, 705-714. Doi: 10.1095/biolreprod61.3.705.
- Serre, V., Robaire, B., 1998. Segment-specific morphological changes in aging Brown Norway rat epididymis. *Biol. Reprod.* 58, 497-513.
- Simas, J.N., Mendes, T.B., Paccola, C.C., Vendramini, V., Miraglia, S.M., 2017. Resveratrol attenuates reproductive alterations in type 1 diabetes-induced rats. *Int. J. Exp. Pathol.* 98, 312-328. Doi: 10.1111/iep.12251.

- Syntin, P., Dacheux, J.L., Dacheux, F., 1999. Postnatal development and regulation of proteins secreted in the boar epididymis. *Biol. Reprod.* 61, 1622-1635.
- Terman, A., Brunk, U.T., 1998. Ceroid/lipofuscin formation in cultured human fibroblasts: the role of oxidative stress and lysosomal proteolysis. *Mech. Ageing Dev.* 104, 277-291.
- Tietbohl, L.A.C., Oliveira, A.P., Esteves, R.S., Albuquerque, R.D.D.G., Folly, D., Machado, F.P., Corrêa, A.L., Santos, M.G., Ruiz, A.L.G., Rocha, L., 2017. Antiproliferative activity in tumor cell lines, antioxidant capacity and total phenolic, flavonoid and tannin contents of *Myrciaria floribunda*. *An. Acad. Bras. Cienc.* 89, 1111-1120. Doi: 10.1590/0001-3765201720160461.
- Varshneya, C., Kant, V., Mehta, M., 2012. Total phenolic contents and free radical scavenging activities of different extracts of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) pomace without seeds. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 63, 153-159. Doi: 10.3109/09637486.2011.608652.
- Vermeulen, A., Kaufman, J.M., Giagulli, V.A., 1996. Influence of some biological indexes on sex hormone-binding globulin and androgen levels in aging or obese males. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 1821-1826.
- Vigueras-Villaseñor, R. M., Rojas-Castañeda, J. C., Chavez-Saldana, M., Gutiérrez-Pérez, O., García-Cruz, M. E., Cuevas-Alpuche, O., Zambrano, E., 2011. Alterations in the spermatogenic function generated by obesity in rats. *Acta Histochem.* 113, 214-220. Doi: 10.1016/j.acthis.2009.10.004.
- Wang L, Li Y, Fu J et al., 2016. Cadmium inhibits mouse sperm motility through inducing tyrosine phosphorylation in a specific subset of proteins. *Reprod. Toxicol.* 63, 96-106. Doi: 10.1016/j.reprotox.2016.05.018.
- Wang, W.H., Tyan, Y.C., Chen, Z.S., Lin, C.G., Yang, M.H., Yuan, S.S., Tsai, W.C., 2014. Evaluation of the Antioxidant Activity and Antiproliferative Effect of the Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) Seed Extracts in Oral Carcinoma Cells. *Biomed. Res. Int.* 2014, 1-7. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/185946>.
- Wang, S., Wang, G., Barton, B.E., Murphy, T.F., Huang, H.F., 2005. Impaired sperm function after spinal cord injury in the rat is associated with altered cyclic adenosine monophosphate signaling. *J. Androl.* 26, 592-600.
- Weiss, J., Bernhardt, M.L., Laronda, M.M., Hurley, L.A., Glidewell-Kenney, C., Pillai, S., Tong, M., Korach, K.S., Jameson, J.L., 2008. Estrogen actions in the male reproductive system involve estrogen response element-independent pathways. *Endocrinol.* 149, 6198-6206. Doi: 10.1210/en.2008-0122.
- Weisse, I., 1995. Changes in the aging rat retina. *Ophthalmic. Res.* 27, 154-163.
- World Health Organization., 2018. Obesity and Overweight. Available in: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Accessed on: March 28, 2019.
- Yeung, C.H., Tuttmann, F., Bergmann, M., Nordhoff, V., Vorona, E., Cooper, T.G., 2009. Coiled sperm from infertile patients: characteristics, associated factors and biological implication. *Hum. Reprod.* 24, 1288-1295. Doi: 10.1093/humrep/dep017.
- Zaya, R., Hennick, C., Pearl, C.A., 2012. *In vitro* expression of androgen and estrogen receptors in prepubertal and adult rat epididymis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 178, 573-586. Doi: 10.1016/j.ygcen.2012.07.004.
- Zepeda, A.B., Calaf, G.M., Figueroa, C.A., Farias, J.C., 2014. Blueberries prevent the effect of intermitente hypobaric hypoxia in rat epididymis. *Androl.* 46, 766-769. Doi: 10.1111/and.12146.
- Zhang, S., Cheng, X., Wang, Y., Fan, J., Li, R., Zhou, S., Xu, C., 2015. Ninety day toxicity and toxicokinetics of fluorochloridone after oral administration in rats. *Intern. J. Environ. Res. Public Health* 12, 4942-4966. Doi: 10.3390/ijerph120504942.
- Zheng-mei, L.V., Wang, Q.J., Yuan-hua, C., Wang, S., Haung, D., 2015. Resveratrol attenuates inflammation and oxidative stress in epididymal white adipose tissue: Implications for its involvement in improving steroidogenesis in diet-induced obese mice. *Mol. Reprod. Develop.* 82, 321-328. Doi: <https://doi.org/10.1002/mrd.22478>.

Figures and Legends

Table 1. Epididymis biometry and morphometric analysis (mean value \pm standard deviation)

	YG	AG	HfAG	JAGI	JAGII	HfJAGI	HfJAGII
Epididymis absolute weight (g)	65.81 \pm 5.17	60.18 \pm 2.40	73.35 \pm 4.0 b*	89.38 \pm 5.28 b*	67.12 \pm 8.60 b**	91.13 \pm 6.03 c*	76.41 \pm 4.51
Epididymis relative weight (EI) (%)	0.21 \pm 0.02	0.18 \pm 0.013	0.17 \pm 0.009	0.27 \pm 0.017 b**	0.19 \pm 0.02 b**	0.22 \pm 0.015 c*	0.20 \pm 0.0113
Epididymis caput							
Epithelium height (μ m)	34.59 \pm 0.92	32.49 \pm 1.64	34.59 \pm 1.50	35.54 \pm 1.30	35.97 \pm 1.90	34.75 \pm 0.97	34.19 \pm 1.55
Tubular diameter (μ m)	119.4 \pm 2.38	106.1 \pm 5.26 a*	120.3 \pm 3.42 b*	134.2 \pm 6.07 b**	125 \pm 2.98 b**	133.5 \pm 4.49 c*	121.2 \pm 3.50
Epididymis cauda							
Epithelium height (μ m)	18.82 \pm 0.55	25.16 \pm 1.38 a***	20.31 \pm 1.58 b*	24.58 \pm 0.75	23.62 \pm 1.0	23.21 \pm 0.61	19.49 \pm 0.24
Tubular diameter (μ m)	304.6 \pm 10.47	297.6 \pm 9.73	288.7 \pm 12.32	248.6 \pm 23.03	321.6 \pm 8.76 b***	332.1 \pm 25.15	325.7 \pm 6.75 c*

YG, Young group; AG, aged group; HfAG, high-fat diet + aged group; JAGI, first PJE dose + aged group; JAGII, double PJE dose + aged group; HfJAGI, first PJE dose + high-fat diet + aged group; HfJAGII, double PJE dose + high-fat diet + aged group. (n=6). Significant difference was found for: ^a relative to YG group; ^b relative to AG group; ^{b'} relative to JAGI; ^c relative to HfAG group; ^{c'} relative to HfJAGI. Consider: *p<0.05; **p<0.01 and *** p<0.001.

Table 2. Epididymis stereological analysis (mean value \pm standard deviation)

	YG	AG	HfAG	JAGI	JAGII	HfJAGI	HfJAGII
Epididymis caput							
Epithelium proportion (%)	52.91 \pm 1.80	53.48 \pm 0.74	47.86 \pm 1.40 b**	52.63 \pm 1.36	51.72 \pm 0.92	54.14 \pm 0.81 c***	52.17 \pm 0.79 c*
Lumen proportion (%)	10.93 \pm 0.84	7.555 \pm 1.33 a*	12.96 \pm 1.20 b**	12,63 \pm 0,55 b**	14,19 \pm 1,16 b***	11,93 \pm 0,78	11,36 \pm 1,06
Tubular compartment (%)	63.08 \pm 1.73	67.72 \pm 1.85	63.55 \pm 0.63b*	66.19 \pm 0.97	66.20 \pm 0.60	65.31 \pm 1.32	65.30 \pm 1.24
Interstitial compartment (%)	38.93 \pm 1.25	31.16 \pm 1.71 a***	37.67 \pm 0.88 b**	36.49 \pm 0.96 b**	33.82 \pm 0.70	33.96 \pm 1.44	32.28 \pm 1.59 c*
Epididymis cauda							
Epithelium proportion (%)	12.62 \pm 0.59	17.09 \pm 0.67 a***	15.47 \pm 1.83	21,62 \pm 1,55 b*	16,47 \pm 1,01 b***	19,61 \pm 1,09	13,06 \pm 1,12 c***
Lumen proportion (%)	50.82 \pm 2.11	41.08 \pm 2.25 a**	49.47 \pm 2.41 b*	46.00 \pm 2.78	42.97 \pm 1.12	55.50 \pm 0.93	52.39 \pm 1.06
Tubular compartment (%)	65.34 \pm 2.618	57.35 \pm 1.760a*	63.65 \pm 1.114b**	65,24 \pm 1,990b**	58,87 \pm 1,016b**	71,48 \pm 1,076c***	64,54 \pm 1,552c***
Interstitial compartment (%)	35.07 \pm 2.46	44.67 \pm 1.22 a*	36.35 \pm 1.11 b**	36.99 \pm 1.29 b*	41.13 \pm 1.01	31.13 \pm 1.97 c*	35.88 \pm 1.33 c**

YG, Young group; AG, aged group; HfAG, high-fat diet + aged group; JAGI, first PJE dose + aged group; JAGII, double PJE dose + aged group; HfJAGI, first PJE dose + high-fat diet + aged group; HfJAGII, double PJE dose + high-fat diet + aged group. (n=6). Significant difference was found for: ^a relative to YG group; ^b relative to AG group; ^{b'} relative to JAGI; ^c relative to HfAG group; ^{c'} relative to HfJAGI. Consider: *p<0.05; **p<0.01 and *** p<0.001.

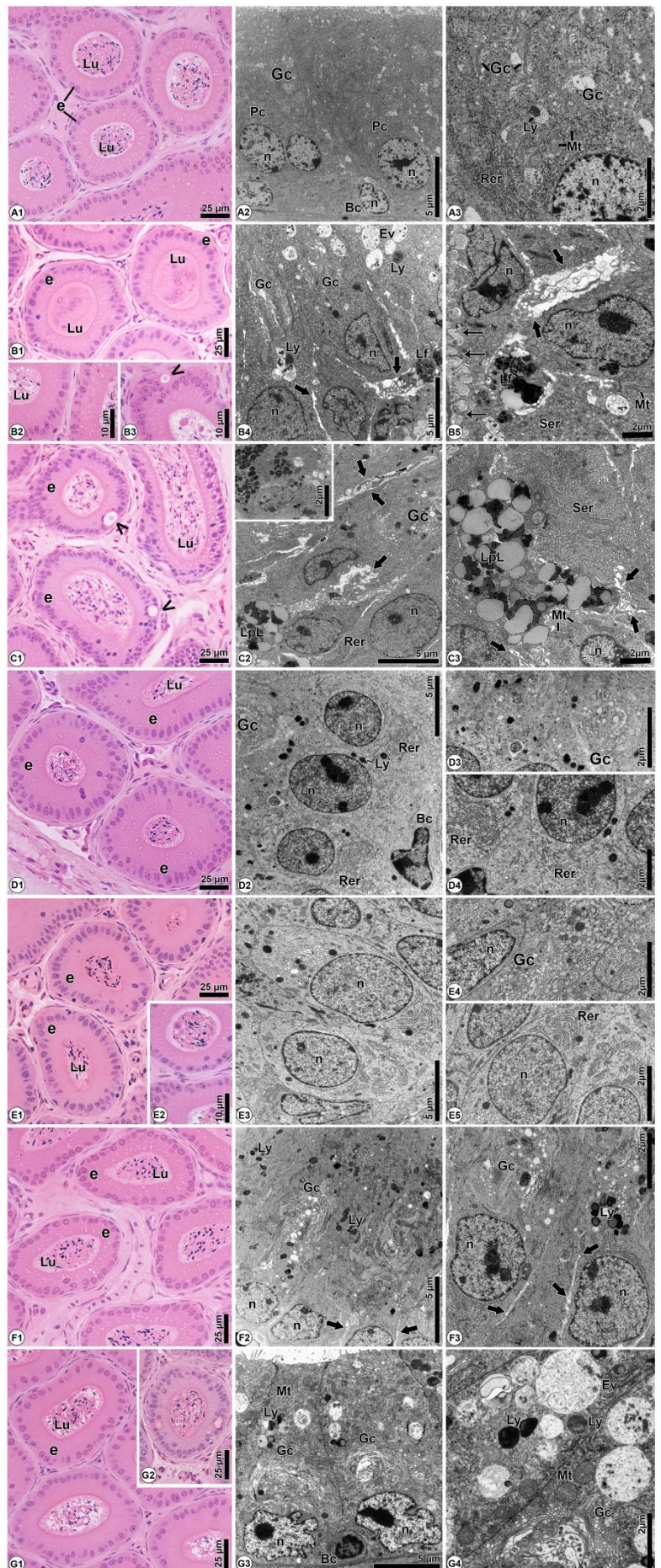


Figure 1. Light and electron microscopy of the epididymal caput region.

(A1-A3): YG Group. (A1): Light Microscopy. (A2-A3): Transmission electron microscopy; overview of the epithelium, showing principal cells (Pc), with large complexes of Golgi (Gc) and basal cells (Bc). (A3): Principal cell, exhibiting a well-developed rough endoplasmic reticulum (RER) and Golgi complexes (Gc). (B1-B5): AG Group. (B1-B3): Light microscopy, with emphasis on intraepithelial cystic formation in (B3). (B1): Cellular desquamation present in tubular lumen. (B4-B5): Transmission electron microscopy. Epithelium with extensive intercellular spaces (thick arrow), presence of lipofuscin granules (Lf), large endosomal vesicles (Ev) and smooth endoplasmic reticulum (Ser) well developed. (B5): Detail of basal epithelial region, with basal recesses (thin arrows) and intercellular space (thick arrow). (C1-C3): HfAG group. (C1): Light Microscopy, with emphasis on cystic intraepithelial formation (arrowhead). (C2-C3): Transmission electron microscopy. Note epithelium with intense cellular separation (thick arrow), accumulation of lipofuscin granules with lipids (Lpl). Lysosomes (Ly); mitochondria (Mt); nucleus (n). (D1-D4): JAGI group. (D1): Light Microscopy. (D2-D4): Transmission electron microscopy. (E1-E5): JAGII Group. (E1-E2): Light microscopy. (E3-E5): Transmission electron microscopy. Note the intact epithelium, with principal cells exhibiting well-developed rough endoplasmic reticulum (RER) and Golgi complexes (CG). (F1-F3): HfJAGI group. (F1): Light Microscopy. (F2-F3): Transmission electron microscopy. Principal cells with extensive Golgi complexes (Gc) and lysosomes (Ly). Note basal foci of intercellular separation (thick arrow). (G1-G4): HfJAGII group. (G1-G2): Light Microscopy. Observe the presence of some intraepithelial cystic formations in (G2). (G3-G4): Transmission electron microscopy. Intense intercellular junction, with principal cells exhibiting well-developed Golgi complex (Gc). (G4): Detail of principal cells cytoplasm, with endosomal vesicles (Ev), lysosomes (Ly) and mitochondria (Mt). Basal cell (Bc), Epithelium (e), Intraepithelial cysts (arrowhead), Lumen (Lu), Principal cell (Pc).

Figure 2. Light and electron microscopy of the epididymal cauda region. (A1-A3): YG Group. (A1): Light Microscopy. (A2-A3): Transmission electron microscopy; overview of the epithelium, showing principal cells (Pc), with large Golgi complexes (Gc) and rough endoplasmic reticulum (Rer), basal cells (Bc) and healthy basement membrane (Bm). (A3): Principal cell cytoplasm, exhibiting a well-developed rough endoplasmic reticulum (RER) and Golgi complex (Gc). (B1-B5): AG Group. (B1-B3): Light microscopy, with emphasis on cellular desquamation present in tubular lumen (B1-inset). (B3): Epithelium with intense microvacuolization. Note the cribriform changes (B1), and the presence of karyomegaly (star) in epithelial cells in (B2). (B4-B5): Transmission electron microscopy. Epithelium with extensive intercellular spaces (thick arrow), presence of lipofuscin granules (Lf), large vesicles (v) and smooth endoplasmic reticulum (Ser) well developed. (B5): Detail of basal epithelial region, with basal recesses (thin arrows) and intercellular space (thick arrow). (C1-C5): HfAG group. (C1): Light Microscopy. Note the hyperplasia of clear cells (thin arrow) and the inflammation focus on (C1-inset) with emphasis on cystic intraepithelial formation (thick arrow). (C2): Epithelium with intense microvacuolization. (C3): Intraepithelial cystic formation. (C4-C5): Transmission electron microscopy. (C4-C5): large intra- and intercellular vacuoles (v) and foci of intercellular space (thick arrows). (C5): Notice clear cells (Cc) with intense accumulation of lipofuscin (Lf) and lysosomes (Ly), large intercellular separation (thick arrow), and presence of basal recesses (thin arrow). Cell halo (H), mitochondria (Mt), basement membrane (Bm), and nucleus (n). (D1-D3): JAGI group. (D1): Light Microscopy. (D2-D3): Transmission electron microscopy. (D2): Note principal cell (Pc) with well-developed Golgi complex (Gc) and rough endoplasmic reticulum (Rer), and strong tight junctions (Tj). (D3): Clear cell (Cc) with lysosomes (Ly) and high concentration of mitochondria (Mt). (E1-E3): JAGII Group. (E1): Light microscopy. (E2-E3): Transmission electron microscopy. Note the intact epithelium, with principal cells exhibiting well-developed rough endoplasmic reticulum (RER) and Golgi complex (CG), with intact basal cell (Bc). (F1-F3): HfJAGI group. (F1): Light Microscopy. (F2-F3): Transmission electron microscopy. Principal cells (Pc) with extensive Golgi complex (Gc). Note presence of lipofuscin granules (Lf) in principal cell. (G1-G3): HfJAGII group. (G1): Light Microscopy. (G2-G3): Transmission electron microscopy. Intense intercellular junction, with principal cells (Pc) exhibiting well-developed Golgi complex (Gc), presence of lysosomes (Ly) and few lipofuscin granules (Lf). (G3): Detail of principal cells cytoplasm, with lysosomes (Ly) and well-developed colgi complex (Gc), and rough endoplasmic reticulum (Rer). Basal cell (Bc), Epithelium (e), Lumen (Lu), Principal cell (Pc).

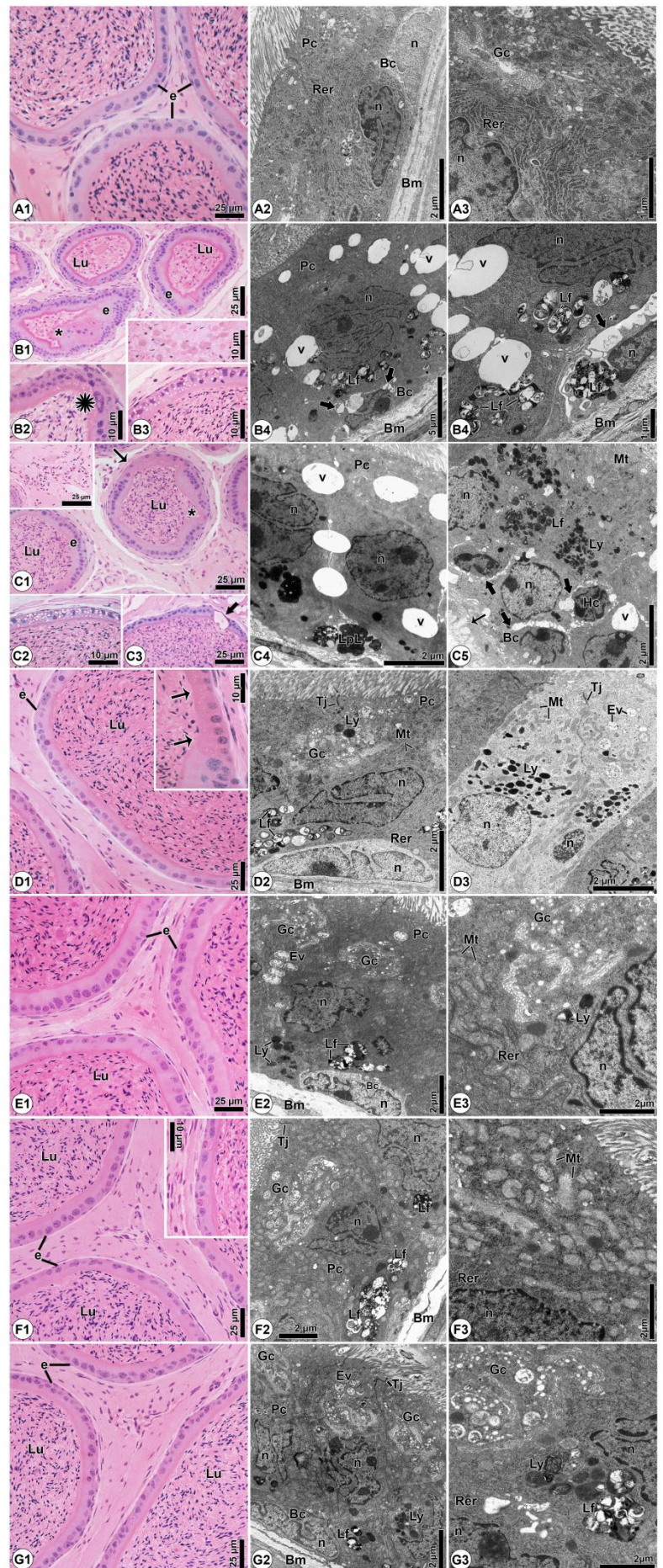


Table 3. Epididymis histopathological quantification (mean value \pm standard deviation)

	YG	AG	HfAG	JAGI	JAGII	HfJAGI	HfJAGII
Epididymis Caput (μm)							
Cribriform change	-	-	-	-	-	-	-
Epithelial microvacuolization	15.25 \pm 5.121	70.50 \pm 23.57	188.7 \pm 39.30	19.50 \pm 6.764	24.67 \pm 3.180	36.07 \pm 18.40 c**	26.75 \pm 9.51c**
Single cell necrosis	0.80 \pm 0.21	7.0 \pm 2.0 a**	3.73 \pm 0.13	3.60 \pm 0.58	2.50 \pm 0.30	1.73 \pm 0.40c*	1.06 \pm 0.57c**
Luminal cell debris	0.80 \pm 0.21	14.80 \pm 7.88	3.73 \pm 0.13	5.10 \pm 1.94	2.60 \pm 0.20	1.40 \pm 0.50c*	1.13 \pm 0.63c*
Karyomegaly	-	-	-	-	-	-	-
Inflammatory infiltrate	0.13 \pm 0.03	3.0 \pm 0.57a**	8.0 \pm 1.0b*	0.56 \pm 0.08	0.50 \pm 0.11	0.40 \pm 0.05c***	0.30 \pm 0.05c***
Epididymis Cauda (μm)							
Cribriform change	0.1 \pm 0.06	2.54 \pm 0.30a***	4.25 \pm 0.41b*	1.20 \pm 0.27	0.5 \pm 0.10b*	2.15 \pm 0.64c*	1.05 \pm 0.23c**
Epithelial microvacuolization	6.8 \pm 4.69	35.73 \pm 10.54a*	66.13 \pm 15.36	11.13 \pm 2.58	11.00 \pm 1.0	10.10 \pm 4.99c**	6.80 \pm 4.58c**
Single cell necrosis	-	2.08 \pm 0.47	3.40 \pm 0.53	0.25 \pm 0.15b*	0.26 \pm 0.17b*	0.15 \pm 0.09c***	0.15 \pm 0.05c***
Clear cell hypertrophy	15.67 \pm 2.33	42.83 \pm 1.92a***	39.93 \pm 6.77	12.95 \pm 2.51b***	17.9 \pm 2.1b**	33.4 \pm 3.0	13.87 \pm 1.31c*
Luminal cell debris	1.8 \pm 0.74	47.67 \pm 4.14a***	13.37 \pm 1.51 b**	2.8 \pm 1.13b***	2.30 \pm 0.30b***	8.90 \pm 2.99	2.50 \pm 0.41c*
Karyomegaly	0.733 \pm 0.29	4.95 \pm 0.05a***	5.0 \pm 0.80	1.30 \pm 0.75	0.13 \pm 0.06b*	3.86 \pm 0.59	4.0 \pm 1.0
Inflammatory infiltrate	0.07 \pm 0.04	56.90 \pm 11.80 a**	50.50 \pm 12.61	3.0 \pm 1.88 b**	0.26 \pm 0.06 b**	5.06 \pm 0.24c*	1.80 \pm 0.34c*

YG, Young group; AG, aged group; HfAG, high-fat diet + aged group; JAGI, first PJE dose + aged group; JAGII, double PJE dose + aged group; HfJAGI, first PJE dose + high-fat diet + aged group; HfJAGII, double PJE dose + high-fat diet + aged group. (n=6). Significant difference was found for: ^a relative to YG group; ^b relative to AG group; ^c relative to HfAG group. Consider: *p<0.05; **p<0.01 and *** p<0.001.

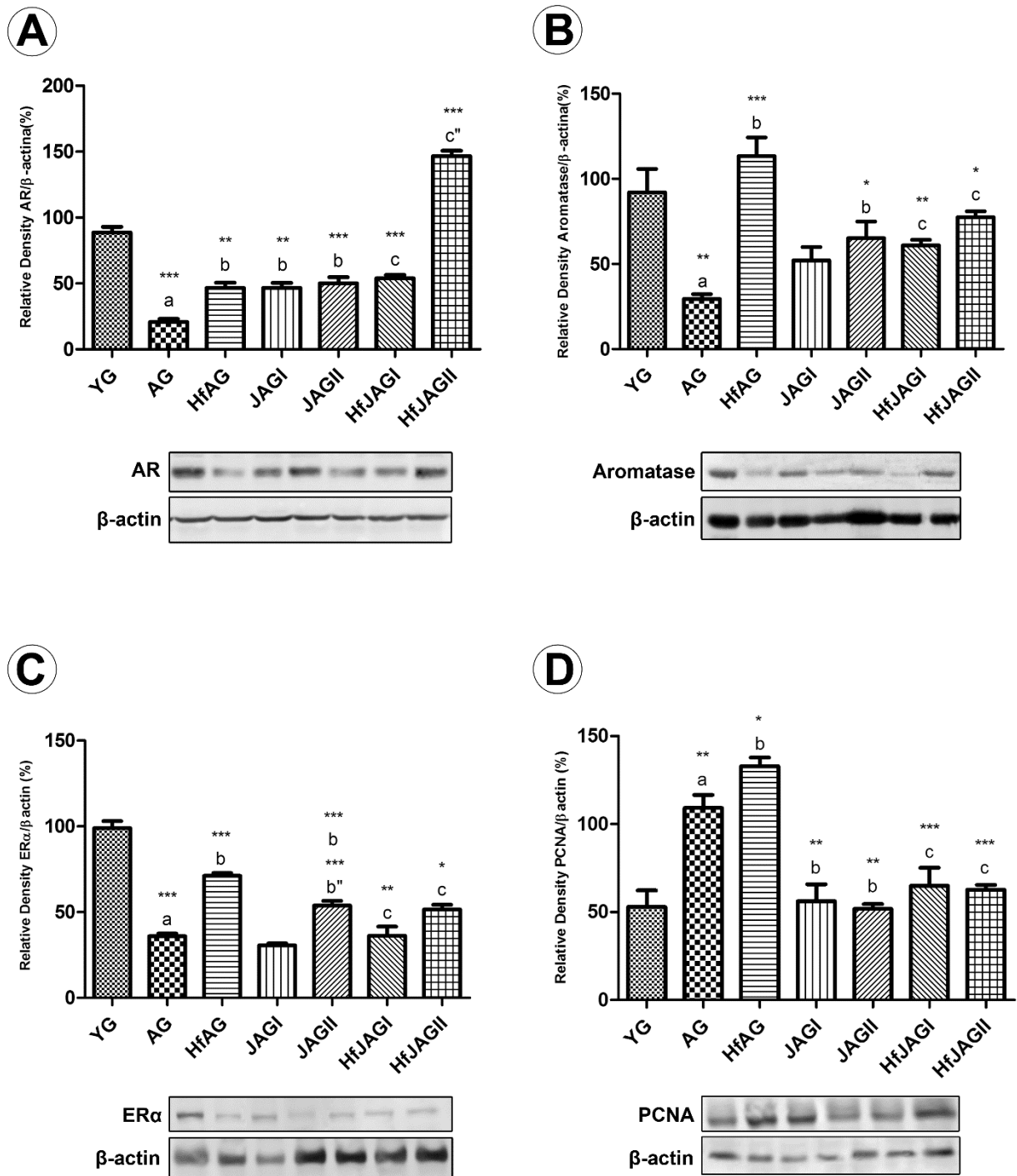
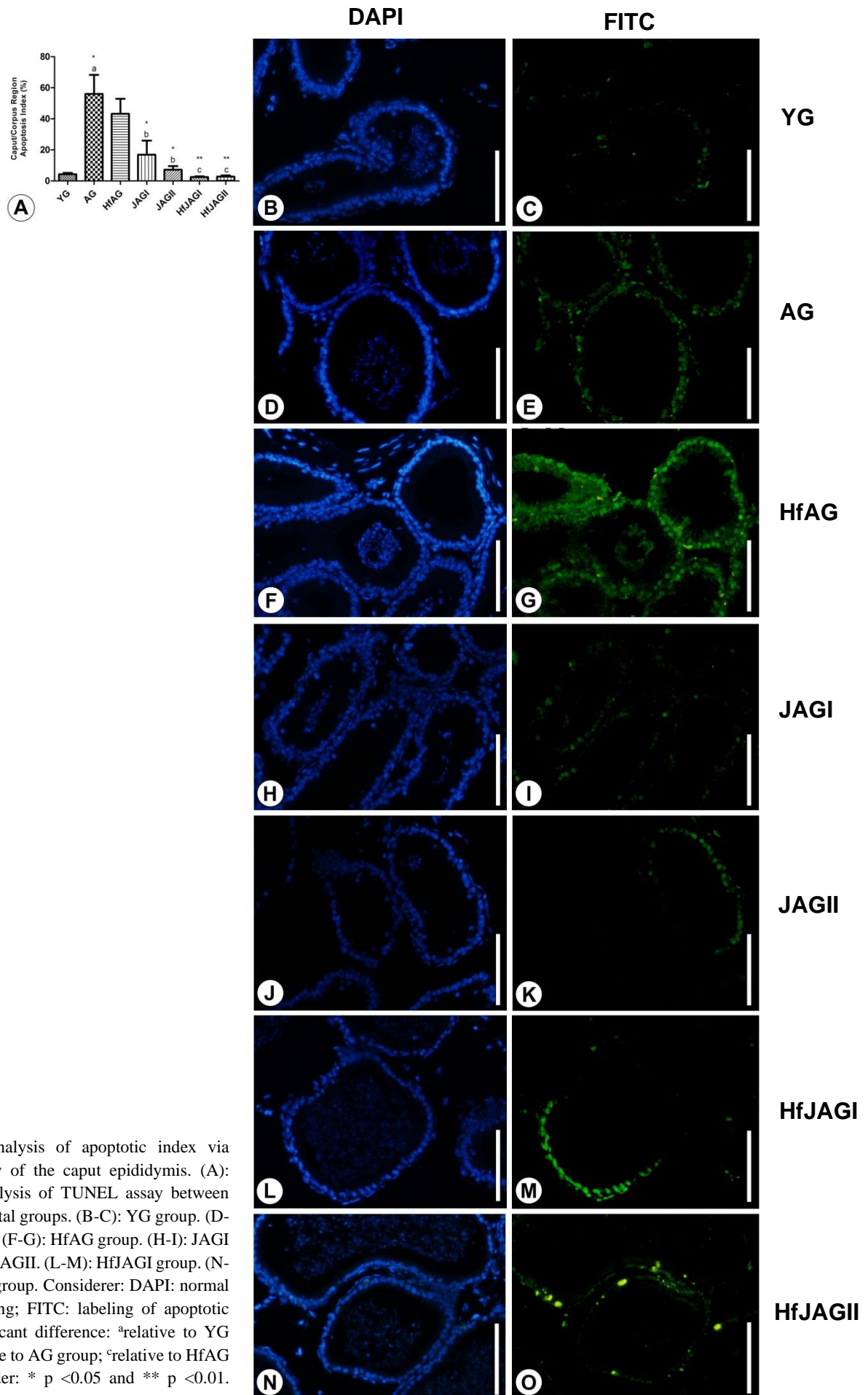
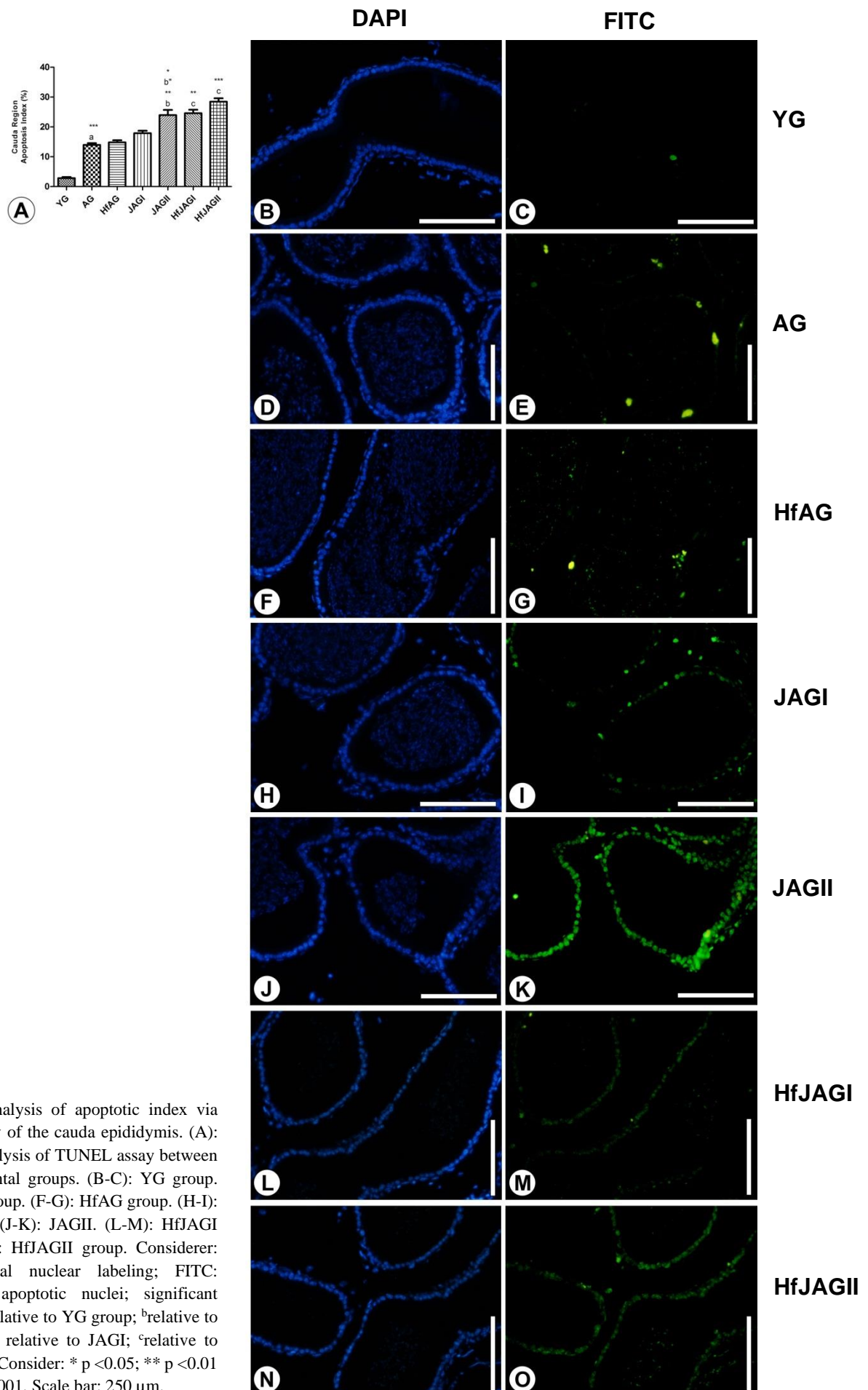


Figure 3. Western Blotting analysis of AR, Aromatase, ER α , and PCNA levels in the epididymis of experimental groups. (A): AR. (B): Aromatase. (C): ER α . (D): PCNA. Significant difference: ^arelative to YG group; ^brelative to AG group; ^{b''} relative to JAGI; ^crelative to HfAG group; ^{c''} relative to HfJAGI. Consider: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.





4. RESULTADOS ADICIONAIS

4.1. Avaliação Biométrica

4.1.1. Aumento de Peso Corporal e Peso Final

O aumento de peso corporal apresentou variação significativa ao ser comparado entre os grupos controle (JV; SE; SHP), bem como destes aos seus respectivos tratados (SJI, SJII; SHJI, SHJII). Observou-se uma redução significativa deste parâmetro em SE comparado a JV. Já SHP apresentou um aumento de peso considerável ao contrário dos SE. Os grupos tratados com dieta hiperlipídica e ECJ (SHJI e SHJII) exibiram uma redução no peso corporal em relação aos tratados apenas com a dieta hiperlipídica (SHP), de modo que essa redução se mostra mais intensa no grupo SHJII. Por sua vez, os grupos senis tratados com o ECJ (SJI e SJII) não evidenciaram variação neste parâmetro em relação aos SE. Já em relação ao peso final (BW) a variação foi mais intensa. O grupo SE exibiu um BW final significativamente maior em comparação ao JV, assim como SHP foi para SE. Por fim, nos grupos tratados com ECJ (SJI, SJII; SHJI, SHJII), o BW final foi menor em relação ao medido nos seus respectivos controles (SE e SHP) (ver Tabela 3).

4.1.2. Peso Absoluto e Relativo dos Testículos (IGS)

Entre a maioria dos grupos analisados neste trabalho, o IGS marcou, apenas, uma redução no grupo SE em relação ao JV. Nos grupos tratados com o ECJ (SJI, SJII; SHJI, SHJII) observou-se um aumento progressivo, porém não significativo, neste índice, em comparação aos grupos controle. O peso absoluto testicular, por sua vez, exibiu maior variação. Entre JV e SE, os testículos reduziram significativamente o peso, assim como ocorreu entre SHP, SHJI e SHJII, cujas doses duplicadas de ECJ favoreceram a progressiva perda de peso gonadossomático (ver Tabela 3).

4.2. Análise Morfométrica

A partir da morfometria testicular observou-se variações em alguns destes parâmetros entre os grupos analisados. Entre os grupos controle, a altura epitelial tubular diminuiu nos animais senis em comparação aos jovens; ao passo que nos indivíduos SHP este parâmetro aumentou significativamente em detrimento dos indivíduos SE. Já entre os grupos tratados, houve um aumento na altura epitelial para o grupo SHJI, comparado ao grupo SHP, assim como para o SJI e SJII em relação ao SE. Contudo, apesar das alterações significativas para a altura epitelial tubular, o diâmetro dos túbulos não variou significativamente entre os grupos, desde os controles aos tratados. Vide Figura 11.

4.3. Avaliação Estereológica

A porcentagem de área total ocupada pelos túbulos seminíferos foi maior nos grupos tratados, SJI, SJII, SHJI, SHJII, em comparação aos grupos controle, SE e SHP. A área luminal apresentou redução significativa nos animais senis (SE), diferentemente dos jovens (JV), ao passo que os animais alimentados com a dieta hiperlipídica (SHP) exibiram um aumento deste parâmetro em relação aos SE. Dentre os tratados, o grupo SHJII teve uma redução significativa de volume luminal em relação ao SHJI, e ao seu respectivo controle, SHP. Já entre os grupos tratados com jabuticaba, este parâmetro exibiu um aumento significativo nos SJI, quando comparado ao SJII, e a seu controle, SE. Além disso, a área epitelial é também, marcada por inúmeras variações estereológicas entre os grupos analisados. Aumento do epitélio tubular ocorre nos grupos SHP, em relação ao SE, assim como nos tratados SHJII, quando comparado ao SHJI, e no SJII, ao contrário do SE. Ademais, uma grande redução no volume epitelial é observada em SE, relacionado ao JV. Todos esses resultados podem ser verificados nos gráficos da Figura 12.

Em consideração aos componentes intersticiais, a dieta hiperlipídica reduziu o volume e porcentagem das células de Leydig; aumentou em porcentagem e número, a proporção de vasos sanguíneos – apesar de não ser significativo – e aumentou o volume de macrófagos, no grupo SHP, em relação ao SE. Similarmente, um aumento significativo no volume e porcentagem das células de Leydig, macrófagos, vasos sanguíneos e espaço linfático foi observado nos animais senis (SE), comparados aos jovens (JV), além do aumento no espessamento da lâmina própria tubular. Entretanto, o extrato de jabuticaba em indivíduos senis, grupo SJI e SJII, acarretou uma redução na proporção de macrófagos e células Leydig, além dos vasos sanguíneos, embora este último não tenha sido significativo. Por sua vez, a combinação do tratamento do extrato de jabuticaba com a dieta hiperlipídica favoreceu a uma melhora na porcentagem de células de Leydig, redução no volume do espaço linfático, assim como de macrófagos e vasos sanguíneos, em SHJI e SHJII, em relação ao SHP. Esses resultados estão ilustrados nos gráficos da Figura 13.

Em relação aos parâmetros estereológicos das células de Leydig, houve um aumento no volume nuclear e citoplasmático (em μm^3) das mesmas, acompanhados pelo aumento no volume individual desse tipo celular nos animais senis quando comparados aos juvenis. Já os animais senis alimentados com a dieta hiperlipídica apresentaram uma redução na quantidade de células de Leydig por testículo e por grama de testículo em comparação aos animais senis de dieta normolipídica. Observou-se um aumento no volume nuclear e citoplasmático das células de Leydig no grupo SHP em relação ao SE. Por sua vez, o tratamento com o extrato da casca de jabuticaba reduziu o volume nuclear e citoplasmático para próximo dos níveis do grupo JV, tanto nos grupos SJI, SJII como nos SHJI e SHJII. Redução no volume individual das células de Leydig

(em μm^3) foi observada nos grupos SHJI e SHJII em relação ao SHP, assim como nos animais SJII em comparação aos animais SE. Adicionalmente, o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo aumentou significativamente nos animais dos grupos SHJI e SHJII em relação aos indivíduos do grupo SHP, além do número de células de Leydig por testículo ter aumentado no grupo SJI comparado ao grupo SE. Esses resultados estão ilustrados na Tabela 4.

4.4. Histopatologia e Ultraestrutura Testicular

4.4.1. Animais dos grupos JV, SE e SHP

Uma estrutura tecidual típica foi encontrada ao longo da extensão testicular dos animais jovens (JV) analisados (Figuras 14A-B). No compartimento tubular, as células de Sertoli apresentam uma distribuição periférica, sendo situadas em proximidade à túnica juntamente com as espermatogônias. Adicionalmente, é notado o desenvolvimento normal da espermatogênese. Na porção intersticial, há uma distribuição normal de vasos sanguíneos, espaço linfático, células de Leydig e macrófagos. Nesse grupo, as células de Leydig são morfológicamente normais, ausentes de vacúolos citoplasmáticos e hipertrofia celular, além de estarem organizadas em *clusters*, nos quais estão comumente, associadas a vasos sanguíneos e macrófagos (Figura 14B). Entretanto, nos demais grupos, diversas alterações histopatológicas foram verificadas.

Nos grupos SE e SHP, o epitélio tubular apresenta depleção celular, associada à vacuolização bem como ao acúmulo de corpos residuais atípicos na periferia luminal, sendo ambos os caracteres mais intensos em SHP em oposição ao SE (Figuras 14C-F). Além disso, tais grupos exibem ampla degeneração tubular, em diferentes estágios, desde o I, no qual há perda de adesão celular, resultando em pequenos espaços intercelulares; II, em que tais espaços ocupam maior área tubular, somados à depleção celular; III, no qual tais espaços atingem maior proporção, associados à presença de vacúolos assim como à desorganização do epitélio germinativo e luminal; e por fim, IV, em que todos os caracteres anteriores estão intensificados e associados ao diformismo tubular. Adicionalmente, os animais senis (SE), exibem túbulos disfórmicos com elevado grau de distorção de seu formato circular/oval, bem como pequenos focos necróticos no epitélio germinativo, além da atrofia tubular difusa, caracterizada pela dilatação luminal e uma redução da altura epitelial tubular. No espaço intersticial de ambos, SE e SHP, há uma grande proporção de células de Leydig hipertrofiadas, resultante do acúmulo de vacúolos citoplasmáticos, além de infiltrados inflamatórios marcarem regiões intertubulares restritas, nos indivíduos SHP.

Em relação às alterações ultraestruturais, inúmeras variações são notadas entre os grupos JV, SE e SHP. Nos animais jovens, os túbulos seminíferos apresentam epitélio germinativo saudável, com a barreira hemato-testicular visível e íntegra (Figuras 14G-H). Na porção basal tubular é

possível observar as células mioides, além de as células de Sertoli, espermatogônias e espermatócitos com numerosas mitocôndrias e retículo endoplasmático volumoso (Figura 14G). Próximo ao compartimento luminal, espermátides iniciais são observadas com acrossomo íntegro, e com o processo de formação flagelar iniciado, exibindo o corpúsculo basal com os centríolos associados à base nuclear (Figura 14I). Ademais, no lúmen, várias espermátides alongadas são visualizadas com a cromatina altamente condensada (Figura 14J).

Por sua vez, os animais senis exibem túbulos seminíferos com espessamento e reentrâncias na membrana basal (Figuras 14K; 14L2). As células de Sertoli apresentam poucos prolongamentos celulares, típicos das mesmas em indivíduos jovens e saudáveis, grânulos de lipofuscina, além de grandes vacúolos citoplasmáticos (Figura 14K). Várias espermátides arredondadas apresentam acrossomos íntegros, além de numerosas mitocôndrias e complexos de Golgi bem desenvolvidos (Figuras 14L1; 14M). No entanto, as mesmas também apresentam pontos focais de degeneração citoplasmática (Figura 14L1). Além disso, o epitélio germinativo possui alto índice de degeneração, o qual é evidenciado pela presença de vários espaços intercelulares (Figuras 14L1; 14M).

Os animais SHP possuem túbulos seminíferos com elevado grau de degeneração, acompanhado de intensa separação intercelular, a qual abrange desde o contato entre células de Sertoli à membrana basal (Figura 14N) ao espaço entre as espermátides arredondadas (Figura 14O). Por fim, suas espermátides dispõem de alterações nucleares ultraestruturais com ampla variação em seu formato (Figuras 14P-Q).

4.4.2. Animais dos grupos SJI, SJII, SHJI e SHJII

Nos grupos tratados com o extrato da casca de jabuticaba, as alterações histopatológicas observadas nos grupos controle, ocorreram, porém, em menor intensidade (Figuras 15A-F). A redução de corpos residuais atípicos, a ausência de infiltrado inflamatório, focos necróticos e atrofia tubular, assim como a visível redução da degeneração tubular, pela qual apenas os estágios I e II são observados, constituem algumas das diferenças entre os grupos controle e seus respectivos tratados. Outra relevante característica consiste na redução da proporção de células de Leydig hipertrofiadas bem como na recuperação do formato tubular normal e constante ao longo da túnica. (Figuras 15A-F).

Por sua vez, em relação às alterações ultraestruturais, os animais dos grupos tratados com o extrato patenteado da casca da jabuticaba exibem a barreira hemato-testicular bem visível no compartimento basal tubular, com células de Sertoli íntegras assim como as células do processo de espermatogênese (espermatogônias, espermatócitos e espermátides) (Figuras 15G-S). Regiões

pontuais de separação celular são observadas por todas as regiões dos compartimentos tubulares, tanto entre as espermatogônias e as células de Sertoli quanto entre as espermátides arredondas e os espermátócitos (Figuras 15H; 15J-K; 15M-N). Além disso, alguns focos de degradação citoplasmática ainda são observados nos animais SJII e SHJII (Figuras 15G-H; 15K), porém em menor proporção que nos SJI, SHJI e SE.

4.5. Análises Moleculares (Western Blotting)

4.5.1. AR

As análises de Western Blotting mostram uma evidente variação entre os grupos experimentais. Entre os grupos controle, o AR apresentou redução significativa na densidade relativa para os animais SE, quando comparados aos JV; e um aumento significativo no grupo SHP, em relação ao SE. Entre os grupos tratados com o extrato da casca de jabuticaba, houve um aumento significativo para os indivíduos SJI, SHJI, e SHJII comparados aos seus respectivos controles, SE e SHP. Além disso, entre os grupos tratados, SHJI e SHJII, observou-se um aumento significativo, dose dependente, na concentração de AR, sendo a mesma maior em SHJII, quando comparada ao SHJI (Figura 16A).

4.5.2. ER α

Entre os grupos controle, a concentração de ER α acompanhou a variação do AR, de modo a apresentar-se reduzida, significativamente, em SE, comparado ao JV; e elevada em SHP, em relação a SE. O tratamento com o ECJ favoreceu o aumento, significativo, na concentração de ER α para os grupos SJI, SJII e SHJII, ao serem comparados aos controles, SE e SHP, respectivamente. Além disso, entre os grupos tratados, SJI e SJII, houve um significativo aumento, dose dependente, na concentração de ER α , assim como entre SHJI e SHJII (Figura 16B).

4.5.3. Aromatase

Observou-se uma redução no nível de aromatase para os animais SE, em comparação aos juvenis, ao passo que houve um aumento significativo no nível da mesma para os animais do grupo SHP, em relação aos indivíduos do grupo SE. Dentre os tratados com o extrato da casca de jabuticaba, todos os grupos apresentaram um aumento nos níveis de aromatase em relação a seus respectivos controles, SE e SHP. Ademais, foi notado um aumento dose-dependente desta enzima para os grupos SJII e SHJII em comparação aos grupos que receberam a dose I do extrato, SJI e SHJI, respectivamente (Figura 16C).

4.5.4. PCNA

Os grupos controles exibiram diferenças significativas na concentração de PCNA, apresentando, o grupo SE, redução significativa neste marcador molecular, quando comparado ao JV; enquanto o grupo SHP mostrou um aumento significativo, em relação ao SE. Por sua vez, os grupos tratados com ECJ, SJII e SHJII, exibiram um aumento, significativo, na concentração de PCNA, em comparação aos seus respectivos controles, SE e SHP. Ademais, houve um aumento significativo, dose dependente, na concentração de PCNA, entre SJI e SJII, bem como entre SHJI e SHJII (Figura 16D).

5. DISCUSSÃO

5.1. Avaliação Morfométrica e Estereológica

As alterações histológicas testiculares mais notáveis têm sido documentadas através da privação de andrógenos, por meio da castração, vasectomia, reposição de testosterona-estradiol e administração de EDS, um potente agente tóxico para células de Leydig. Além disso, vários compostos químicos têm evidenciado atividade tóxica à estrutura e função do testículo (Vidal e Whitney 2014). Contudo, as alterações morfométricas testiculares associadas à senescência e obesidade são escassamente descritas na literatura, muitas das quais são provenientes de referências consideradas ultrapassadas para a atualidade (Gaytan et al. 1986; Ichihara et al. 1993; Horn et al. 1996; Harishankar et al. 2011; Vendramini et al. 2014). Em concordância, o efeito do extrato da casca de jabuticaba (ECJ) sob tais parâmetros ainda não foi descrito, sendo este trabalho o pioneiro.

Inúmeros estudos já evidenciaram o envelhecimento e a obesidade como responsáveis pela redução progressiva na biossíntese androgênica (Harman et al. 2001; Veldhuis et al. 2007; Nielsen et al. 2007; Chen et al. 2009; Perheentupa e Huhtaniemi 2009; Carreau et al. 2011; Banerjee et al. 2012; Marco-Jiménez e Vicent 2017). Dessa forma, como consequência de tais fatores, a privação hormonal de andrógenos, resulta na degeneração/atrofia tubular, na exfoliação das células germinativas, ambas as quais conduzem à redução proporcional do epitélio seminífero e área luminal, acompanhadas pelo aumento no volume intersticial (Horn et al. 1996; Kidd et al. 2001; Pop et al. 2011). Além disso, Horn et al. (1996) e Morales et al. (2004) ressaltam a regressão do epitélio seminífero como um processo progressivo, que inicia-se com a redução espermatogênica, e avança com o atraso na maturação celular, a qual converge à túbulos cujo conteúdo principal são as células de Sertoli. Esses dados corroboram os resultados obtidos no presente estudo, haja vista

as características histopatológicas testiculares bem como à redução no volume epitelial tubular em associação ao aumento do volume intersticial, apresentados pelos animais senis em relação aos jovens e demais grupos analisados.

No presente estudo, os animais senis exibiram um aumento significativo do espessamento da lâmina própria situada ao redor dos túbulos, em comparação aos indivíduos jovens. Estudos prévios sugerem que este espessamento resulta da redução do comprimento, área total e diâmetro dos túbulos seminíferos (Johnson 1986; Johnson et al. 1988; Meacham e Murray 1994). Entretanto, o aumento da espessura da lâmina própria tem sido observada antes do avanço degenerativo do epitélio seminífero, de modo que, atualmente, o mesmo é associado ao declínio funcional da barreira hemato-testicular, com o avançar da idade (Richardson et al. 1995; Fukuda et al. 2001; Morales et al. 2004).

Em contrapartida, os indivíduos senis tratados com dieta hiperlipídica exibiram um aumento do volume epitelial e luminal tubular, em detrimento do espaço intersticial, contrariando os poucos dados existentes a respeito da influência da obesidade sob tais parâmetros (Harishankar et al. 2011; Trindade et al. 2013; Vendramini et al. 2014). Contudo, o aumento do diâmetro tubular bem como da vacuolização no epitélio seminífero, observado para esses animais, têm potencial para respaldar a respectiva condição morfométrica, uma vez que a formação de vacúolos epiteliais favorece o aumento da proporção epitelial, que, em associação com um lúmen ampliado, resulta no aumento do diâmetro tubular.

Conforme o envelhecimento avança, ocorre uma série de alterações, fisiológicas e morfológicas, sequenciais, que abrangem o estreitamento do lúmen tubular, o qual também torna-se mais suscetível à esclerose, o declínio da atividade espermatogênica, degeneração das células germinativas, além da redução, em quantidade e função, das células de Leydig, denominada de atrofia (Kidd et al. 2001; Harris et al. 2011; Pop et al. 2011; Trindade et al. 2013). Assim, o envelhecimento tem sido amplamente associado à diminuição, em volume e número, das células de Leydig, pela maioria dos estudos reprodutivos (Kaler e Neaves 1978; Neaves et al. 1984; Johnson 1986; Kidd et al. 2001; Harris et al. 2011; Pop et al. 2011), incluindo estudos comparativos entre homens com idades de 20-48 e 50-76 anos, os quais mostraram que o número total médio foi reduzido em 44% no grupo mais velho (Neaves et al. 1984). Entretanto, algumas pesquisas já relataram o aumento na concentração e volume de tais células conforme a idade avança (Singer et al. 1990; Ichihara et al. 1993; Pop et al. 2011; Creasy et al. 2012), associando este evento à elevação nos níveis de hormônio luteinizante, à liberação de fatores parácrinos estimulatórios no interior testicular, ou como resposta compensatória ao declínio do processo espermatogênico. Desse modo, tais evidências suportam os resultados obtidos no presente estudo,

considerando o aumento significativo no volume nuclear e citoplasmático das células de Leydig apresentados pelos animais senis, em relação aos jovens. A hiperplasia das células de Leydig tem sido observada em camundongos com “feminização” testicular, isto é, baixa influência de testosterona, e àqueles associados ao tratamento com estrógenos ou inibidores da 5- α -redutase (Creasy et al. 2012; Trindade et al. 2013).

Ademais observamos que não houve diferença significativa entre o número de células de Leydig por testículo nos animais senis quando comparados aos níveis dos jovens. Similarmente, Neves et al. (2017) ao estudar a influência do envelhecimento masculino sob a estereologia das células de Leydig, notou que a quantidade de células de Leydig por testículo não variou entre os camundongos jovens e senis, assim como estudos realizados por Wang et al. (2012) e Chen et al. (1994). Adicionalmente, Chen et al. (2009) e Koeva et al. (2009) observaram que durante o envelhecimento as células de Leydig desenvolvem problemas nas vias esteroidogênica, resultando na redução da produção hormonal. No entanto, as diminuições nos níveis de testosterona sérica não são acompanhadas por alterações nos níveis de LH sérico, e, portanto, devem ser causadas pelo estímulo prejudicado das células de Leydig. A estimulação de LH tende a aumentar o volume dessas células assim como o número de organelas como o retículo endoplasmático e mitocôndrias, em contraste à privação a qual leva a hipotrofia na estrutura celular (Mendis-Handagama 1997). Chen et al. (2002) ao realizarem um estudo com foco na influência do LH em culturas *in vitro* de células jovens e senis, observaram que mesmo sob tais circunstâncias as células senis foram incapazes de sintetizar testosterona na mesma proporção que as células jovens. Logo, concluiu-se que as células de Leydig senis possuem defeitos na cascata de sinalização LH-AMPC, envolvida na produção de testosterona. O envelhecimento afeta diferentes aspectos intracelulares: redução nos níveis de AMPC, diminuição do transporte intracelular de colesterol pelas proteínas StAR e redução na atividade de enzimas mitocondriais (CYP11A1; HSD3B) e do retículo endoplasmático liso (HSD3B; CYP17A1; HSD17B) (Beattie et al. 2015). Estas condições poderiam explicar o aumento do volume nuclear e citoplasmático, além do grande acúmulo de gotículas de gordura citoplasmáticas, o que observamos nas células de Leydig dos animais do grupo SE.

No presente estudo foram observadas diversas melhorias dos padrões estereológicos testiculares entre os grupos tratados SJI, SJII, SHJI, SHJII, dos quais destacam-se: o aumento do epitélio germinativo, a redução da porção linfática, intersticial, da concentração de macrófagos e de vasos sanguíneos, em comparação aos seus respectivos controles. Além disso, houve uma melhora significativa nos volumes nuclear, citoplasmático e total das células de Leydig, bem como da concentração células por testículo.

Em consideração a tanto, vários estudos já evidenciaram o potencial recuperativo do tratamento de diferentes tipos de extratos naturais para o aparelho reprodutor masculino. Pires et al. (2013) observaram que a ingestão diária de uma dosagem de suco concentrado de uva de 2.36 g/kg melhorou a proporção e a morfologia dos túbulos seminíferos assim como o volume intersticial. Similarmente, Lamas et al. (2015) relataram que o tratamento com suco concentrado de uva melhorou a proporção e a ultraestrutura dos túbulos seminíferos, em ratos Wistar intoxicados com cloreto de cádmio. Além disso, a porcentagem e volume luminal dos túbulos seminíferos aumentaram enquanto o volume intersticial testicular reduziu. Leite et al. (2012) ao tratar ratos Wistar intoxicados com cloreto de cádmio observou que a administração de suco de guaraná auxiliou na recuperação do volume dos túbulos seminíferos bem como do interstício, além da morfologia celular. Gomes e colaboradores (2010) relataram que a administração diária da infusão de *Heteropterys aphrodisiaca* (0.5 ml) durante oito semanas aumentou a proporção de epitélio germinativo saudável bem como a proporção dos túbulos seminíferos nos testículos de ratos Wistar tratados com ciclosporina A. Predes et al. (2010) observaram que o tratamento com extrato de *Ginkgo biloba* em ratos Wistar intoxicados com metais pesados favoreceu a melhora da ultraestrutura testicular, o aumento da proporção de túbulos seminíferos e nestes a quantidade de células de Sertoli saudáveis. Adicionalmente, estes trabalhos assim como o presente estudo indicam que extratos naturais possuem elevado potencial anti-inflamatório e antioxidante, o que favorece a redução do estresse oxidativo tecidual, de modo a auxiliar na recuperação da homeostase tecidual, e, por conseguinte, da estrutura e ultraestrutura dos órgãos.

5.2. Histopatologia Testicular

Entre os animais analisados, desde os controles aos tratados com o ECJ, os grupos SE e SHP, destacaram-se com maior intensidade de alterações histológicas. Os efeitos da senescência sob os órgãos reprodutivos masculinos em mamíferos têm sido analisados principalmente nos testículos. Vários estudos ressaltam como consequência do processo de envelhecimento, o decréscimo espermatogênico e esteroidogênico, além da perda acelerada de células germinativas, resultante do aumento crescente de apoptose celular (Levy e Robaire 1999; Creasy 2001, Mahmood 2008; Creasy et al. 2012). Tais modificações estão intimamente relacionadas à redução nos níveis de andrógeno e/ou ao aumento do estresse oxidativo tecidual (Mahmood 2008; Creasy et al. 2012), o que sustenta as alterações apresentadas pelos animais senis e aqueles senis alimentados com dieta hiperlipídica, no presente estudo.

A patologia testicular mais predominante nos grupos SE e SHP é a degeneração/atrofia tubular. Esta alteração está diretamente associada à senescência, sendo caracterizada pela

degeneração das células germinativas, retenção espermática, vacuolização citoplasmática das células de Sertoli, ocorrência de células germinativas multinucleadas e com grau variável de desorganização, além da exfoliação destas no lúmen tubular e posterior acúmulo de detritos celulares no lúmen epididimal (Creasy et al. 2012; Vidal e Whitney 2014). Estudos prévios demonstraram que a atrofia e degeneração tubular- idade relacionada, tanto em roedores quanto em humanos, inicia-se focalmente, com túbulos atróficos e degenerativos dispostos nas proximidades de túbulos de normal processo espermatogênico (Lanning et al. 2002; Pop et al. 2011; Creasy et al. 2012; Vidal e Whitney 2014). Em concordância, Mahmood (2008) sugere que as mudanças idade-dependentes no epitélio seminífero são intrínsecas ao testículo, ao invés de decorrentes do declínio de fatores regulatórios extrínsecos, como níveis séricos hormonais. Assim, considera-se que em roedores, a degeneração/atrofia tubular seja primariamente desencadeada pela depleção das células espermatogênicas, em associação a alterações vasculares testiculares bem como à problemas funcionais das células de Sertoli, os quais resultam parcial- ou completamente da redução na habilidade destas células em suportar a manutenção e diferenciação do epitélio germinativo (Mahmood 2008; Creasy et al. 2012; Vidal e Whitney 2014). Por conseguinte, as conclusões prévias em relação a tal condição patológica respaldam os resultados atuais do presente estudo, que evidenciaram em animais SE e SHP um elevado grau de desorganização do conteúdo tubular em associação à vacuolização do epitélio germinativo tubular, em comparação aos grupos tratados, SJI, SJII, SHJI, SHJII, entre os quais é notada uma visível redução no processo degenerativo tubular.

Em íntima associação à degeneração/atrofia tubular, tem-se o processo de vacuolização do epitélio seminífero, o qual compreende o indicador morfológico inicial de distúrbios das células de Sertoli (Creasy 2001; Creasy et al. 2012). Por conseguinte, neste estudo, os animais dos grupos SE e SHP apresentaram evidente vacuolização tubular, do tipo macrovacuolização, caracterizada pela ocorrência de grandes vacúolos em qualquer nível do epitélio tubular (Creasy et al. 2012). De acordo com resultados prévios de Creasy (2001), apesar de a vacuolização preceder a degeneração, desorganização e/ou exfoliação do epitélio seminífero, as alterações subsequentes das células germinativas variam conforme o agente causador, sendo este de caráter tóxico ou não. Diversos estudos já relataram uma degeneração gradual e multifocal das células germinativas, acompanhada de agregados espermáticos multinucleados bem como da perda de adesão das células germinativas às células de Sertoli, decorrente da exposição de agentes tóxicos (Creasy et al. 1998; Strandgaard e Miller 1998; Nurmio et al. 2007; La et al. 2012; Heuser et al. 2013). Similarmente a estes, o envelhecimento bem como a ingestão crônica de dieta hiperlipídica também mostram interferir na estrutura seminífera, porém em menor proporção que os eventos de intoxicação, considerando a

ocorrência de vacuolização, degeneração tubular focal, depleção parcial e exfoliação de células germinativas, observadas nos grupos SE e SHP do presente estudo. Em contrapartida, o tratamento com o ECJ resultou na restauração da normalidade do epitélio seminífero, e menor extensão dos eventos patológicos descritos acima, podendo este indicar um efeito benéfico do extrato natural de jabuticaba para a capacidade fértil masculina.

O desprendimento de células germinativas testiculares e seu conseqüente acúmulo na luz epididimal, da região da cabeça e cauda, ocorre, nos animais em idade peripuberal, devido à ineficiência dos primeiros ciclos espermatogênicos. Em contraposição, este evento pode resultar, secundariamente, de lesões no epitélio germinativo testicular, refletindo a contínua degeneração e atrofia testicular, ocasionadas pelo decréscimo androgênico durante o envelhecimento bem como agentes tóxicos (Creasy et al. 2012; Heuser et al. 2013; Vidal e Whitney 2014). Em associação a estes, é relatado o acúmulo de corpos residuais atípicos no epitélio seminífero bem como na região luminal tubular, decorrentes da interrupção da maturação das espermatídes alongadas, além do processamento dos corpos residuais pelas células de Sertoli. Em condições normais, os corpos residuais representam o excesso de conteúdo citoplasmático descartado durante a espermiogênese, sendo posteriormente transportados às células de Sertoli, pelas quais são fagocitados. Por outro lado, o processamento interrompido do remanescente citoplasmático resulta em corpos residuais atípicos, indicando, pois, perda funcional pelas células de Sertoli. Drogas, agentes tóxicos, e o envelhecimento estão intimamente relacionados a esta condição patológica testicular (Creasy 2001; Mahmood 2008; Creasy et al. 2012; Vidal e Whitney 2014). Esses caracteres corroboram a histologia observada nos testículos dos grupos JV, SE e SHP, bem como em seus respectivos tratados, entre os quais é notada uma redução no acúmulo de corpos residuais atípicos nos túbulos seminíferos.

O processo inflamatório consiste, geralmente, na resposta à necrose ou dano tecidual, que no testículo ocorre secundariamente ao rompimento da barreira hemato-testicular (Creasy et al. 2012; Kempinas e Klinefelter 2014). Inúmeros graus de inflamação já foram relacionados a danos testiculares, os quais variam desde acumulação focal à difusa, com abrangência intersticial, epitelial e/ou luminal (Creasy et al. 2012). Os infiltrados inflamatórios, em especial, correspondem ao pequeno acúmulo focal de células inflamatórias, geralmente linfócitos, neutrófilos e plasmócitos, no interstício testicular. Dessa forma, a presença de infiltrados inflamatórios no grupo SHP, evidencia o início do desequilíbrio na homeostase testicular ocasionada pelo envelhecimento e sua associação a uma dieta hiperlipídica (Creasy 2001; Foley 2001; Creasy et al. 2012; Vidal e Whitney 2014). Em contrapartida, a redução dessas desordens nos grupos tratados com ECJ, pode ser atribuída aos compostos fenólicos concentrados no extrato, cujas propriedades anti-

inflamatórias atuam em inúmeros processos biológicos, desde a atividade estrogênica, peroxidação lipídica e inibição enzimática ao aumento da produção de citocinas reguladoras da resposta imune pela inibição da via de NF-kB (Tsuda et al. 2003; Brito et al. 2007; Defuria et al. 2009; Wu et al. 2012), o que já foi observado nos animais SJI, SJII, SHJII e SHJII (resultados e discussão organizados no artigo número 1).

A análise qualitativa testicular deste estudo permite, portanto, apontar o envelhecimento e a dieta hiperlipídica como fatores favorecedores de lesões testiculares, visto que os animais senis, e aqueles senis tratados com dieta hiperlipídica apresentaram etapas iniciais de diferentes desordens testiculares, variando desde a vacuolização epitelial tubular à formação de corpos residuais atípicos. Dessa maneira, as patologias aqui observadas corroboram os dados já existentes na literatura em relação à injúria tecidual no testículo (Creasy 2001; Foley 2001; Lanning et al. 2002; La et al. 2012; Heuser et al. 2013; Vidal e Whitney 2014).

Os animais que receberam o ECJ apresentaram estrutura tecidual testicular com número e intensidade reduzidos de alterações em contraposição aos grupos controle, SE e SHP. É de conhecimento geral que a jabuticaba consiste em uma rica fonte de compostos fenólicos, tais como as antocianinas, altamente concentrados em sua casca (Alejandro et al. 2013). A ingestão crônica dos respectivos compostos está diretamente relacionada a efeitos positivos no metabolismo orgânico (Mullen et al. 2002; Macedo et al. 2013). Este evento deve-se à ação inibitória dos polifenóis sobre enzimas pró-inflamatórias, oxidativas e fatores de proliferação celular, de modo a serem associados, diretamente, às atividades anti-fúngica, antioxidante, anti-tumoral, anti-hemorrágica e anti-inflamatória (Brito et al. 2007; Tsuda et al. 2003; Defuria et al. 2009; Wu et al. 2012; Veggi et al. 2014). Assim, em consideração ao estímulo de processos inflamatórios e de estresse oxidativo pela obesidade e senescência, e em contrapartida, às propriedades fenólicas presentes na casca da jabuticaba, podemos afirmar que a administração do ECJ amenizou os efeitos negativos teciduais nos testículos dos animais senis e daqueles senis alimentados com dieta hiperlipídica.

Ademais, assim como este, outros estudos já associaram a ingestão de compostos antioxidantes à redução de alterações histopatológicas testiculares. Um estudo realizado por Sayed et al. (2014) relatou que a administração do extrato de *Nigella sativa* em ratos da linhagem Sprague-Dawley intoxicados com cloreto de cádmio reduziu os níveis de edema intersticial e degeneração testicular assim como a quantidade de espermátides multinucleadas. Similarmente Obianime e Roberts (2009) observaram que o pré-tratamento com a combinação de antioxidantes (vitamina C+ vitamina E + selênio) em ratos Wistar adultos reverteu inúmeras condições testiculares causadas pela intoxicação com cloreto de cádmio, tais como edema e vacuolização

tubular, necrose de células germinativas, e redução da espermatogênese. Portanto, isso evidencia ainda mais a relevância da utilização de compostos fitoterápicos antioxidantes no tratamento de alterações testiculares de várias causalidades, desde intoxicação à obesidade e o processo natural de envelhecimento do corpo.

5.3. Ultraestrutura Testicular

Nesta pesquisa, observamos que o envelhecimento provoca inúmeras alterações ultraestruturais testiculares. As células de Sertoli apresentaram acúmulo de grânulos de lipofuscina além da presença de grandes vacúolos citoplasmáticos. De fato, várias modificações ultraestruturais e histológicas foram descritas para as células de Sertoli em indivíduos senis. Humphreys (1977) relatou que em ratos senis as células de Sertoli perdiam muitas extensões citoplasmáticas (os pseudópodes), as quais normalmente são responsáveis por manter a saúde e a sobrevivência das células germinativas, o que poderia explicar a falha na espermatogênese bem como na fagocitose dos corpos residuais dos espermatozoides. Segundo Levy et al. (1999) as células de Sertoli de ratos Brown Norway idosos também mostraram uma perda das variações cíclicas das organelas. O núcleo das células é propenso a se tornar mais irregular e perder sua localização típica, estando presente em vários níveis do epitélio seminífero. Além disso, vesículas citoplasmáticas que são comuns ao redor da área nuclear de células de Sertoli tendem a ser mais longas em animais mais velhos. Esse aumento vesicular parece estar diretamente relacionado à redução da área total do retículo endoplasmático das células de Sertoli associada à idade. Ademais, Levy et al. (1999) verificou que conforme o indivíduo envelhece o retículo endoplasmático comporta-se como uma rede vesicular e solta, ao invés da típica rede elaborada, tubular e altamente interconectada observada em células de Sertoli de animais jovens. Similarmente, Jiang et al. (2014) relatou alterações similares a estas para os túbulos seminíferos de homens idosos, cujas células de Sertoli exibiam núcleos sem formato definido, retículo endoplasmático vesicular e lisossomos irregulares. Alguns destes apresentam-se associados a inclusões lipídicas, enquanto outros estão associados à membrana. Adicionalmente, foram observados pela literatura o desenvolvimento de inúmeros espaços intercelulares grandes e vazios, os quais possivelmente eram ocupados pelas células germinativas em desenvolvimento, assim como observamos neste estudo para os animais do grupo SE. Segundo, Levy et al. (1999) tais focos de separação resultam da perda da capacidade das células de Sertoli em decompor os resíduos celulares. Sendo assim, a presença dessas regiões parece refletir a redução das funções biológicas desse tipo celular com o envelhecimento.

Grânulos de lipofuscina foram observados no citoplasma tanto das células de Sertoli como das células germinativas dos animais SE. Em relação a isso, Levy et al. (1999) enfatiza que essa

característica possa decorrer da inabilidade dos lisossomos em degradar os nutrientes e eliminar os produtos dessa digestão parcial e/ou como resultado do acúmulo de estresse oxidativo. Tais alterações também já foram relatadas para o epidídimo de ratos Brown Norway idosos (Serre e Robaire 1998, 1999).

As junções celulares das células de Sertoli também parecem perder sua aparência característica. Em células de Sertoli de indivíduos idosos, as junções oclusivas, a base estrutural da barreira hemato-testicular, são mais raras e frequentemente substituídas por pontos de contato focais (Levy et al. 1999; Jiang et al. 2014). Esta degeneração juncional sugere a presença de uma barreira hemato-testicular danificada, comprometendo o microambiente específico no qual ocorre a espermatogênese. Dessa forma, inúmeras células germinativas são submetidas ao processo de degeneração e são perdidas pelo epitélio seminífero (Levy et al. 1999).

No presente estudo, observamos, nos túbulos seminíferos de animais senis, várias regiões irregulares e espessadas da membrana basal, especialmente àquelas em contato com as células de Sertoli. Apesar de a membrana basal ser de fundamental para a manutenção estrutural e a integridade funcional do tecido germinativo, as informações de alterações morfológicas dessa estrutura ocorridas ao longo do envelhecimento são contraditórias. Alguns estudos apontam que não há modificações na membrana basal com a senescência (Honoré 1978; Johnson et al. 1986). Por outro lado, espessamento e herniação de tal estrutura já foram descritos para homens idosos (Neaves et al. 1984; Jiang et al. 2014), camundongos (Gosden et al. 1982) e outros mamíferos (Elcock e Schoning 1984; Nistal et al. 1986). Um aumento estatisticamente significativo na espessura da membrana basal tubular diretamente correlacionada com a idade foi encontrado nos tecidos epiteliais testiculares e capilares em humanos (Xi et al. 1982) similarmente ao que foi encontrado na presente pesquisa. Um estudo histomorfométrico realizado em testículos em homens de 29 a 102 anos revelou que, em casos de espermatogênese interrompida, ocorre também um espessamento da membrana basal (Dakouane et al. 2005). Levy et al. (1999) também destacou o espessamento da membrana basal tubular como uma das consequências do envelhecimento em ratos Brown Norway. Esse espessamento parece estar relacionado também às mudanças na barreira hemato-testicular em regiões nas quais as células germinativas estão em depleção decorrente do processo experimental de vasectomia (Alexander e Tung 1979) e regressão testicular natural (Pelletier 1986). De acordo com Jiang et al. (2014), células de Sertoli são as principais participantes para a produção e deposição de membrana basal no testículo, e dessa forma a alteração fisiológica das mesmas decorrente do envelhecimento pode ocasionar no espessamento e dobras em tal estrutura basal. Ademais, Serre e Robaire (1998) já ressaltaram que a depleção hormonal decorrente do processo de envelhecimento somado ao espessamento membranar

favorece ao desenvolvimento de pseudópodes das células principais e basais no epitélio epididimal, resultando em dobras na membrana basal. Isso porque a membrana basal espessa dificulta a captação hormonal necessária para o funcionamento celular, de modo que tais células acabam desenvolvendo prolongamentos celulares, o que ocasiona irregularidades membranares peritubulares. Similar a tanto, Kondarewicz et al. (2011) ao administrar inibidor de aromatase mimetizou a depleção de hormônios esteroides em ratos Wistar típica da senescência e relatou alterações na estrutura da membrana basal dos túbulos seminíferos como o espessamento e herniações. Assim, essa alteração artificial indica que a depleção hormonal consequente do envelhecimento tende a ser a causa dessas anomalias na membrana basal. Surpreendentemente, um estudo de Pop et al. (2011) mostrou que a espessura da membrana basal aparentemente diminuiu com a idade em homens, contrariando os outros estudos anteriores. Esse resultado pode ser devido ao uso da técnica de imunomarcagem utilizando anticorpos específicos para membranas basais, ao invés de fixar sais de prata nas fibras de reticulina ou devido à utilização de software de medição em imagens microscópicas digitalizadas, evitando erros humanos, para uma análise mais precisa. Contudo, este estudo usou amostras cirúrgicas de tecido testicular de pacientes com adenocarcinoma de próstata, fator que deve ser contabilizado para uma relevante fonte de viés.

Em relação às alterações ultraestruturais decorrentes do envelhecimento associadas à ingestão de dieta hiperlipídica, não há estudos, o que destaca nossa pesquisa como a primeira neste campo. Observamos que os animais do grupo SHP apresentam vários agravamentos das condições histopatológicas estruturais e ultraestruturais exibidas pelos animais senis. Tais animais exibiram um aumento não só nos níveis histopatológicos de degeneração celular como também na presença de regiões de separação intercelular. Esses dados convergem com o aumento na proporção do epitélio e lúmen tubulares em comparação aos animais senis.

Sabe-se que a obesidade está intimamente relacionada à ativação e aumento de processos inflamatórios locais e sistêmicos (Angelopoulou et al., 2009; Adewoyin et al., 2017), através da síntese de citocinas pró-inflamatórias, como TNF α e IL-17, bem como ao aumento do estresse oxidativo, como já fora observado no artigo número 1 deste trabalho, além de amplamente discutido na literatura (Vigueras-Villaseñor 2011; Sharma et al. 2015; Asadi et al. 2017; Fan et al. 2018). Em concordância, a inflamação agravada pela condição de sobrepeso leva a um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, que sobrecarregam a atividade antioxidante endógena e, conseqüentemente, o aumento do estresse oxidativo. Portanto, por essa via, o sobrepeso afeta toda a homeostase intracelular, resultando no aumento dos espaços de separação intercelular assim como na degeneração das células germinativas.

Em nosso estudo, observamos que o tratamento com o extrato da casca de jabuticaba reestabeleceu a integridade do epitélio germinativo nos camundongos senis. Dessa forma, os animais dos grupos SJI, SJII, SHJI e SHJII apresentaram melhoras no tamanho e na regularidade da membrana basal, redução na proporção dos espaços intercelulares, bem como na presença de vacúolos citoplasmáticos nas células de Sertoli e germinativas. Adicionalmente, a barreira hemato-testicular e as junções oclusivas entre as células de Sertoli adjacentes aparecem mais bem estruturadas nesses grupos.

Além disso, é possível observar mais integridade das estruturas acima discutidas de maneira dose-dependente, ou seja, os testículos dos animais SJII e SHJII exibiram menor nível de degeneração quando comparados aos animais SJI e SHJI, respectivamente. Dessa forma, as análises ultraestruturais acompanham os resultados histopatológicos, de modo que a ingestão da dose dobrada do extrato da casca de jabuticaba favorece uma melhor recuperação testicular ultraestrutural e patológica.

Muitas investigações foram feitas sobre o efeito de compostos ricos em polifenóis na integridade do sistema reprodutor masculino (Gomes et al. 2011; Predes et al. 2011; Lamas et al., 2015, 2017; Zheng-mei et al., 2015; Simas et al., 2017). No entanto, a maioria dos que tomam essa abordagem se concentra no efeito dos compostos fenólicos na melhoria do sistema antioxidante endógeno, bem como na contagem e viabilidade espermática (Reddy et al. 2016; Adewoyin et al. 2017; Simas et al. 2017). Gomes et al. (2011) relatou que a ingestão diária do chá de *Heteropterys afrodisiaca* por 56 dias, melhorou a contagem de células germinativas bem como células de Sertoli combinadas à redução no índice apoptótico bem como nos níveis de estresse oxidativo testicular para os ratos Wistar adultos tratados com ciclosporina A. Predes et al. (2011) observaram que a ingestão diária do extrato de *Ginkgo biloba* durante 56 dias reduziu a degeneração dos túbulos seminíferos assim como o nível de vacuolização nas células de Sertoli e germinativas nos testículos de ratos Wistar adultos intoxicados com cloreto de Cádmio. Lamas et al. (2015) relataram que o suco de uva concentrado reduziu os espaços intercelulares no epitélio germinativo, assim como a quantidade e o tamanho dos vacúolos citoplasmáticos nas células de Sertoli em ratos Wistar adultos intoxicados com cloreto de cádmio. Além disso, a administração de suco de uva melhorou a integridade da barreira hemato-testicular além das junções oclusivas entre células de Sertoli adjacentes (Lamas et al. 2015). Similarmente, Lamas et al. (2017) evidenciou que o tratamento crônico com suco de uva concentrado favoreceu a redução de pontos focais de separação intercelular no epitélio epididimal de ratos Wistar adultos intoxicados com cloreto de cádmio, além de reduzir o grau de má-formação espermática e o nível de peroxidação lipídica neste microambiente analisado. Reddy et al. (2016) observaram que a administração de resveratrol

melhorou a atividade antioxidante endógena nos testículos e epidídimos, bem como a contagem de espermatozoides e a viabilidade em ratos Wistar contaminados com cisplatina. Da mesma forma, Simas et al. (2017) observaram que a administração de resveratrol melhorou os níveis de óxido nítrico e malonaldeído nos tecidos reprodutivos, bem como a contagem de espermatozoides e morfologia em ratos Wistar com diabetes tipo I. Por sua vez, Zheng mei et al. (2015) relataram que a administração de compostos fenólicos em camundongos obesos reduziu a inflamação, bem como os níveis de estresse oxidativo no tecido adiposo branco do epidídimo.

5.4. Análises Moleculares de Western Blotting: ER α , AR, Aromatase e PCNA

Os estrógenos e andrógenos são considerados os reguladores mais relevantes para um bom desenvolvimento e manutenção do aparelho reprodutor masculino. Por sua vez, os efeitos fisiológicos do estradiol e testosterona são modulados pelos receptores de estrógeno (ER) e andrógeno (AR), respectivamente (Lazari et al. 2009; Carreau et al. 2011; Joseph et al. 2011; Banerjee et al. 2012). No testículo, o ER α e AR estão expressivamente presentes nas células de Sertoli e Leydig, nas quais são fundamentais para a homeostase celular bem como à sobrevivência e proliferação, e, por conseguinte, à funcionalidade do processo espermatogênico. Desse modo, ambos são de suma relevância para a manutenção do epitélio germinativo testicular (Wang et al. 2005).

Estudos anteriores propõem uma correlação direta entre o envelhecimento e decréscimo na produção de testosterona sérica e intratesticular (Syntin e Robaire 2001; Perrheentupa e Huhtaniemi 2009), resultando na redução esteroidogênica pelas células de Leydig. Contudo, poucos são os estudos que abrangem a influência do envelhecimento na expressão e atividade dos receptores hormonais (AR e ER α). Banerjee et al. (2012) associam o declínio nos níveis de testosterona sérica em camundongos senis ao aumento da taxa apoptótica de células germinativas, e assim ao declínio espermatogênico assim como proposto por Wang et al. (2005). Além disso, Banerjee e colaboradores (2012) propõem uma significativa correlação entre as mudanças nos níveis de testosterona circulante com a expressão de ER α no testículo de animais senis. Segundo estes, o declínio de ER α é responsável pelo aumento de apoptose celular, resultando na redução do epitélio germinativo.

No presente estudo, os animais senis exibiram uma redução nos níveis de ER α , AR, Aromatase bem como da taxa proliferativa (medido pelo PCNA). A diminuição dos receptores de andrógeno pode ser usada como indicativo da queda nos níveis de testosterona intratesticular, considerando que os primeiros respondem diretamente às alterações na concentração de andrógenos, circulante e tecidual (Nelson et al. 1975; Handelsman et al. 2006; Santiago et al.

2018). Por fim, a depleção esteroidogênica resultou no desenvolvimento de severas alterações ultraestruturais e histopatológicas testiculares. Essa cascata de eventos envolve uma diminuição do efeito estimulatório androgênico na manutenção do epitélio germinativo, o que reduz o efeito protetor celular contra a apoptose e resulta em uma redução progressiva da funcionalidade epitelial e um aumento na taxa de morte celular.

Apesar da evidente importância da aromatase para o aparelho reprodutor masculino, poucos são os estudos acerca de problemas na sua funcionalidade, dos quais se destacam os estudos com camundongos knockout para esta enzima (ArKO). Robertson et al. (1999) ao desenvolverem camundongos machos ArKO observaram que estes eram inicialmente férteis, porém tornaram-se inférteis progressivamente até que sua capacidade de gerar espermatozoides fosse severamente prejudicada. Além disso, a espermatogênese dos machos ArKO ficou parada no início dos estágios espermiogênicos a partir 4 meses e meio de idade. Esse evento foi acompanhado de hiperplasia e hipertrofia das células de Leydig, provavelmente como consequência do aumento do LH circulante. Similarmente, Smith e colaboradores (1994) associaram a deficiência em aromatase à deficiência em ER α com atrofia testicular, baixa taxa de motilidade e contagem de espermatozoides em homens na idade reprodutiva assim como Hess et al. (1997). Bilezikian et al. (1998) ressaltaram que homens deficientes em aromatase apresentam baixa densidade óssea bem como resistência à insulina. Sendo assim, a funcionalidade da aromatase parece ser fundamental para toda a fisiologia masculina, não apenas para o aparelho reprodutor. No entanto, a relação entre essas alterações é pouco compreendida.

Inúmeros estudos já relataram a importância das células de Sertoli para a espermatogênese (Walker et al. 1995; Lucas et al. 2008; Shupe et al. 2011; Royer et al. 2012; Bulun et al. 2014). De acordo com Royer et al. (2012), o ER α , através da regulação por estradiol, ativa a via SRC-MAPK3/1, que por sua vez, exerce uma relevante função na fisiologia das células de Sertoli. Lucas et al. (2010) observaram que a ativação da via SCR/MAPK3/1 está envolvida na proliferação e apoptose das células de Sertoli, bem como na liberação luminal dos espermatozoides. Em associação, a fosforilação de MAPK3/1 (via das proteínas quinases 1/3 ativadas por mitógeno), induzida pelo ER α , está diretamente envolvida na manutenção das junções Sertoli-Sertoli, Sertoli-matriz e Sertoli-células germinativas (Chapin et al. 2001), promovendo a estruturação do epitélio germinativo. Além disso, outros trabalhos relataram a paralisação da espermatogênese em camundongos knockout para ER α (Eddy et al. 1996; Lazari et al. 2009). Em concordância, no presente estudo, foi observado, que a redução de ER α nos testículos de camundongos senis está intimamente associada a uma elevada degeneração do epitélio germinativo, acompanhada por menor contagem de espermatozoides. Esses resultados tornam mais evidente à necessidade da

sinalização ER α -dependente para a viabilidade das células germinativas, provavelmente por suportarem a homeostase do microambiente das células de Sertoli.

Em suma, fenótipos de machos knockout para ER α e aromatase indicam o papel crítico do estrógeno na produção e função espermática bem como na estruturação testicular. No entanto, devido a quantidade extremamente limitada de estudos em homens com mutações na aromatase ou nos genes do ER α , as funções do estrógeno no aparelho reprodutor masculino ainda não são bem compreendidas.

Como já discutido anteriormente, o balanço entre os receptores de andrógeno e estrógeno (ER α) é essencial para uma equilibrada reabsorção de fluídos pelo epitélio epididimal. A redução na densidade de ambos favorece alterações funcionais que resultam em consequências histopatológicas testiculares (Hess e Nakai 2000; Joseph et al. 2011; Hess et al. 2014). De acordo com Hess et al. (2014) a diminuição na atividade de ambos os receptores resulta em um desequilíbrio iônico de Na⁺/Cl⁻ no fluído luminal do epidídimo, o que contribui para a maior diluição de seu conteúdo. Com essa falha, a capacidade de drenagem dos ductos eferentes ao epidídimo é excedida, de modo a refletir em um aumento na pressão de fluídos para o lúmen dos túbulos seminíferos. Assim, esse processo favorece a atrofia e dilatação dos túbulos testiculares, como também foi observada no presente trabalho frente à redução de AR e ER α .

Embora as análises de taxa apoptótica não tenham sido realizadas até o atual momento, foi observada uma expressiva correlação entre a redução de ER α , PCNA testicular, e inúmeros padrões histopatológicos. O PCNA consiste em um marcador molecular nuclear para a proliferação celular, que, em tecidos como o testículo, com altas taxas mitóticas, normalmente apresentaria elevada concentração. No entanto, os animais senis exibiram uma redução na densidade de PCNA, resultado este que concorda com os caracteres morfométricos e histopatológicos testiculares, ressaltando a degeneração tubular, em diferentes graus, associada à redução na altura do epitélio tubular bem como à marcante depleção de células germinativas. Dessa forma, é possível enfatizar a clara eficiência da ação dos receptores de andrógenos e estrógeno α na preservação de um epitélio germinativo regular necessário para a manutenção da função reprodutiva e fertilidade masculina.

Em contrapartida ao resultado obtido pelos indivíduos senis, os animais que receberam uma dieta hiperlipídica exibiram um aumento, significativo, na densidade de AR, ER α , Aromatase e PCNA no tecido testicular. Essa condição pode ser atribuída, assim como para o epidídimo, à alimentação rica em gordura saturada, pela qual maior será a oferta de moléculas de colesterol necessárias para a síntese de esteroides, contribuindo, assim, para uma maior síntese de receptores de andrógeno e estrógeno. Contudo, este dado não pode ser considerado um indicativo de recuperação estrutural e fisiológica testicular, uma vez que tanto indivíduos senis como os senis

com sobrepeso compartilharam parâmetros patológicos e ultraestruturais muito similares. Apesar da visível correlação entre sobrepeso, aumento na concentração de receptores hormonais e alterações testiculares funcionais, não existem estudos que abordem tal associação. Dessa maneira, o presente trabalho pode ser ressaltado como o pioneiro nesse âmbito de pesquisa.

Por sua vez, o tratamento com o ECJ melhorou os níveis de AR, ER α , Aromatase e PCNA. Somando-se a estes resultados, observamos também que os animais que receberam o extrato apresentaram testículos com uma morfologia mais íntegra, com menor proporção de degeneração bem como de edema intersticial, além de exibir um epitélio germinativo com células saudáveis e com as interações célula-célula bem visíveis. Sendo assim, a administração com o ECJ proporcionou melhoras desde intracelulares aos hormonais, o que refletiu na homeostase tecidual.

Figuras e Legendas

Tabela 3. Biometria animal e testicular (média \pm desvio padrão).

PARÂMETROS	JV	SE	SHP	SJI	SJII	SHJI	SHJII
Ganho de peso corporal (g)	2.342 \pm 0.4357	-1.354 \pm 1.333a*	10.20 \pm 0.8848b***	-2.553 \pm 0.9765	-3.280 \pm 1.544	3.336 \pm 0.7204c**	0.01333 \pm 1,01c***
Peso corporal final (g)	29.60 \pm 0.3938	35.70 \pm 1.306a***	43.66 \pm 0.9713b***	31.5 \pm 0.8352b*	30.82 \pm 0.9593b*	38.34 \pm 1.433c*	34.66 \pm 1.575c**
Peso absoluto testicular (g)	110.9 \pm 3.751	94.91 \pm 4.558a*	106.5 \pm 2.411b*	85.14 \pm 8.866	84.7 \pm 8.803	96.38 \pm 2.562	94.64 \pm 3.302c*
IGS (%)	0.3849 \pm 0.0075	0.2707 \pm 0.0258a***	0.2571 \pm 0.0087	0.2996 \pm 0.0246	0.3160 \pm 0.0089	0.2835 \pm 0.0154	0.2874 \pm 0.0183

IGS, índice gonadossomático; JV, grupo jovem; SE, grupo senil; SHP, grupo senil+dieta hiperlipídica; SHJI, grupo senil+dieta hiperlipídica+ECJ, dose1; SHJII, grupo senil+dieta hiperlipídica+ECJ, dose2; SJI, grupo senil+ECJ, dose1; SJII, grupo senil+ECJ, dose2. (n=8). Diferença significativa foi encontrada para os seguintes: ^arelativo ao grupo JV; ^brelativo ao grupo SE; ^crelativo ao grupo SHP. Considerar: *p<0.05; **p<0.01 and *** p<0.001.

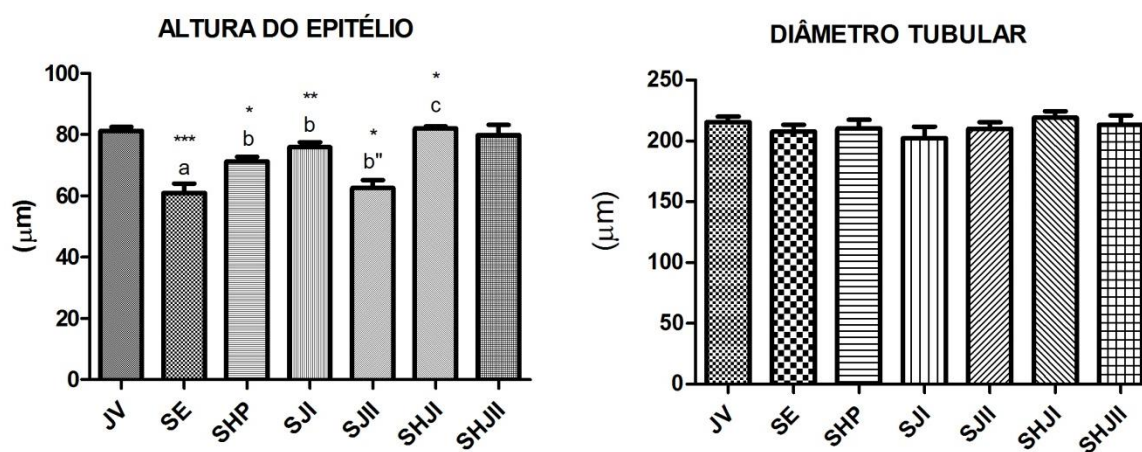


Figura 11. Diâmetro e altura tubular média do testículo dos grupos experimentais. Diferença significativa: ^arelativo ao grupo JV; ^brelativo ao grupo SE; ^{b"} relativo ao SJI; ^crelativo ao grupo SHP. Considerar: *p<0.05; **p<0.01 and *** p<0.001.

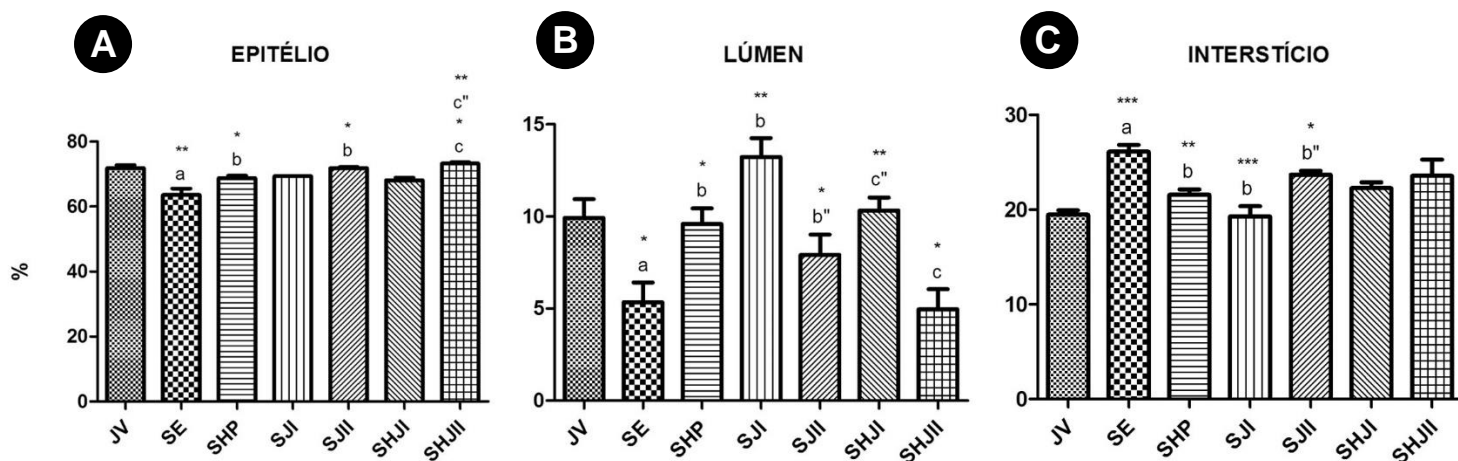


Figura 12. Dados estereológicos testicular dos grupos experimentais. (A): Proporção média do epitélio germinativo. (B): Proporção média do lúmen tubular. (C): Proporção média do interstício. Diferença significativa: ^arelativo ao grupo JV; ^brelativo ao grupo SE; ^{b'}relativo ao SJI; ^crelativo ao grupo SHP; ^{c'}relativo ao SHJI. Considerar: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

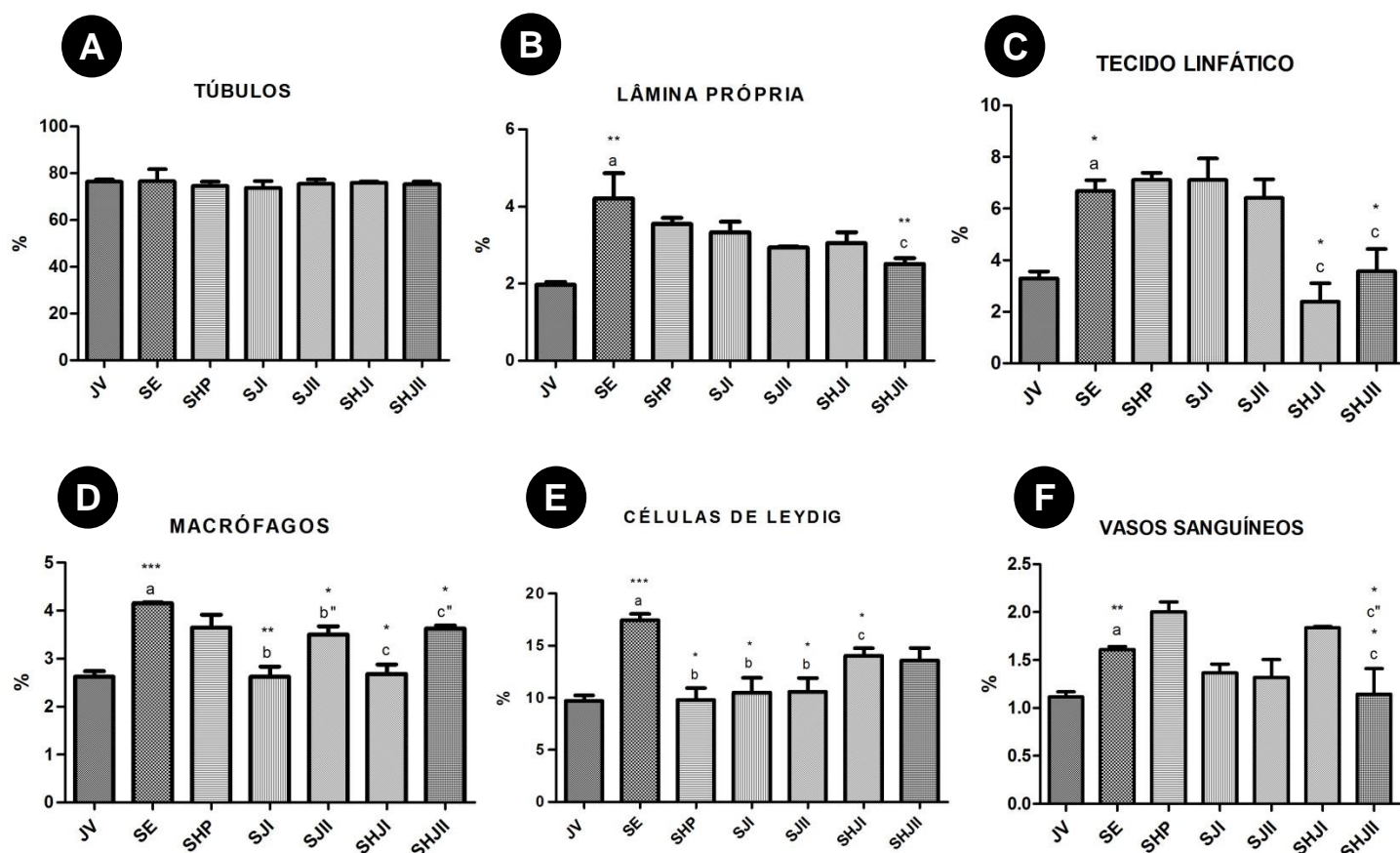


Figura 13. Análise estereológica dos componentes intersticiais do testículo nos grupos experimentais. (A): Proporção dos túbulos seminíferos. (B): Proporção de lâmina própria. (C): Proporção de tecido linfático. (D): Proporção de macrófagos. (E): Proporção de células de Leydig. (F): Proporção de vasos sanguíneos. Diferença significativa: ^arelativo ao grupo JV; ^brelativo ao grupo SE; ^{b'}relativo ao SJI; ^crelativo ao grupo SHP; ^{c'}relativo ao SHJI. Considerar: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Tabela 4. Dados estereológicos das células de Leydig nos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	JV	SE	SHP	SJI	SJII	SHJI	SHJII
Núcleo μm^3	432,8 ± 78,16	584,8 ± 62,43 a*	765,6 ± 123 b*	384,9 ± 111,8 b*	323,1 ± 72,68 b**	420,1 ± 66,27 c***	405,5 ± 20,16 c***
%	24,21 ± 4,301	27,41 ± 1,083	30,08 ± 1,384 b*	26,79 ± 3,955	29,60 ± 4,618	30,32 ± 2,224	27,83 ± 4,530
Citoplasma μm^3	1177 ± 158,5	1604 ± 247 a*	1981 ± 219,4	1357 ± 342,2 b*	711,2 ± 203,3 b**	1019 ± 248,1 c***	1198 ± 110,2 c**
%	64,99 ± 13,55	72,36 ± 1,074 a*	70,38 ± 1,421 b*	73,21 ± 3,955	71,14 ± 4,750	69,68 ± 2,224	72,17 ± 4,53
Volume individual da célula de Leydig μm^3	1593 ± 224,1	2189 ± 329,3 a*	2752 ± 325,2	1756 ± 378,9	1006 ± 289,6 b** b**	1439 ± 313 c***	1499 ± 226,7 c***
Nº de células de Leydig/Testículo 10^6	7,035 ± 1,842	7,546 ± 1,676	4,201 ± 0,8711 b**	11,68 ± 1,860 b*	10,14 ± 1,171	10,12 ± 0,2706 c***	10,65 ± 1,131 c***
Nº de células de Leydig/g de testículo 10^6	68,94 ± 23,44	84,17 ± 11,31	38,71 ± 6,234 b***	112,8 ± 1,258	99,21 ± 25,34	102,1 ± 21,28 c***	105,7 ± 10,74 c***

Diferença significativa: a relativo ao grupo JV; b relativo ao grupo SE; b* relativo ao SJI; c relativo ao grupo SHP; c* relativo ao SHJI. Considerar: *p<0.05; **p<0.01 and *** p<0.001.

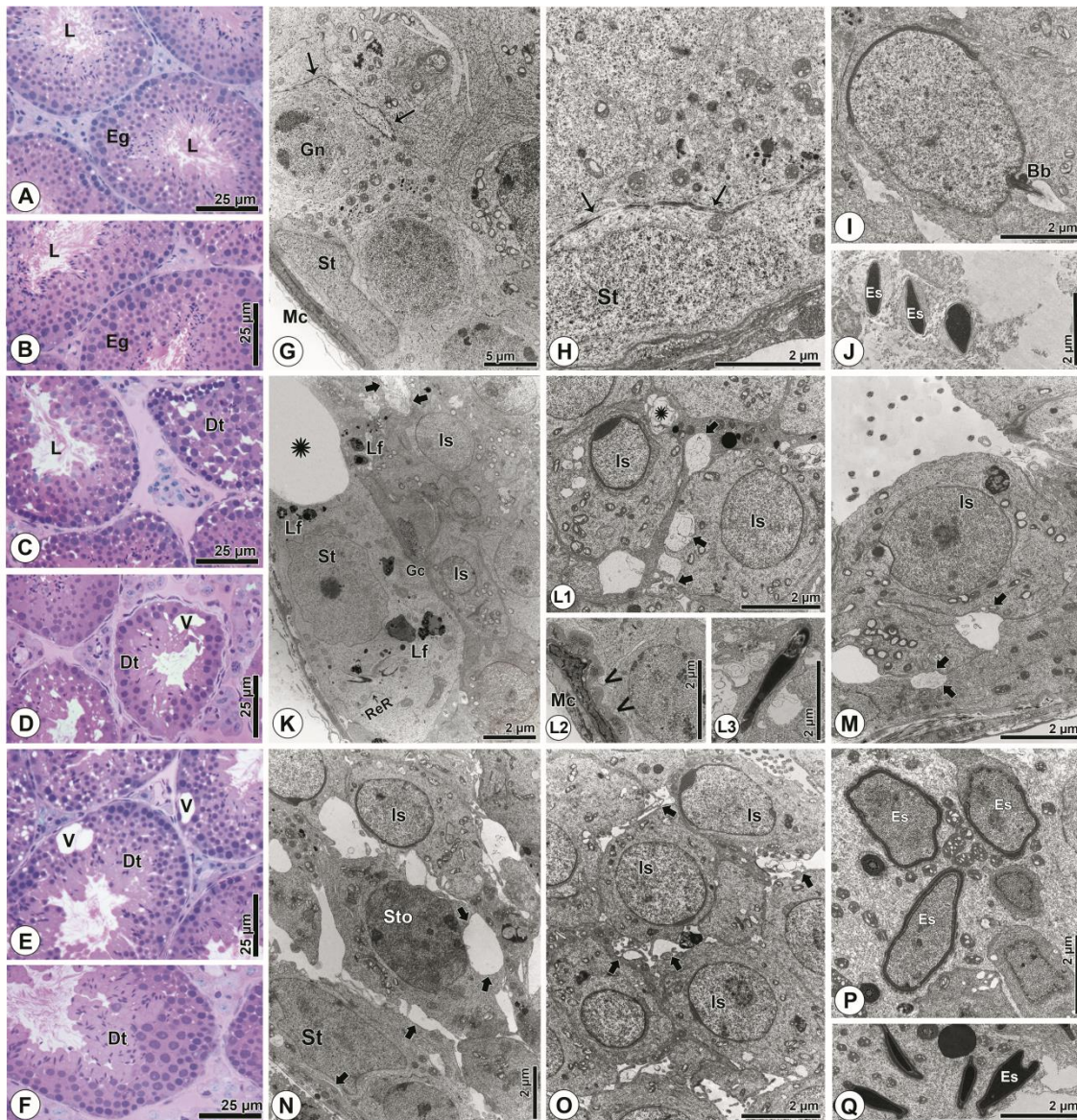


Figura 14. Micrografias de luz e eletrônicas de transmissão do testículo dos grupos experimentais deste estudo. (A-F): Micrografias de luz. (A-B): Grupo JV. (C-D): Grupo SE. (E-F): Grupo SHP. (G-Q): Micrografias eletrônicas de transmissão. (G-J): Grupo JV. Notar a integridade do epitélio germinativo e da barreira hemato-testicular (seta fina). (K-M): Grupo SE. Notar a degeneração do epitélio germinativo, considerando a presença de grânulos de lipofuscina (Lf), grandes vacúolos citoplasmáticos (asterisco), vários focos de separação intercelular (seta grossa) e herniações na membrana basal (cabeça de seta). (L3): Espermátide alongada com danos na porção nuclear. (N-Q): Grupo SHP. Notar a degeneração epitelial, desde a base do túbulo seminífero com numerosos focos de separação celular (seta grossa). Bb (corpo basal); Dt (túbulo em degeneração); Eg (epitélio germinativo); Es (espermátides alongadas); Gc (complexo de Golgi); Gn (espermatogônias); Is (espermátides arredondadas); L (lúmen); Mc (célula mioide); ReR (retículo endoplasmático rugoso); St (célula de Sertoli); Sto (Espermatócito); V (vacuolização).

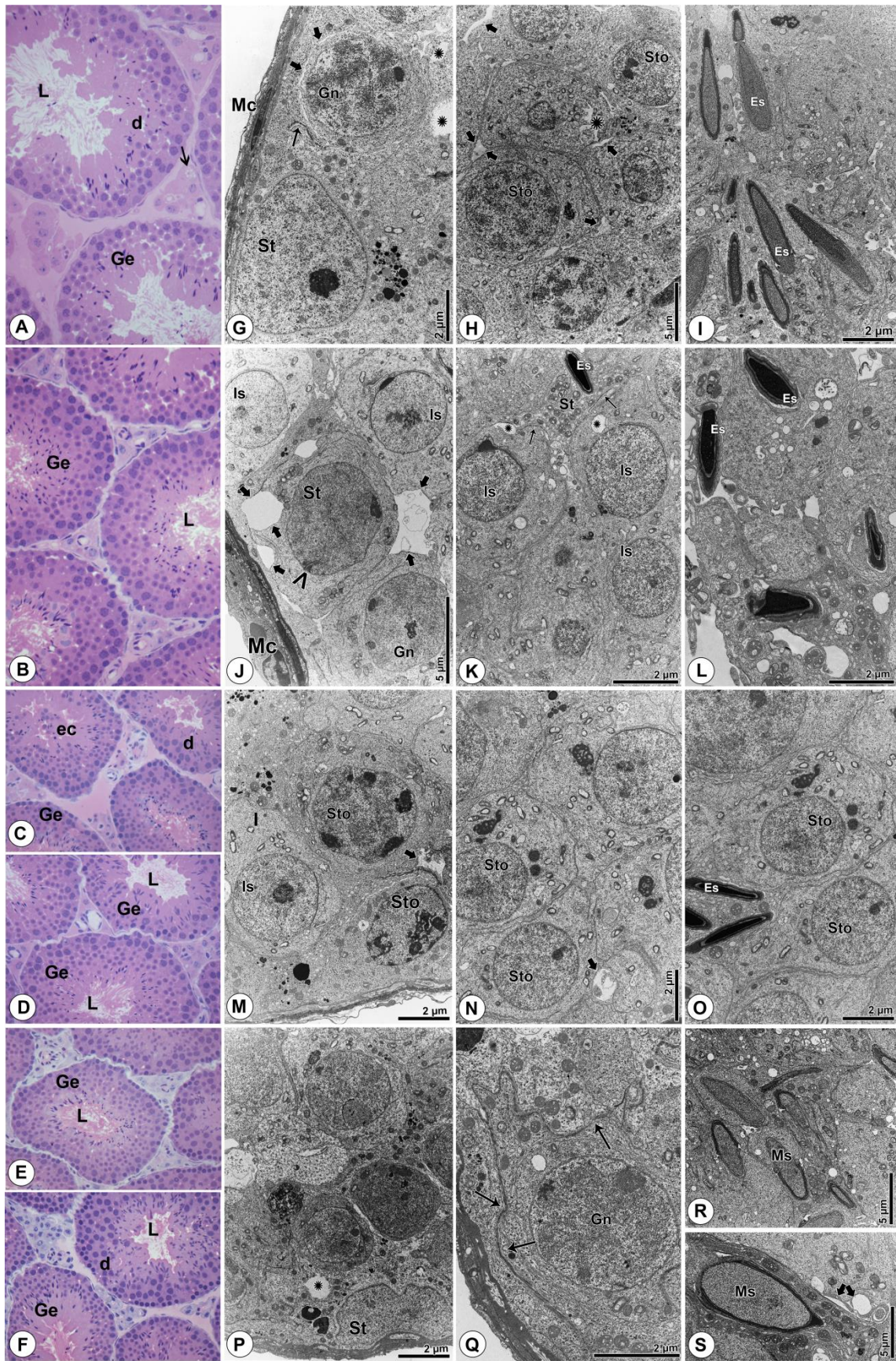


Figura 15. Micrografias de luz e eletrônicas de transmissão do testículo dos grupos experimentais deste estudo. (A-F): Micrografias de luz. (A): Grupo SJI. (B): Grupo SJII. (C-D): Grupo SHJI. (E-F): Grupo SHJII. (G-S): Micrografias eletrônicas de transmissão. (G-I): Grupo SJI. Notar a integridade do epitélio germinativo e da barreira hemato-testicular (seta fina). (J-L): Grupo SJII. Notar alguns pontos focais de separação celular na base tubular (seta grossa) além da integridade da barreira hemato-testicular (seta fina) e da presença de espermatogônias com visíveis complexos sinaptonêmicos ainda presentes na cromatina (cabeça de seta). (M-O): Grupo SHJI. Notar melhora na integridade epitelial assim como na morfologia celular. (P-S): Grupo SHJII. Notar integridade epitelial, incluindo a barreira hemato-testicular (seta fina). Dt (túbulo em degeneração); Ge (epitélio germinativo); Ec (esfoliação celular); Es (espermátides alongadas); Gn (espermatogônias); Is (espermátides arredondadas); L (lúmen); Mc (célula mioide); St (célula de Sertoli); StO (Espermatócito).

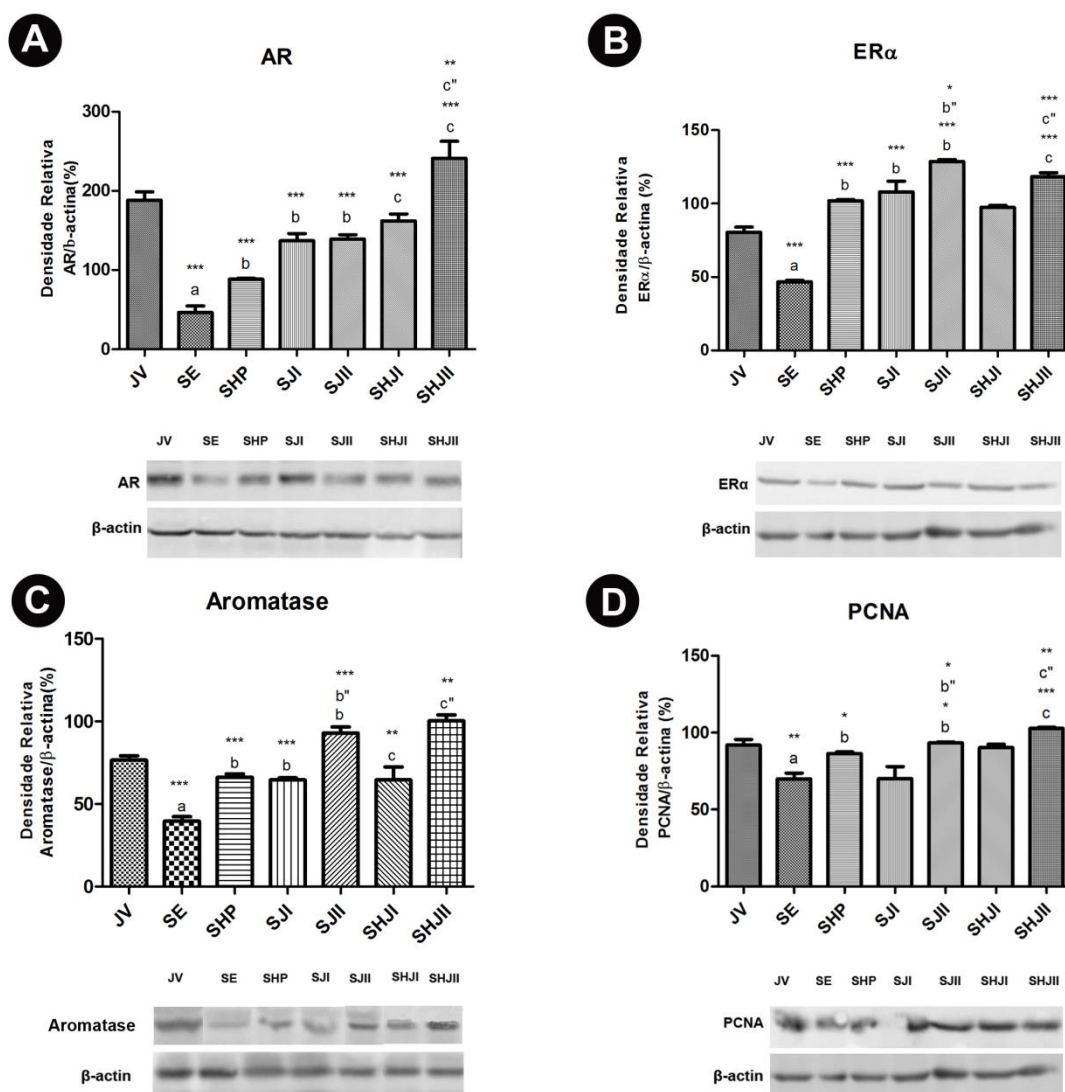


Figura 16. Análise em Western blotting dos níveis de ER α , AR, Aromatase e PCNA no testículo dos grupos experimentais. (A): AR. (B): ER α . (C): Aromatase. (D): PCNA. Diferença significativa: ^arelativo ao grupo JV; ^brelativo ao grupo SE; ^{b''}relativo ao SJI; ^crelativo ao grupo SHP; ^{c''}relativo ao SHJI. Considerar: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS DA TESE

- O envelhecimento provocou uma série de alterações nos órgãos estudados. Alterações estas que abrangem:
 - (1). Má formação espermática; espessamento da membrana basal dos túbulos seminíferos bem como do epitélio epididimal (tanto na cabeça como na cauda); separação celular difusa tanto no testículo como no epidídimo, e desintegração da barreira hemato-testicular e hemato-epididimária. Além disso, um acúmulo de grânulos de lipofuscina foi observada nas células de Sertoli e nas células epididimais (principais e clara).
 - (2): Intensificação de várias alterações histopatológicas como vacuolização epitelial (no testículo e epidídimo); necrose celular, infiltrados inflamatórios, hipertrofia de células clara e cariomegalia (no epidídimo).
 - (3). Redução na atividade das enzimas do sistema antioxidante endógeno, que somada ao aumento da peroxidação lipídica provocou o aumento do estresse oxidativo.
 - (4). Aumento do processo inflamatório tecidual, pelo aumento nos níveis de IL-17, NF- κ B, TNF- α , os quais somados ao aumento nos níveis de COX-2 e ao estresse oxidativo, provocou toda a série de disfunções e alterações morfológicas observadas no testículo e epidídimo.
- A ingestão de uma dieta hiperlipídica pelos animais idosos agravou algumas disfunções já acarretadas pelo envelhecimento:
 - (1). Altura epitelial epididimal não uniforme; aumento na deposição de detritos celulares no lúmen do epidídimo.
 - (2). Aumento da peroxidação lipídica que juntamente com o aumento nos níveis de IL-17, NF- κ B e TNF- α , indicam um aumento no processo inflamatório tecidual.
 - (3). Aumento na atividade da enzima aromatase, juntamente com os níveis de AR e ER α , indicando que a má alimentação somada ao sobrepeso, afetam o processo de aromatização da testosterona em estrógeno, o que pode favorecer a condição de hipogonadismo.
- O tratamento com o extrato da casca de jabuticaba melhorou em diferentes aspectos os órgãos analisados:
 - (1). Reduziu o processo inflamatório, pela diminuição nos níveis de IL-17, NF- κ B, TNF- α .
 - (2). Reduziu os níveis de peroxidação lipídica, juntamente aos níveis de COX-2, além de ter aumentado os níveis das enzimas antioxidantes endógenas, o que por sua vez reduziu o processo de estresse oxidativo.

- (3). Reestabeleceu os níveis de aromatase, de ER α e PCNA para próximo dos níveis apresentados pelos animais jovens.
- (4). Reestabeleceu a quantidade bem como o volume das células de Leydig para próximo dos valores exibidos pelos animais jovens.
- (3). Reduziu a proporção das condições histopatológicas, tanto epididimais como testiculares.
- (4). Melhorou a ultraestrutura tanto do epitélio testicular como epididimal, bem como dos espermatozoides.

Dessa forma, a administração do extrato da casca de jabuticaba pode potencialmente atuar como um tratamento para melhorar as condições funcionais do testículo e epidídimo ao longo do envelhecimento, o qual por se tratar de compostos fitoterápicos, pode ser aplicado para os seres humanos. Especialmente a fim de melhorar a qualidade de vida de indivíduos, cuja expectativa de vida tem aumentado progressivamente. Além disso, esse tipo de tratamento auxiliaria no processo de concepção, especialmente por conta dos casais estarem gradativamente adiando o início da paternidade e maternidade. Adicionalmente, esse tipo de tratamento auxiliaria, não só na manutenção de um microambiente viável para a reprodução como para a geração de espermatozoides saudáveis e com menos interferências dos processos inflamatórios e oxidativos, comumente intensificados pelo envelhecimento, os quais tendem a prejudicar o desenvolvimento espermático, e gerar proles com problemas de saúde após o nascimento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS DA TESE

- Adamali, H. I., Hermo, L. (1996). Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *J. Androl.* 17, 208–222.
- Adewoyin, M., Ibrahim, M., Roszaman, R., Isa, M. L. M., Alewi, N. A. M., Rafa, A. A. A., Anuar, M. N. N. (2017). Male infertility: The effect of natural antioxidants and phytochemicals on seminal oxidative stress. *Diseases* 5(1), 9-19.
- Afaq, F., Saleem, M., Krueger, C.G., Reed, J.D., Mukhtar, H. (2005). Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates mapk and nf-kappab pathways and inhibits skin tumorigenesis in cd-1 mice. *Int. J. Cancer* 113, 423–433. Doi: 10.1002/ijc.20587.
- Agarwal, A., Durairajanayagam, D., Halabi, J., Peng, J., Levin, M.V. (2014). Proteomics, oxidative stress and male infertility. *Reprod. Biomed. Online* 29, 32–58.
- Agarwal, A., Makker, K., Sharma, R. (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol.* 59, 2–11.
- Agarwal, A., Sekhon, L.H. (2010). The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Hum. Fertil. (Camb)* 13, 217–225.
- Agarwal, A., Sekhon, L.H. (2011). Oxidative stress and antioxidants for idiopathic oligoasthenoteratospermia: Is it justified?. *Indian. J. Urol.* 27, 74-85.
- Agarwal, A., Sharma, R.K., Nallella, K.P., Thomas, Jr. A.J., Alvarez, J.G., Sikka, S.C. (2006). Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil. Steril.* 86, 878–885.
- Aitken, R.J., Gibb, Z., Baker, M.A., Drevet, J., Gharagozloo, P. (2016). Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reprod. Fertil. Develop.* 28, 1–10. Doi:10.1071/RD15325
- Aitken, R.J., Smith, T.B., Jobling, M.S., Baker, M.A., De Jullis, G.N. (2014). Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J. Androl.* 16, 31–8.
- Alexander, N.J., Tung, K.S.K. (1979). Vasectomy in the rabbit: immunological and morphological effects. In: Lepow I.H., Crozier R., (Eds.). *Vasectomy, Immunologic and Patho-physiologic Effects in Animal and Man*. New York: Academic Press 355–405.
- Alezandro, M.R., Granato, D., Genovese, M.I. (2013). Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg), a Brazilian grape-like fruit, improves plasma lipid profile in streptozotocin-mediated oxidative stress in diabetic rats. *Food Res. Inter.* 54 650-659.
- Alio, A.P., Salihu, H.M., McIntosh, C., August, E.M., Weldeselasse, H., Sanchez, E. (2012). The effect of paternal age on fetal birth outcomes. *Am J Mens Health.* 6, 427–35.
- Allen, J.A., Diemer, T., Janus, P., Hales, K.H., Hales, D.B. (2004). Bacterial endotoxin lipopolysaccharide and reactive oxygen species inhibit Leydig cell steroidogenesis via perturbation of mitochondria. *Endocrine* 25, 265–275.
- Alvarez, J. G., Touchstone, J. C., Blasco, L., Storey, B. T. (1987). Spontaneous lipid peroxidation and production of
- Amaral, S., Amaral, A., Ramalho-Santos, J. (2013). Aging and male reproductive function: a mitochondrial perspective. *Front. Biosci. (Schol Ed)* 5, 181–197.
- Angelopoulou, R., Giagkos, L., Panagiota, M. (2009). ROS in the aging male: model diseases with ROS-related pathophysiology. *Reproductive Toxicol.* 28 167-171.
- Anhê, G.F., Okamoto, M.M., Kinote, A., Sollon, C., Lellis-Santos, C., Anhê, F.F., Lima, G.A., Hirabara, S.M., Velloso, L.A., Bordin, S., et al. (2012). Quercetin decreases inflammatory response and increases insulin action in skeletal muscle of ob/ob mice and in L6 myotubes. *Eur. J. Pharmacol.* 689, 285–293.
- Aprioku, J.S. (2013). Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *J. Reprod. Infertil.* 14, 158–72.
- Archana, D., Supriya, C., Girish, B.P., Kishori, B., Sreenivasula, R. (2018). Alleviative effect of resveratrol on ptyvinyl chloride-induced reproductive toxicity in male Wistar rats. *Food Chem Toxicol* 116, 173–181.
- 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. *J. Clin. Diagn. Res.* 11,(5) IE01.
- Ascoli, M. (2007). Potential Leydig cell mitogenic signals generated by the wild-type and constitutively active mutants of the lutropin/choriogonadotropin receptor (LHR). *Mol. Cell. Endocrinol.* 262, 244–248.
- Aslan, M., Horoz, M., Sabuncu, T., Celik, H., Selek, S. 2011. Serum paraoxonase enzyme activity and oxidative stress in obese subjects. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 121, 181–186.
- Aydın, A.F., Çoban, J., Doğan-Ekici, I., Doğru-Abbasoğlu, S., Uysal, M., Koçak-Toker, N. (2015). Carnosine and vitamin E—a promising pair in the combat against testicular oxidative stress in aged rats. *Androl.* 47, 1131-1138.
- Bachmeier, B.E., Mirisola, V., Romeo, F., Generoso, L., Esposito, A., Dell’eva, R., Blengio, F., Killian, P.H., Albini, A., Pfeiffer, U. (2010). Reference profile correlation reveals estrogen-like transcriptional activity of Curcumin. *Cell Physiol. Biochem.* 26, 471–482.
- Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Hosseinpanah, F., Hedayati, M., Hosseinpour-Niazi, S., Azizi, F. (2011). Broccoli sprouts reduce oxidative stress in type 2 diabetes: A randomized double-blind clinical trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* 65, 972–977.

- Bakos, H.W., Mitchell, M., Setchell, B.P., Lane, M. (2011). The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int. J. Androl.* 34, 402–410.
- Banerjee, A., Anjum, S., Verma, R., Krishna, A. (2012). Alteration in expression of estrogen receptor isoforms alpha and beta, and aromatase in the testis and its relation with changes in nitric oxide during aging in mice. *Steroids* 77, 609–620.
- Baret, P., Septembre-Malaterre, A., Rigoulet, M., Lefebvre d'Hellencourt, C., Priault, M., Gonthier, M.P., Devin, A. (2013). Dietary polyphenols preconditioning protects 3T3-L1 preadipocytes from mitochondrial alterations induced by oxidative stress. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 167–174.
- Bartke, A. (2015). Early life events can shape aging and longevity. *Curr. Aging Sci.* 8, 11–13. Doi: <https://doi.org/10.2174/1874609808666150422123355>
- Baumgarten, H.G., Holstein, A.F., Rosengren, E. (1971). Arrangement, ultrastructure and adrenergic innervation of smooth musculature of the ductuli efferentes, ductus epididymis and ductus deferens of man. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 120, 37–79.
- Baylis, D., Bartlett, D. B., Harnish, P., Patel, H. P., Roberts, H. C. (2013). Understanding how we age: Insights into inflammaging. *Longev. & Healthsp.* 2, 2-8. <https://doi.org/10.1186/2046-2395-2-8>
- Beattie, M.C., Adekola, L., Papadopoulos, V., Chen, H., Zirkin, B.R. (2015). Leydig cell aging and hypogonadism. *Exp Gerontol.* 68, 87–91. Doi:10.1016/j.exger.2015.02.014
- Bedford J. (1965). Changes in fine structure of the rabbit sperm head during passage through the epididymis. *M. J. Anat.* 99, 891–906.
- Bedford, J. M. (1973). Components of sperm maturation in the human epididymis. *Adv. Biosci.* 10, 145–155.
- Behloul, N., Wu, G. (2013). Genistein: A promising therapeutic agent for obesity and diabetes treatment. *Eur. J. Pharmacol.* 698, 31–38.
- Beltowski, J. 2012. Leptin and the regulation of endothelial function in physiological and pathological conditions. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 39, 168–178.
- Benahmed, M. (1995). Male Infertility. Chapman and Hall:NewYork, 200p.
- Benoit, J. (1926). Recherches anatomiques, cytologiques et histophysiologiques sur les voies excrétrices du testicule chez les mammifères. *Arch. Anat. Histol. Embryol. (Strasb).* 5, 173–412.
- Bilezikian, J.P., Morishima, A., Bell, J., Grumbach, M.M. (1998). Increased bone mass as a result of estrogen therapy in a man with aromatase deficiency. *N. Engl. J. Med.* 339, 599–603.
- Bogazzi, F., Russo, D., Raggi, F., Bohlooly-Y, M., Tornell, J., Sardella, C., Martino, E. (2011). Cardiac extrinsic apoptotic pathway is silent in young but activated in elder mice overexpressing bovine GH: Interplay with the intrinsic pathway. *J. Endocrinol* 210, 231–238. Doi: <https://doi.org/10.1530/JOE-10-0402>
- Bondia-Pons, I., Ryan, L., Martinez, J.A. 2012. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J. Physiol. Biochem.* 68, 701–711.
- Bradford, P.G. (2013). Curcumin and obesity. *Biofactors.* Doi: 10.1002/biof.1074.
- Brahem, S., Mehdi, M., Elghezal, H., Saad, A. (2011). The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population. *J Assist Reprod Genet.* 28, 425–32.
- Bray, I., Gunnell, D., Davey, S.G. (2006). Advanced paternal age: how old is too old? *J. Epidemiol. Community Health.* 60, 851–863.
- Breton, S., Smith, P. J. S., Lui, B., Brown, D. (1996). Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H⁺)-ATPase. *Nat. Med.* 2, 470–472.
- Brito, E.S., Araújo, M.C., Alves, R.E., Carkeet, C., Clevidence, B.A., Novotny, J.A. (2007). Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, jambolão, jussara, and guajiru. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9389–9394.
- Broer, L., Codd, V., Nyholt, D.R., Deelen, J., Mangino, M., Willemsen, G. (2013). Meta-analysis of telomere length in 19,713 subjects reveals high heritability, stronger maternal inheritance and a paternal age effect. *Eur J Hum Genet.* 21:1163–8.
- Bulun, S.E. (2014). Aromatase and estrogen receptor α deficiency. *Fertil. Steril.* 101(2) 323–329.
- Canick, J.A., Makris, A., Gunsalus, G.L., Ryan, K.J. (1979). Testicular aromatization in immature rats: localization and stimulation after gonadotropin administration in vivo. *Endocrinol.* 104, 285–288.
- Carani, C., Qin, K., Simoni, M., Faustini-Fustini, M., Serpente, S., Boyd, J., Korach, K.S., Simpson, E.R. (1997). Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N. Engl. J. Med.* 337, 91–95.
- Carlberg, I., Mannervik, B. (1985). Glutathione-reductase. *Methods Enzymol* 113, 484–490.
- Carreau, S., Bouraima-Lelong, H., Delalande, C. (2011). Estrogens: New players in spermatogenesis. *Reprod. Biol.* 11 174–93.
- Carreau, S., Bourguiba, S., Marie, E. (2004). Testicular and blood steroid levels in aged men. *Reprod Biol.* 4, 299–304.
- Carreau, S., Hess, R.M. (2010). Oestrogens and spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 365, 1517–35.
- Carreau, S., Wolczynski, S., Galeraud-Denis, I. (2010) Aromatase, oestrogens and human male reproduction. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 365, 1571–9.
- Chandrashekar, V., Bartke, A., Coschigano, K. T., Kopchick, J. J. (1999). Pituitary and testicular function in growth hormone receptor gene knockout mice. *Endocrinology*, 140, 1082–1088. Doi: <https://doi.org/10.1210/endo.140.3.6557>
- Chapin, R.E, Wine, R.N., Harris, M.W., Borchers, C.H. e Haseman, J.K. (2001). Structure and control of a cell-cell adhesion complex associated with spermiation in rat seminiferous epithelium. *J. Androl.* 22 1030–1052.
- Chen, H., Ge, R.S., Zirkin, B.R. (2009). Leydig cells: From stem cells to aging. *Mol. Cell. Endocrinol.* 306, 9–16.

- Chen, H., Guo, J., Ge, R., Lian, Q., Papadopoulos, V., Zirkin, B.R. (2015). Steroidogenic fate of the Leydig cells that repopulate the testes of young and aged Brown Norway rats after elimination of the preexisting Leydig cells. *Exp Gerontol.* 72, 8–15. doi:10.1016/j.exger.2015.08.014
- Chen, H., Hardy, M.P., Huhtaniemi, I., Zirkin, B.R. (1994). Age-related decreased Leydig cell testosterone production in the Brown Norway rat. *J. Androl.* 15, 551–7.
- Chen, H., Hardy, M.P., Zirkin, B.R. (2002). Age-related decreases in Leydig cell testosterone production are not restored by exposure to LH *in vitro*. *Endocrinology* 143, 1637–1642.
- Chen, H., Irizarry, R.A., Luo, L., Zirkin, B.R. (2004). Leydig cell gene expression: effects of age and caloric restriction. *Exp. Gerontol.* 39, 31–43.
- Chen, H., Luo, L., Liu, J., Zirkin, B.R. (2007). Cyclooxygenases in rat Leydig cells: effects of luteinizing hormone and aging. *Endocrinology* 148, 735–742.
- Chen, N., Bezzina, R., Hinch, E., Lewandowski, P.A., Cameron-Smith, D., Mathai, M.L., Jois, M., Sinclair, A.J., Begg, D.P., Wark, J.D., Weisinger, H.S., Weisinger, R.S. (2009). Green tea, black tea, and epigallocatechin modify body composition, improve glucose tolerance, and differentially alter metabolic gene expression in rats fed a high-fat diet. *Nutr. Res.* 29, 784–793.
- Cheng, C.Y., Wong, E.W., Yan, H.H., Mruk, D.D. (2010). Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: new insights and advances. *Mol. Cell Endocrinol* 315, 49–56. Doi:10.1016/j.mce.2009.08.004
- Chenniappan, K., Murugan, K. (2017). Therapeutic and fertility restoration effects of *Ionidium suffruticosum* on sub-fertile male albino Wistar rats: effects on testis and caudal spermatozoa. *Pharm Biol* 55, 946–957.
- Choi, S.E., Kim, T.H., Yi, S.A., Hwang, Y.C., Hwang, W.S., Choe, S.J., Han, S.J., Kim, H.J., Kim, D.J., Kang, Y., Lee, K.W. (2011). Capsaicin attenuates palmitate-induced expression of macrophage inflammatory protein 1 and interleukin 8 by increasing palmitate oxidation and reducing c-Jun activation in THP-1 (human acute monocytic leukemia cell) cells. *Nutr. Res.* 31, 468–478.
- Chojnacka, K., Bilinska, B., Mruk, D.D. (2016). Interleukin 1alpha-induced disruption of the Sertoli cell cytoskeleton affects gap junctional communication. *Cell. Signall.* 28, 469–480. Doi:10.1016/j.cellsig.2016.02.003
- Chrysohou, C., Panagiotakos, D.B., Pitsavos, C., Skoumas, I., Papademetriou, L., Economou, M., Stefanadis, C. 2007. The implication of obesity on total antioxidant capacity in apparently healthy men and women: The ATTICA study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 17, 590–597.
- Chuang, C.C., Martinez, K., Xie, G., Kennedy, A., Bumrungpert, A., Overman, A., Jia, W., McIntosh, M.K. (2010). Quercetin is equally or more effective than resveratrol in attenuating tumor necrosis factor- α -mediated inflammation and insulin resistance in primary human adipocytes. *Am. J. Clin. Nutr.* 92, 1511–1521.
- Chung, H.Y., Cesari, M., Anton, S., Marzetti, E., Giovannini, S., Seo, A.Y., Carter, C., Yu, B.P., Leeuwenburgh, C. (2009). Molecular inflammation: Underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* 8, 18–30.
- Cimino, S., Sortino, G., Favilla, V., Castelli, T., Madonia, M., Sansalone, S., Russo, G.I., Morgia, G. (2012). Polyphenols: Key issues involved in chemoprevention of prostate cancer. *Oxid. Med. Cell. Longev.* Doi: 10.1155/2012/632959.
- Clermont, Y., Rambourg, A., Hermo, L. (1995). Trans-Golgi network (TGN) of different cell types: three-dimensional structural characteristics and variability. *Anat. Rec.* 242, 289–301.
- Codoñer-Franch, P., López-Jaén, A.B., de la Mano-Hernández, A., Sentandreu, E., Simó-Jordá, R., Valls-Bellés, V. (2010). Oxidative markers in children with severe obesity following low-calorie diets supplemented with mandarin juice. *Acta Paediatr.* 99, 1841–1846.
- Codoñer-Franch, P., Tavárez-Alonso, S., Murria-Estal, R., Tortajada-Girbés, M., Simó-Jordá, R., Alonso-Iglesias, E. (2012). Elevated advanced oxidation protein products (AOPPs) indicate metabolic risk in severely obese children. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 22, 237–243.
- Coschigano, K. T., Holland, A. N., Riders, M. E., List, E. O., Flyvbjerg, A., Kopchick, J. J. (2003). Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span. *Endocrinol.* 144, 3799–3810. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0374>
- Coschigano, K. T., Wetzel, A. N., Obichere, N., Sharma, A., Lee, S., Rasch, R., Kopchick, J. J. (2010). Identification of differentially expressed genes in the kidneys of growth hormone transgenic mice. *Growth Horm. IGF Res.* 20, 345–355. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2010.06.001>
- Creasy, D. M. (1998). The male reproductive system. In *Target Organ Pathology* (J. Turton and J. Hooson, eds.), pp. 371–406. Taylor and Francis Ltd., London, UK.
- Creasy, D. M. (2001). Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicol. Pathol.* 29 64–76.
- Creasy, D., Bube, A., de Rijk, E., Kandori, H., Kuwahara, M., Masson, R., Rogerson, P. (2012). Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system. *Toxicol. Pathol.* 40 40–121.
- Crow, J.F. (2000). The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nat Rev Genet.* 1:40–7.
- Crujeiras, A.B., Díaz-Lagares, A., Carreira, M.C., Amil, M., Casanueva, F.F. (2013). Oxidative stress associated to dysfunctional adipose tissue: A potential link between obesity, type 2 diabetes mellitus and breast cancer. *Free Radic. Res.* 47, 243–256.
- Crujeiras, A.B., Parra, M.D., Rodríguez, M.C., Martínez de Morentin, B.E., Martínez, J.A. (2006). A role for fruit content in energy-restricted diets in improving antioxidant status in obese women during weight loss. *Nutrition* 22, 593–599.

- Csiszar, A., Labinsky, N., Perez, V., Recchia, F. A., Podlutzky, A., Mukhopadhyay, P., Ungvari, Z. (2008). Endothelial function and vascular oxidative stress in long-lived GH/IGF-deficient Ames dwarf mice. *American J. Physiol. Heart Circul. Physiol.* 295, H1882–H1894. Doi: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.412.2008>
- Cui, H., López, M., Rahmouni, K. (2017). The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 338–351. Doi:10.1038/nrendo.2016.222
- Curley, J.P., Mashoodh, R., Champagne, F.A. (2011). Epigenetics and the origins of paternal effects. *Horm. Behav.* 59, 306–14.
- D'Archivio, M., Annuzzi, G., Vari, R., Filesi, C., Giacco, R., Scaccocchio, B., Santangelo, C., Giovannini, C., Rivellese, A.A., Masella, R. (2012). Predominant role of obesity/insulin resistance in oxidative stress development. *Eur. J. Clin. Invest.* 42, 70–78
- D'Onofrio, B.M., Rickert, M.E., Frans, E., Kuja-Halkola, R., Almqvist, C., Sjolander, A., et al. (2014). Paternal age at childbearing and offspring psychiatric and academic morbidity. *JAMA Psychiatry.* 71, 432–8.
- Dakouane, M., Bicchieray, L., Bergere, M., Albert, M., Vialard, F., Selva, J. (2005). A histomorphometric and cytogenetic study of testis from men 29-102 years old. *Fertil Steril.* 83, 923–928. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.12.005.
- Dandona, P., Aljada, A., Chaudhuri, A., Mohanty, P., Garg, R. (2005). Metabolic syndrome: A comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 111, 1448–1454.
- Danilovich, N. A., Bartke, A., Winters, T. A. (2000). Ovarian follicle apoptosis in bovine growth hormone transgenic mice. *Biol. Reproduct.*, 62, 103–107. Doi: <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.1.103>
- Davidson, J.M., Chen, J.J., Crapo, L., Gray, G.D., Greenleaf, W.J., Catania, J.A. (1983). Hormonal changes and sexual function in aging men. *J Clin Endocrinol Metab.* 57, 71–77. doi:10.1210/jcem-57-1-71
- De Andrade, L. D. M., Reis, C., Castro, P. F., Borges, L. L., Amaral, N. O., Torres, I. M., Lavorenti Rocha, M. (2015). Vasorelaxant and Hypotensive Effects of Jaboticaba Fruit (*Myrciaria cauliflora*) Extract in Rats. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM* 696135. Doi: 10.1155/2015/696135.
- De Grava Kempinas, W., Klinefelter, G. R. (2015). Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis*, 8, e979114.
- De Groote, D., van Belleghem, K., Devière, J., van Brussel, W., Mukaneza, A., Amininejad, L. (2012). Effect of the intake of resveratrol, resveratrol phosphate, and catechin-rich grape seed extract on markers of oxidative stress and gene expression in adult obese subjects. *Ann. Nutr. Metab.* 61, 15–24.
- De la Fuente, M., Miquel, J. (2009). An update of the oxidation-inflammation theory of ageing: The involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr. Pharm. Des.* 15, 3003–3026. Doi: <https://doi.org/10.2174/138161209789058110>
- De la Garza, A.L., Milagro, F.I., Boque, N., Campión, J., Martínez, J.A. (2011). Natural inhibitors of pancreatic lipase as new players in obesity treatment. *Planta Med.* 77, 773–785.
- De Lamirande, E., Lamothe, G. (2010). Levels of semenogelin in human spermatozoa decrease during capacitation: involvement of reactive oxygen species and zinc. *Hum. Reprod.* 25, 1619–1630.
- Defuria, J., Bennett, G., Strissel, K.J., Perfield, J.W., Milbury, P.E., Greenberg, A.S. (2009). Dietary blueberry attenuates whole-body insulin resistance in high-fat-fed mice by reducing adipocyte death and its inflammatory sequelae. *J. Nutr.* 139, 1510–1516.
- Del Rio, D., Agnoli, C., Pellegrini, N., Krogh, V., Brighenti, F., Mazzeo, T., Masala, G., Bendinelli, B., Berrino, F., Sieri, S., et al. (2011). Total antioxidant capacity of the diet is associated with lower risk of ischemic stroke in a large Italian cohort. *J. Nutr.* 141, 118–123.
- Delongas, J., Gelly, J., Leheup, B., Grignon, G. (1987). Influence of testicular secretions on differentiation of the rat epididymis: ultrastructural studies after castration, efferent duct ligation and cryptorchidism. *Exp. Cell Biol.* 55, 74–82.
- Divella, R., De Luca, R., Abbate, I., Naglieri, E., Daniele, A. (2016). Obesity and cancer: the role of adipose tissue and adipocytokines-induced chronic inflammation. *J. Cancer* 7, 2346–2359. Doi:10.7150/jca.16884
- Dragano, N.R.V., Marques, A.C., Cintra, D.E.C., Solon, C., Morari, J., Leite-Legatti, A.V., Velloso, L.A., Maróstica-Jr, M.R. (2013). Freeze-dried jaboticaba peel powder improves insulin sensitivity in high fat-fed mice. *Br. J. Nutr.* 110, 447–455.
- Du Plessis, S.S., Cabler, S., McAlister, D.A., Sabanegh, E., Agarwal, A. (2010). The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. *Nat. Rev. Urol.* 7, 153–161. Doi:10.1038/nrurol.2010.6
- Durackova, Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiol. Res.* 59, 459–69.
- Durairajanayagam, D., Agarwal, A., Ong, C., Prashast, P. (2014). Lycopene and male infertility. *Asian J. Androl.* 16, 420–5.
- Eddy, E.M., Washburn, T.F., Bunch, D.O., Goulding, E.H., Gladen, B.C. e Lubahn, D.B. (1996). Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinol.* 137(11) 4796-805.
- Eden, J.A. (2012). Phytoestrogens for menopausal symptoms: A review. *Maturitas* 72, 157–159.
- Egert, S., Boesch-Saadatmandi, C., Wolfram, S., Rimbach, G., Muller, M.J. (2010). Serum lipid and blood pressure responses to quercetin vary in overweight patients by apolipoprotein E genotype. *J. Nutr.* 140, 278–284.
- Elamin, E., Masclee, A., Juuti-Uusitalo, K., van Ijzendoorn, S., Troost, F., Pieters, H.J., Dekker, J., Jonkers, D. (2013). Fatty acid ethyl esters induce intestinal epithelial barrier dysfunction via a reactive oxygen species-dependent mechanism in a three-dimensional cell culture model. *PLoS One* 8, e5856. Doi: 10.1371/journal.pone.0058561.
- Elcock, L.H., Schoning, P. (1984). Age-related changes in the cat testis and epididymis. *Am J Vet Res.* 45, 2380–2384.
- Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82, 70–77.
- Engelhard, Y.N., Gazer, B., Paran, E. (2006). Natural antioxidants from tomato extract reduce blood pressure in patients with grade-1 hypertension: A double-blind, placebo-controlled pilot study. *Am. Heart. J.* 100-151.

- Erba, D., Casiraghi, M.C., Martinez-Conesa, C., Goi, G., Massaccesi, L. (2012). Isoflavone supplementation reduces DNA oxidative damage and increases *O*- β -*N*-acetyl-d-glucosaminidase activity in healthy women. *Nutr. Res.* 32, 233–240.
- Fan, W., Xu, Y., Liu, Y., Zhang, Z., Lu, L., Ding, Z. (2018). Obesity or Overweight, a Chronic Inflammatory Status in Male Reproductive System, Leads to Mice and Human Subfertility. *Front. Physiol.* 8 1117-23.
- Fan, X.P., Robaire, B. (1998). Orchiectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinol.* 139, 2128–2136.
- Fan, Y., Liu, Y., Xue, K., Gu, G., Fan, W., Xu, Y., Ding, Z. (2015). Diet-induced obesity in male C57BL/6 mice decreases fertility as a consequence of disrupted blood-testis barrier. *PLoS ONE* 14, e0120775. Doi:10.1371/journal.pone.0120775
- Fawcett, D.W. (1975). *Handbook of Physiology*. American Physiological Society: Washington, DC.
- Feldman, H.A., Longcope, C., Derby, C.A., Johannes, C.B., Araujo, A.B., Coviello, A.D., et al. (2002). Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 589–98. Doi:10.1210/jcem.87.2.8201.
- Fernández-Sánchez, A., Madrigal-Santillán, E., Bautista, M., Esquivel-Soto, J., Morales-González, A., Esquivel-Chirino, C., Durante-Montiel I., Sánchez-Rivera G., Valadez-Vega C., Morales-González J.A. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int. J. Mol. Sci.* 2011;12:3117–3132.
- Ferretti, G., Bacchetti, T., Masciangelo, S., Bicchiega, V. (2010). HDL-paraoxonase and membrane lipid peroxidation: A comparison between healthy and obese subjects. *Obesity.* 18, 1079–1084.
- Flohe, L., Gunzler, W.A. (1984). Assays of glutathione-peroxidase. *Methods Enzymol* 105, 114–121.
- Foley, G.L. (2001). Overview of male reproductive pathology. *Toxicol. Pathol.* 29 49-63.
- França, L.R., Russell, L.D. (1998). The testis of domestic animals. In: *Male reproduction. A multidisciplinary overview*. Regadera, J. & Martinez-Garcia (Eds.). Churchill Livingstone, Madrid, 197-219.
- Freeman, L.R., Zhang, L., Nair, A., Dasuri, K., Francis, J., Fernandez-Kim, S.O., Bruce-Keller, A.J., Keller, J.N. 2013. Obesity increases cerebrocortical reactive oxygen species and impairs brain function. *Free Radic. Biol. Med.* 56, 226–233.
- Frungieri, M.B., Calandra, R.S., Bartke, A., Matzkin, M.E. (2018). Ageing and inflammation in the male reproductive tract. *Androl.* 50, e13034. Doi: <https://doi.org/10.1111/and.13034>.
- Fukuda, T., Kikuchi, M., Kurotaki, T., Oyamada, T., Yoshikawa, H. e Yoshikawa T. (2001). Age-related changes in the testes of horses. *Equine Vet. J.* 3 20-25.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 114, 1752–1761.
- Gabay, C., Kushner, I. (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 340, 448-454.
- Garolla, A., Torino, M., Miola, P., Caretta, N., Pizzol, D., Menegazzo, M., Bertoldo, A., Foresta, C. (2015). Twenty-four-hour monitoring of scrotal temperature in obese men and men with a varicocele as a mirror of spermatogenic function. *Human Reproduction* 30, 1006–1013. Doi:10.1093/humrep/dev057
- Gaytan, F., Lucena, M.C., Munoz, E., Paniagua, R. (1986). Morphometric aspects of rat testis development. *J. Anat.* 145 155-162.
- Gesing, A., Masternak, M. M., Wang, F., Lewinski, A., Karbownik-Lewinska, M., Bartke, A. (2011). Decreased expression level of apoptosis related genes and/or proteins in skeletal muscles, but not in hearts, of growth hormone receptor knockout mice. *Experiment. Biol. Med.* 236, 156–168. Doi: <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.010202>
- Ghanim, H., Sia, C.L., Abuaysheh, S., Korzeniewski, K., Patnaik, P., Marumganti, A., Chaudhuri, A., Dandona, P. (2010a). An antiinflammatory and reactive oxygen species suppressive effects of an extract of *Polygonum cuspidatum* containing resveratrol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, E1–E8.
- Ghanim, H., Sia, C.L., Upadhyay, M., Korzeniewski, K., Viswanathan, P., Abuaysheh, S., Mohanty, P., Dandona, P. (2010b). Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat, high-carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and Toll-like receptor expression. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 940–949.
- Golan, R., Scovell, J.M., Ramasamy, R. (2015). Age-related testosterone decline is due to waning of both testicular and hypothalamic-pituitary function. *Aging Male.* 18, 201–204. doi:10.3109/13685538.2015.1052392
- Gomes M.L.M., Monteiro J.C., Freitas K.M., Sbervelheri M.M., Dolder H. (2011) Association of the infusion of *Heteropterys aphrodisiaca* and endurance training brings spermatogenetic advantages. *Biol. Res.* 44, 235–241.
- González-Castejón, M., Rodríguez-Casado, A. (2011). Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review. *Pharmacol. Res.* 64, 438–455.
- Goodman-Gruen, D., Kritz-Silverstein, D. (2001). Usual dietary isoflavone intake is associated with cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. *J. Nutr.* 131, 1202–1206.
- Goodman-Gruen, D., Kritz-Silverstein, D. (2003). Usual dietary isoflavone intake and body composition in postmenopausal women. *Menopause* 10, 427–432.
- Gosden, R.G., Richardson, D.W., Brown, N., Davidson, D.W. (1982). Structure and gametogenic potential of seminiferous tubules in ageing mice. *J Reprod Fertil.* 64, 127–133. Doi:10.1530/jrf.0.0640127
- Gravance, C. G., Breier, B. H., Vickers, M. H., Casey, P. J. (1997). Impaired sperm characteristics in postpubertal growth hormone deficient dwarf (dw/dw) rats. *Animal Reproduction Science*, 49, 71–76. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(97\)00019-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(97)00019-5)

- Griffin, C., Lanzetta, N., Eter, L., Singer, K. (2016). Sexually dimorphic myeloid inflammatory and metabolic responses to diet-induced obesity. *Am. J. Physiol. – Regul. Integrative Comparat. Physiol.* 311, R211–R216. Doi:10.1152/ajpregu.00136.2016
- Griswold, M.D. (1995). Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol. Reprod.* 52, 211–216.
- Griveau, J.F., Dumont, E., Renard, P., Callegari, J.P., LeLannou, D. (1995). Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 103, 17–20.
- Gruenewald, D.A., Naai, M.A., Hess, D.L., Matsumoto, A.M. (1994). The Brown Norway rat as a model of male reproductive aging: evidence for both primary and secondary testicular failure. *J Gerontol.* 49:B42– B50. doi:10.1093/geronj/49.2.B42
- Gunes, S., Hekim, G.N., Arslan, M.A., Asci, R. (2016). Effects of aging on the male reproductive system. *J Assist Reprod Genet.* 33, 441–454. doi:10.1007/s10815-016-0663-y.a
- Guthrie, H.D., Welch, G.R. (2012). Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology* 78 1700–8.
- Handelsman, D.J. (2006). Aging in the hypothalamic-pituitary-testicular axis. In: Neill JD, ed. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3rd ed. San Diego: Elsevier Academic Press 2697–2728. Doi:10.1016/B978-012515400-0/50054-3
- Harishankar, N., Kumar, P. U., Sesikeran, B., e Giridharan, N. (2011). Obesity associated pathophysiological & histological changes in WNIN obese mutant rats. *Indian J. Med. Res.* 134(3) 330-340.
- Harishankar, N., Kumar, P. U., Sesikeran, B., e Giridharan, N. (2011). Obesity associated pathophysiological & histological changes in WNIN obese mutant rats. *Indian J. Med. Res.* 134(3) 330-340.
- Harman, S.M., Metter, E.J., Tobin, J.D., Pearson, J. e Blackman, M.R. (2001). Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men, Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J. Endocrinol. Metab.* 86 724–731.
- Harris, I. D., Fronczak, C., Roth, L., e Meacham, R. B. (2011). Fertility and the aging male. *Rev. Urol.* 13(4) e184-190.
- He, H.J., Wang, G.Y., Gao, Y., Ling, W.H., Yu, Z.W., Jin, T.R. (2012). Curcumin attenuates Nrf2 signaling defect, oxidative stress in muscle and glucose intolerance in high fat diet-fed mice. *World J. Diabetes.* 3, 94–104.
- Hemeida, N. A., Sack, W., McEntee, K. (1978). Ductuli efferentes in the epididymis of boar, goat, ram, bull, and stallion. *Am. J. Vet. Res.* 39, 1892–1900.
- Henkel, R.R. (2011). Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *A. J. Androl.* 13, 43–52. Doi:10.1038/aja.2010.76
- Hermo, L., Adamali, H. I., Andonian, S. (2000). Immunolocalization of CA II and H⁺ V-ATPase in epithelial
- Hermisdorff, H.H., Puchau, B., Volp, A.C., Barbosa, K.B., Bressan, J., Zulet, M.Á., Martínez, J.A. (2011). Dietary total antioxidant capacity is inversely related to central adiposity as well as to metabolic and oxidative stress markers in healthy young adults. *Nutr. Metab.* 22, 8–59.
- Hess, R.A. (2003). Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1 52-69.
- Hess, R.A. (2014). Disruption of estrogen receptor signaling and similar pathways in the efferent ductules and initial segment of the epididymis. *Spermatogenesis* 4(2) e979103.
- Hess, R.A. e Nakai, M. (2000). Histopathology of the male reproductive system induced by the fungicide benomyl. *Histol. Histopathol.* 15:207–224.
- Hess, R.A., Bunick, D., Lee, K.H., Bahr, J., Taylor, J.A., Korach, K.S., et al. (1997). A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* 390, 509–12.
- Hettle, J.A., Balekjian, E., Tung, P.S., Fritz, I.B. (1988). Rat testicular peritubular cells in culture secrete an inhibitor of plasminogen activator activity. *Biol. Reprod.* 38, 359–371.
- Heuser, A., Mecklenburg, L., Ockert, D., Kohler, M., Kemkowski, J. (2013). Selective inhibition of PDE4 in Wistar rats can lead to dilatation in testis, efferent ducts, and epididymis and subsequent formation of sperm granulomas. *Toxicol. Pathol.* 41 615-27.
- Higuchi, M., Dusting, G.J., Peshavariya, H., Jiang, F., Hsiao, S.T., Chan, E.C., Liu, G.S. (2013). Differentiation of human adipose-derived stem cells into fat involves reactive oxygen species and forkhead box o1 mediated upregulation of antioxidant enzymes. *Stem. Cells Dev.* 22, 878–888.
- Hollman, P.C., Cassidy, A., Comte, B., Heinonen, M., Richelle, M., Richling, E., Serafini, M., Scalbert, A., Sies, H., Vidry, S. (2011). The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *J. Nutr.* 141, S989–S1009.
- Honoré, L.H. (1978) Ageing changes in the human testis: a light-microscopic study. *Gerontology* 24, 58–65. Doi:10.1159/000212237
- Horn, R., Pastor, L.M., Moreno, E., Calvo A., Canteras M., Pallares J. (1996). Morphological and morphometric study of early changes in the ageing golden hamster testis. *J. Anat.* 188 109-117.
- Horvath, T.L., Andrews, Z.B., Diano, S. (2009). Fuel utilization by hypothalamic neurons: Roles for ROS. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 78–87.
- Huang ,G., Yuan, M., Zhang, J., Li, J., Gong, D., Li, Y., Zhang, J., Lin, P., Huang, L. (2016). IL-6 mediates differentiation disorder during spermatogenesis in obesity-associated inflammation by affecting the expression of Zfp637 through the SOCS3/STAT3 pathway. *Sci. Report* 6, 28012. Doi:10.1038/srep28012
- Huang, W.S., Yang, T.Y., Shen, W.C., Lin, C.L., Lin, M.C., Kao, C.H. (2014). Association between *Helicobacter pylori* infection and dementia. *J. Clin. Neurosci.* 21, 123-145.

- Humphreys PN. The histology of the testis in aging and senile rats. *Exp Gerontol.* 1977;12:27–34. doi:10.1016/0531-5565(77)90029-8
- Hurt, R.T., Wilson, T. (2012). Geriatric obesity: Evaluating the evidence for the use of flavonoids to promote weight loss. *J. Nutr. Gerontol. Geriatr.* 31, 269–289. Hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.* 8, 338–348.
- Ichihara, I., Kawamura, H., e Pelliniemi, L. J. (1993). Ultrastructure and morphometry of testicular Leydig cells and the interstitial components correlated with testosterone in aging rats. *Cell Tissue Res.* 271(2) 241-255.
- Inada, K.O.P., Duarte, P.A., Lapa, J., Miguel, M.A.L., Monteiro, M. (2018). Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) juice obtained by steam-extraction: phenolic compound profile, antioxidant capacity, microbiological stability, and sensory acceptability. *J. Food Sci. Technol.* 55, 52–61. Doi:10.1007/s13197-017-2769-3.
- Inada, K.O.P., Oliveira, A.A., Revorêdo, T.B., Martins, A.B.N., Lacerda, E.C.Q., Freire, A.S., Braz, B.F., Santelli, R.E., Torres, A.G., Perrone, D., Monteiro, M.C. (2015). Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. *J. Funct. Foods.* 17, 422–433. Doi: 10.1016/j.jff.2015.06.002.
- Iwasa, T., Matsuzaki, T., Murakami, M., Kinouchi, R., Ogata, R., Kuwahara, A., Yasui, T., Irahara, M. (2009). Neonatal lipopolysaccharide exposure attenuates the homotypic stress-induced suppression of LH secretion in adulthood in male rat. *Inter. J. Development. Neurosc.* 27, 345–349. Doi:10.1016/j.ijdevneu.2009.03.004.
- Jenny, N. S. (2012). Inflammation in aging: Cause, effect, or both? *Discov. Medic.* 13, 451–460.
- Jensen, L. J., Stuart-Tilley, A. K., Peters, L. L., Lux, S. E., Alper, S. L., Breton, S. (1999). Immunolocalization of AE2 anion exchanger in rat and mouse epididymis. *Biol. Reprod.* 61, 973–980.
- Jeong, J.W., Lee, W.S., Shin, S.C., Kim, G.Y., Choi, B.T., Choi, Y.H. (2013). Anthocyanins downregulate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in bv2 microglial cells by suppressing the nf-kappab and akt/mapks signaling pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 1502–1515. Doi: 10.3390/ijms14011502.
- Jervis, K.M. e Robaire, B. (2002). Changes in gene expression during aging in the brown Norway rat epididymis. *Exp. Gerontol.* 37, 897–906.
- Jiang H, Zhu WJ, Li J, Chen QJ, Liang WB, Gu YQ. (2014). Quantitative histological analysis and ultrastructure of the aging human testis. *Int Urol Nephrol.* 46, 879–885. doi:10.1007/s11255-013-0610-0
- Johnson, L. (1986). Spermatogenesis and aging in the human. *J. Androl.* 7 331–54.
- Johnson, L., Abdo, J.G., Petty, C.S., Neaves, W.B. (1988). Effect of age on the composition of seminiferous tubular boundary tissue and on the volume of each component in humans. *Fertil. Steril.* 49, 1045–1051.
- Johnson, L., Petty, C.S., Neaves, W.B. (1984). Influence of age on sperm production and testicular weights in men. *J. Reprod. Fertil.* 70, 211–218.
- Johnson, L., Petty, C.S., Neaves, W.B. (1986). Age-related variation in seminiferous tubules in men. A stereologic evaluation. *J Androl.* 7, 316–322. Doi:10.1002/j.1939-4640.1986.tb00939.x.
- Johnson, L., Welsh, Jr. T.H., Curley, K.O., Johnston. (2010). Anatomy and Physiology of the Male Reproductive System and Potential Targets of Toxicants. In: *Comprehensive Toxicology* (2^a Edition), 1-59.
- Jones, R., Mann, T., Sherins, R. J. (1980). Peroxidative breakdown of phospholipids by human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil. Steril.* 31, 531–537.
- Joseph, A., Barry, D., e Hess, A.R. (2011). Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. *Biol. Reprod.* 84 207-217.
- Ju, J.H., Yoon, H.S., Park, H.J., Kim, M.Y., Shin, H.K., Park, K.Y., Yang, J.O., Sohn, M.S., Do, M.S. (2011). Anti-obesity and antioxidative effects of purple sweet potato extract in 3t3-l1 adipocytes in vitro. *J. Med. Food.* 14, 1097–1106. Doi: 10.1089/jmf.2010.1450.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J. (2012). *Histologia Básica*. 11^oed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 524p.
- Kaczmarczyk, M.M., Miller, M.J., Freund, G.G. (2012). The health benefits of dietary fiber: Beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon cancer. *Metabol.* 61, 1058–1066.
- Kaler, L.W., Neaves, W.B. (1978). Attrition of the human Leydig cell population with advancing age. *Anat. Rec.* 192 513–518.
- Kang, J.H., Tsuyoshi, G., Le Ngoc, H., Kim, H.M., Tu, T.H., Noh, H.J., Kim, C.S., Choe, S.Y., Kawada, T., Yoo, H., et al. (2011). Dietary capsaicin attenuates metabolic dysregulation in genetically obese diabetic mice. *J. Med. Food.* 14, 310–315.
- Karaouzene, N., Merzouk, H., Aribi, M., Merzouk, S.A., Berruiguet, A.Y., Tessier, C., Narce, M. (2011). Effects of the association of aging and obesity on lipids, lipoproteins and oxidative stress biomarkers: A comparison of older with young men. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 21, 792–799.
- Kefer, J.C., Agarwal, A., Sabanegh, E. (2009). Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *Int. J. Urol.* 16, 449–457.
- Kempinas, W. D. G., Suarez, J. D., Roberts, N. L., Strader, L., Ferrell, J., Goldman, J. M., Klinefelter, G. R. (1998). Rat epididymal sperm quantity, quality, and transit time after guanethidine-induced sympathectomy. *Biol. Reprod.* 59(4) 890-896.
- Kempinas, W.G., Klinefelter, G.R. (2014). Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis* 4, 1-32.
- Kidd, S. A., Eskenazi, B., e Wyrobek, A. J. (2001). Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil. Steril.* 75(2) 237-248.

- Kilhovd, B.K., Juutilainen, A., Lehto, S., Rönnemaa, T., Torjesen, P.A., Hanssen, K.F., Laakso, M. (2007). Increased serum levels of advanced glycation endproducts predict total, cardiovascular and coronary mortality in women with type 2 diabetes: A population-based 18 year follow-up study. *Diabetologia* 50, 1409–1417.
- Kimura, Y., Yanagimachi, R. (1995). Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei. *Biol. Reprod.* 53, 855–862.
- Koeva, Y., Bakalska, M., Atanassova, N., Georgieva, K., Davidoff, M. (2009). Age-related changes in the expression of 11 β hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in rat Leydig cells. *Folia Histochem Cytobiol.* 47, 281–7.
- Kolb, R., Sutterwala, F.S., Zhang, W. (2016). Obesity and cancer: inflammation bridges the two. *Current Op. Pharmacol.* 29 77–89. Doi:10.1016/j.coph.2016.07.005
- Kondarewicz, A., Kolasa, A., Zawislak, B. et al. (2011). Testis morphology in rats chronically treated with letrozole, an aromatase inhibitor. *Folia Histochem Cytobiol.* 49, 677–684.
- Kothari, S., Thompson, A., Agarwal, A., du Plessis, S. (2010). Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian. J. Exp. Biol.* 48, 425–35.
- Krabbe, K. S., Pedersen, M., Bruunsgaard, H. (2004). Inflammatory mediators in the elderly. *Experimental Gerontology*, 39, 687–699. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.01.009>
- Krzystek-Korpacka, M., Patryn, E., Boehm, D., Berdowska, I., Zielinski, B., Noczynska, A. (2008). Advanced oxidation protein products (AOPPs) in juvenile overweight and obesity prior to and following weight reduction. *Clin. Biochem.* 41, 943–949.
- La, D. K., Johnson, C. A., Creasy, D. M., Hess, R. A., Baxter, E, Pereira, M, e Snook, S. S. (2012). Efferent duct toxicity with secondary testicular changes in rats following administration of a novel leukotriene A4 hydrolase inhibitor. *Toxicol. Pathol.* 40 705–714.
- Lacham-Kaplan, O., Trounson, A. O. (1994). Embryo development capacity of oocytes fertilized by immature sperm and
- Laitinen, L., Talo, A. (1981). Effects of adrenergic and cholinergic drugs on electrical and mechanical activities of the rat cauda epididymidis in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 63, 205–209.
- Lakoski, K. A., Carron, C. P., Cabot, C. L., Saling, P. M. (1988). Epididymal maturation and the acrosome reaction in mouse sperm: response to zona pellucida develops coincident with modification of M42 antigen. *Biol. Reprod.* 38, 221–233.
- Lamas, C.A., Gollucke, A.P.B., Dolder, H. (2015). Grape juice concentrate (G8000) intake mitigates testicular morphological and ultrastructural damage following cadmium intoxication. *Int. J. Exp. Pathol.* 95, 301–310. Doi: 10.1111/iep.12141.
- Lamas, C.A., Gollucke, A.P.B., Dolder, H., (2017). Grape Juice Concentrate Alleviates Epididymis and Sperm Damage in Cadmium-Intoxicated Rats. *Int. J. Exp. Pathol.* 98, 86–99. Doi: 10.1111/iep.12227.
- Lamas, C.A., Lenquiste, S.A., Baseggio, A.M., Cuquetto-Leite, L., Kido, L.A., Aguiar, M.N., Collares-Buzato, M.R., Maróstica, Jr. M.R., Cagnon, V.H.A. (2018). Jaboticaba extract prevents prediabetes and liver steatosis in high-fat-fed ageing mice. *J. Funct. Foods* 47: 434–446.
- Lanning, L.L., Creasy, D.M., Chapin, R.E., Mann, P.C., Barlow, N.J., Regan, K.S., Goodman, D.G. (2002). Recommended approaches for evaluation of testicular and epididymal toxicity. *Toxicol. Pathol.* 30 507–20.
- Latronico, A.C., Segaloff, D.L. (2007). Insights learned from L457(3.43)R, an activating mutant of the human lutropin receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 260–262, 287–293.
- Lavranos, G., Balla, M., Tzortzopoulou, A., Syriou, V., Angelopoulou, R. (2012). Investigating ROS sources in male infertility: a common end for numerous pathways. *Reproduct. Toxicol.* 34, 298–307. Doi:10.1016/j.reprotox.2012.06.007
- Lazari, M. F. M., Lucas, T. F. G., Yasuhara, F., Gomes, G. R. O., Siu, E. R., Royer, C., Porto, C. S. (2009). Estrogen receptors and function in the male reproductive system. *Arq. Brasil. Endocrinol. & Metabol.* 53, 923-933.
- Lee, H., Lee, Y.J., Choi, H., Ko, E.H., Kim, J.W. (2009). Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *J. Biol. Chem.* 284, 10601–10609.
- Lee, Y.M., Choi, J.S., Kim, M.H., Jung, M.H., Lee, Y.S., Song, J. (2006). Effects of dietary genistein on hepatic lipid metabolism and mitochondrial function in mice fed highfat diets. *Nutrition* 22, 956–964.
- Leite, A.V., Malta, L.G., Riccio, M.F., Eberlin, M.N., Pastore, G.M., Maróstica-Junior, M.R. (2011). Antioxidant Potential of Rat Plasma by Administration of Freeze-Dried Jaboticaba Peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *J. Agric. Food Chem.* 59, 2277– 2283.
- Leite, R.P., Predes, F.S., Monteiro, J.C., Freitas, K.M., Wada, R.S., Dolder H. (2013) Advantage of Guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation on cadmium-induced damages in testis of adult Wistar rats. *Toxicol. Pathol.* 41, 73–79.
- Leite-Legatti, A.V., Batista, A.G, Dragano, N.R.V., Marques, A.C., Malta, L.G., Riccio, M.F., Eberlin, M.N., Machado, A.R.T., Carvalho-Silva, L.B., Ruiz, A.L.T.G., Carvalho, J.E., Pastore, G.M., Maróstica, Júnior M.R. (2012). Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. *Food Res. Int.* 49, 596–603.
- Lenquiste, S.A., Batista, A.G., Marineli, R.S., Dragano, N.R.V., Maróstica Jr., M.R. (2012). Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. *Food Res. Int.* 49, 153–160.
- Levy S, Serre V, Hermo L, Robaire B. The effects of aging on the seminiferous epithelium and the blood-testis barrier of the Brown Norway rat. *J Androl.* 1999;20:356–365. doi:10.1002/j.1939–4640.1999.tb02529.x.
- Levy, S., Robaire, B. (1999). Segment-specific changes with age in the expression of junctional proteins and the permeability of the blood-epididymis barrier in rats. *Biol. Reprod.* 60, 1392-401.

- Li, N., Tang, E.I., Cheng, C.Y. (2016). Regulation of blood-testis barrier by actin binding proteins and protein kinases. *Reproduct.* 151, 29–41. Doi:10.1530/REP-15-0463
- Lian, Z.H., Zack, M.M., Erickson, J.D. (1986). Paternal age and the occurrence of birth defects. *Am J Hum Genet.* 39:648–60.
- Lie, P.P., Cheng, C.Y., Mruk, D.D. (2013). Signalling pathways regulating the blood-testis barrier. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 621–625. Doi: 10.1016/j.biocel.2012.12.009
- Lin, B.W., Gong, C.C., Song, H.F., Cui, Y.Y. (2017). Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer. *Br. J. Pharmacol.* 174, 1226–1243. Doi: 10.1111/bph.13627.
- Liochev, S.I. (2013). Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic. Biol. Med.* 60, 1–4.
- Liu, Y., Ding, Z. (2017). Obesity, a serious etiologic factor for male subfertility in modern society. *Reproduct.* 154, R123-R131.
- Liu, Y., Zhao, W., Gu, G., Lu, L., Feng, J., Guo, Q., Ding, Z. (2014). Palmitoyl-protein thioesterase 1 (PPT1): an obesity-induced rat testicular marker of reduced fertility. *Mol. Reproduct. Develop.* 81, 55–65. Doi:10.1002/mrd.22281
- Lloberas, J., Celada, A. (2002). Effect of aging on macrophage function. *Experim. Gerontol.* 37, 1325–1331. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(02\)00125-0](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(02)00125-0)
- Lucas, T.F., Siu, E.R., Esteves, C.A., Monteiro, H.P., Oliveira, C.A., Porto, C.S., Lazari, M.F. (2008). 17beta-estradiol induces the translocation of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 to the cell membrane, MAPK3/1 phosphorylation and proliferation of cultured immature rat Sertoli cells. *Biol. Reprod.* 78 101–114.
- Luo, X.J., Peng, J., Li, Y.J. (2011). Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *Eur. J. Pharmacol.* 650, 1–7.
- MacDonald, A.A., Herbison, G.P., Showell, M., Farquhar, C.M. (2010). The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Hum. Reproduct. Update* 16, 293–311. Doi:10.1093/humupd/dmp047
- Macedo, L.F.L., Rogero, M.M., Guimarães, J.P., Granato, D., Lobato, L.P., Castro, I.A. (2013). Effect of red wines with different in vitro antioxidant activity on oxidative stress of high-fat diet rats. *Food Chemistry* 137 122–129.
- Maggio, M., Basaria, S., Ceda, G. P., Ble, A., Ling, S. M., Bandinelli, S. Ferrucci, L. (2005). The relationship between testosterone and molecular markers of inflammation in older men. *J. Endocrinol. Investig.* 28, 116–119.
- Mah, P.M., Wittert, G.A. (2010). Obesity and testicular function. *Mol. Cel. Endocrinol.* 316, 180–186. Doi: 10.1016/j.mce.2009.06.007
- Mahmoud, A.M., Goemaere, S., El-Garem, Y., Van Pottelbergh, I., Comhaire, F.H., Kaufman, J.M. (2003). Testicular volume in relation to hormonal indices of gonadal function in community-dwelling elderly men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 179–184.
- Maneely, R. B. (1959). Epididymal structure and function: a historical and critical review. *Acta Zool.* 40, 1–21.
- Mann T. Male Fertility and Sterility. Academic Press: New York, 1974.
- Maróstica, M.R., Quitete, V.H.A.C., Lamas, C.A., Lenquiste, S.A., Reyes, F.G., Braga, P.A.C., Baseggio, A.M. (2017). Pedido de Patente Privilégio de Invenção: Composição compreendendo extrato da casca da jabuticaba, e usos da mesma, depositado no INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL INPI, em 17.03.17, sob nº BR 1020170054624.
- Masternak, M. M., Bartke, A. (2012). Growth hormone, inflammation and aging. *Pathobiol. Aging & Age-Relat. Dis* 2, 17293–17298. Doi: <https://doi.org/10.3402/pba.v2i0.17293>
- Matsumoto, A.M. (2002). Andropause: clinical implications of the decline in serum testosterone levels with aging in men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 57, M76–M99. doi:10.1093/gerona/57.2.M76
- Matzkin, M. E., Mayerhofer, A., Rossi, S. P., Gonzalez, B., Gonzalez, C. R., Gonzalez-Calvar, S. I., Frungieri, M. B. (2010). Cyclooxygenase-2 in testes of infertile men: Evidence for the induction of prostaglandin synthesis by interleukin-1 β . *Fertility and Sterility*, 94, 1933–1936. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.01.039>
- Matzkin, M. E., Miquet, J. G., Fang, Y., Hill, C. M., Turyn, D., Calandra, R. S., Frungieri, M. B. (2016). Alterations in oxidative, inflammatory and apoptotic events in short-lived and long-lived mice testes. *Aging (Albany NY)* 8, 95–110. Doi: <https://doi.org/10.18632/aging.100875>
- Mauss, J. (1975). Exo- and endocrine testicular function in the aging man. *Fortschr Med.* 93, 1543–1544.
- McPherson, N.O., Lane, M. (2015). Male obesity and subfertility, is it really about increased adiposity? *A. J. Androl.* 17, 450–458. Doi:10.4103/1008-682X.148076
- Meacham, R. B., Murray, M. J. (1994). Reproductive function in the aging male. *Urol. Clin. North Am.* 21(3) 549-556.
- Mendis-Handagama, S.M.L.C. (1997). Luteinizing hormone on Leydig cell structure and function. *Histol. Histopathol.* 12, 869–82.
- Michalakis, K.I., Mintziori, G., Kaprara, A., Tarlatzis, B.C., Goulis, D.G. (2013). The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review. *Metabolism* 62, 457–478. Doi:10.1016/j.metabol.2012.08.012
- Mlinar, B., Marc, J. 2011. New insights into adipose tissue dysfunction in insulin resistance. *Clin. Chem. Lab. Med.* 49, 1925–1935.
- Moller, P., Danielsen, P.H., Karottki, D.G., Jantzen, K., Roursgaard, M., Klingberg, H., Jensen, D.M., Christophersen, D.V., Hemmingsen, J.G., Cao, Y., Loft, S. (2014). Oxidative stress and inflammation generated DNA damage by exposure to air pollution particles. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 762, 133–66.

- Moore, H.D., Bedford, J.M. (1979). The differential absorptive activity of epithelial cells of the rat epididymis before and after castration. *Anat. Rec.* 193, 313–327.
- Morales, E., Horn, R., Pastor, L. M., Santamaria, L., Pallarés, J., Zuasti, A., Canteras, M. (2004). Involution of seminiferous tubules in aged hamsters: an ultrastructural, immunohistochemical and quantitative morphological study. *Histol. Histopathol.* 19(2) 445-455.
- Morishima, A., Grumbach, M.M., Simpson, E.R., Fisher, C., Qin, K. (1995). Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 3689–3698.
- Moskovtsev, S.I., Willis, J., Mullen, J.B. (2006). Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility. *Fertil Steril.* 85, 496–9.
- Mueller, A., Hermo, L., Robaire, B. (1998). The effects of aging on the expression of glutathione S-transferases in the testis and epididymis of the Brown Norway rat. *J. Androl.* 19, 450–465.
- Mullen, W., McGinn, J., Lean, M.E., Maclean, M.R., Gardner, P., Duthie, G.G., et al. (2002). Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *J. Agricult. Food Chem.* 50 5191–5196.
- Nagao, T., Meguro, S., Hase, T., Otsuka, K., Komikado, M., Tokimitsu, I., Yamamoto, T., Yamamoto, K.A. (2009). Catechin-rich beverage improves obesity and blood glucose control in patients with type 2 diabetes. *Obesity* 17, 310–317.
- Nagasako-Akazome, Y., Kanda, T., Ohtake, Y., Shimasaki, H., Kobayashi T. (2007). Apple polyphenols influence cholesterol metabolism in healthy subjects with relatively high body mass index. *J. Oleo Sci.* 56, 417-428.
- Neaves, W.B., Johnson, L., Petty, C.S. (1987). Seminiferous tubules and daily sperm production in older adult men with varied numbers of Leydig cells. *Biol. Reprod.* 36, 301–308.
- Neaves, W.B., Johnson, L., Porter, J.C., Parker, C.R. Jr., Petty, C.S. (1984). Leydig cell numbers, daily sperm production, and serum gonadotropin levels in aging men. *J Clin Endocrinol Metab.* 59, 756–763. doi:10.1210/jcem-59-4-756
- Neese, R., Williams, G. (1998). Evolution and origins of disease. *Sci. Am.* 279, 86-93.
- Nelson, J.F., Latham, K.R., Finch, C.E. (1975). Plasma testosterone levels in C57BL/6J male mice: effects of age and disease. *Acta Endocrinol (Copenh).* 80, 744–752. doi:10.1530/ACTA.0.0800744
- Netter, F.H. (2008). Atlas De Anatomia Humana. 4ª Ed. Rio De Janeiro: Elsevier.
- Neves, B.V.D., Lorenzini, F., Veronez, D., Miranda, E. P., Neves, G. D., de Fraga, R. (2017). Numeric and volumetric changes in Leydig cells during aging of rats. *Acta Cir. Bras.* 32, 807–815.
- Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 384, 776–781. Doi: 10.1016/S0140-6736(14)60460-8.
- Nielsen, T.L., Hagen, C., Wraae, K., Brixen, K., Petersen, P.H., Haug, E., Larsen, R. e Andersen M. (2007). Visceral and subcutaneous adipose tissue assessed by magnetic resonance imaging in relation to circulating androgens, sex hormone-binding globulin, and luteinizing hormone in young men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92 2696–2705.
- Nistal, M., Codesal, J., Paniagua, R., Santamaria, L. (1987). Decrease in the number of human Ap and Ad spermatogonia and in the Ap/ Ad ratio with advancing age. New data on the spermatogonial stem cell. *J Androl.* 8, 64–68. Doi:10.1002/j.1939-4640.1987.tb00950.x
- Nistal, M., Paniagua, R. (1984). Development of the male genital tract. In *Testicular and Epididymal Pathology* (M. Nistal and R. Paniagua, Eds.), pp. 1–13. Thieme-Stratton, New York.
- Nitta, H., Bunick, D., Hess, R.A., Janulis, L., Newton, S.C., Millette, C.F., Osawa, Y., Shizuta, Y., Toda, K., Bahr, J.M. (1993). Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinol.* 132, 1396–1401.
- Nurmio, M., Toppari, J., Zaman, F., Andersson, A.M., Paranko, J., Soder, O., Jahnukainen K. (2007). Inhibition of tyrosine kinases PDGFR and C-kit by imatinib mesylate interferes with postnatal testicular development in the rat. *Int J Androl* 30, 366– 376; discussion 376. Doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00755.x.
- O’Neil, C.E., Nicklas, T.A., Rampersaud, G.C., Fulgoni, V.L. (2012). 100% Orange juice consumption is associated with better diet quality, improved nutrient adequacy, decreased risk for obesity, and improved biomarkers of health in adults. *Nutr. J.* 11, 107-121.
- Obianime, A.W., Roberts, I.I. Antioxidants, cadmium-induced toxicity, serum biochemical and the histological abnormalities of the kidney and testes of the male Wistar rats. *Niger. J. Physiol. Sci.* 2009;24:177–185.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal-tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95, 351–358.
- Olivares, A., Méndez, J.P., Zambrano, E., Cárdenas, M., Tovar, A., Perera-Marín, G., Ulloa-Aguirre, A. (2010). Reproductive axis function and gonadotropin microheterogeneity in a male rat model of diet-induced obesity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 166, 356-364.
- Orioli, I.M., Castilla, E.E., Scarano, G., Mastroiacovo, P. (1995). Effect of paternal age in achondroplasia, thanatophoric dysplasia, and osteogenesis imperfecta. *Am J Med Genet.* 59, 209–17.
- Overall, J., Bonney, S.A., Wilson, M., Beermann, A., Grace, M.H., Esposito, D., Lila, M.A., Komarnytsky, S. (2017). Metabolic effects of berries with structurally diverse anthocyanins. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 422-432. Doi: 10.3390/ijms18020422.
- Paniagua, R., Martin, A., Nistal, M., Amat, P. (1987). Testicular involution in elderly men: comparison of histologic quantitative studies with hormone patterns. *Fertil. Steril.* 47, 671–679.

- Pastor-Soler, N., Beaulieu, V., Litvin, T. N., Da Silva, N., Chen, Y., Brown, D., Buck, J., Levin, L. R., Breton, S. (2003). Bicarbonate-regulated adenylyl cyclase (sAC) is a sensor that regulates pH-dependent V-ATPase recycling. *J. Biol. Chem.* 278, 49523–49529.
- Patel, C., Ghanim, H., Ravishankar, S., Sia, C.L., Viswanathan, P., Mohanty, P., Dandona, P. 2007. Prolonged reactive oxygen species generation and nuclear factor-kappaB activation after a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 4476–4479.
- Paterni, I., Granchi, C., Katzenellenbogen, J.A., Minutolo, F. (2014). Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): Subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids* 90, 13-29.
- Pedret, A., Valls, R.M., Fernández-Castillejo, S., Catalán, Ú., Romeu, M., Giralt, M., Lamuela-Raventós, R.M., Medina-Remón, A., Arijia, V., Aranda, N., Espinel, A., Delgado, M.A., Solà, R. Polyphenol-rich foods exhibit DNA antioxidative properties and protect the glutathione system in healthy subjects. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 1025-1033.
- Pérez-Jiménez, J., Fezeu, L., Touvier, M., Arnault, N., Manach, C., Hercberg, S., Galan, P., Scalbert, A. (2011). Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 93, 1220–1228.
- Perheentupa, A., Huhtaniemi, I. (2009). Aging of the human ovary and testis. *Mol. Cell Endocrinol.* 299 2–13.
- Pires, V.C., Gollücke, A.P., Ribeiro, D.A., Lungato, L., D'Almeida, V., Aguiar O. (2013) Grape juice concentrate protects reproductive parameters of male rats against cadmium-induced damage: a chronic assay. *Br. J. Nutr.* 9, 1–10.
- Plagemann, I., Krings, U., Berger, R.G. (2012). Volatile constituents of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg) fruits. *J. Essent. Oil Res.* 24, 45–51.
- Pilletier, R.M. (1986). Cyclic formation and decay of the blood-testis barrier in the mink (*Mustela vison*): a seasonal breeder. *Am. J. Anat.* 175, 91–117.
- Pop, O. T., Cotoi, C. G., Plesea, I. E., Enache, S. D., Popescu, C. F., Enache, M. A., Plesea, R. M. (2011). Correlations between intralobular interstitial morphological changes and epithelial changes in ageing testis. *Rom. J. Morphol. Emryol.* 52(1 Suppl) 339-47.
- Predes, F.S., Diamante, M.A.S., Dolder, H. (2010). Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. *Int. J. Exp. Path.* 91 125-131.
- Predes, F.S., Monteiro, J.C., Matta, S.L.P., Garcia, M.C., Dolder H. (2011) Testicular histomorphometry and ultrastructure of rats treated with cadmium and *Ginkgo biloba*. *Biol. Trace Elem. Res.* 140, 330–341.
- Quatrin, A., Conte, L., Da Silva, D.T., et al. (2018). The Hepatoprotective Effect of Jaboticaba Peel Powder in a Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus Involves the Modulation of Thiol/Disulfide Redox State through the Upregulation of Glutathione Synthesis. *J Nutr Metab.* 1-13. Doi: 10.1155/2018/9794629
- Ramaswamy, S., Weinbauer, G.F. (2015). Endocrine control of spermatogenesis: role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis* 4, e996025. Doi:10.1080/21565562.2014.996025
- Rayalam, S., Yang, J.Y., Ambati, S., Della-Fera, M.A., Baile, C.A. (2008). Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother. Res.* 22, 1367–1371.
- Reddy, K. P., Madhu, P., Reddy, P. S. (2016). Protective effects of resveratrol against cisplatin-induced testicular and epididymal toxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* 91, 65-72. Doi: 10.1016/j.fct.2016.02.017.
- Reid, B. L., Cleland, K. W. (1957). The structure and function of the epididymis: histology of the rat epididymis. *Aust. J. Zool.* 5, 223–246.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Rad. Biol. Med.* 49, 1603–1616. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
- Rey, R.A., Grinspon, R.P., Gottlieb, S., Pasqualini, T., Knoblovits, P., Aszpis, S., Pacenza, N., Stewart, Usher, J., Bergadá, I., Campo, S.M. (2013). Male hypogonadism: an extended classification based on a developmental, endocrine physiology-based approach. *Androl.* 1, 3–16. (doi:10.1111/j.2047-2927.2012.00008.x)
- Reynertson, K.A., Yang, H., Jiang, B. (2006). Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chem.* 109, 883–890.
- Richardson, L.L., Kleinman, H.K., Dym, M. (1995). The effects of aging on basement membrane in the testis. *J. Androl.* 16 118-126.
- Rivera, L., Moron, R., Sanchez, M., Zarzuelo, A., Galisteo, M. (2008). Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring)* 16, 2081–2087.
- Robaire, B., Hermo, L. (1988). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press Ltd.: New York.
- Robaire, B.T.H., Orgebin-Crist, M.C. (2006). The Epididymis. In: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction* (3^a Ed). Jimmy D. Neill (Editor), Elsevier, 1071- 1179.
- Robb, G.W., Amann, R.P., Killian, G.J. (1978). Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J. Reprod. Fert.* 54 103-107.
- Robertson, K.M., O'Donnell, L., Jones, M.E., Meachem, S.J., Boon, W.C., Fisher, C.R., et al. (1999). Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp19) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7986–7991.
- Roghani, M., Baluchnejadmojarad, T. (2010). Hypoglycemic and hypolipidemic effect and antioxidant activity of chronic epigallocatechin-gallate in streptozotocin-diabetic rats. *Pathophysiology* 17, 55–59.

- Rossi, A., Serraino, I., Dugo, P., Di Paola, R., Mondello, L., Genovese, T., Morabito, D., Dugo, G., Sautebin, L., Caputi, A.P., et al. (2003). Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation. *Free Radic. Res.* 37, 891–900. Doi: 10.1080/1071576031000112690.
- Royer, C., Lucas, T. F., Lazari, M. F., Porto, C. S. (2012). 17Beta-estradiol signaling and regulation of proliferation and apoptosis of rat Sertoli cells. *Biol. Reprod.* 86(4) 112-132
- Rufino, M.S.M., Alves, R.E., Fernandes, F.A.N., Brito, E.S. (2010). Free radical scavenging behavior of tem exotic tropical fruits extracts. *Food Res. Int.* 44, 2072-2075.
- Salomon, T.B., Hackenhaar, F.S., Almeida, A.C., Schüller, A.K., Alabarse, P.V.G., Ehrenbrink, G., Benfato, M.S. (2013). Oxidative stress in testis of animals during aging with and without reproductive activity. *Exp. Geront.* 48, 940-946.
- Santiago, J., Silva, J. V., Alves, M. G., Oliveira, P. F., Fardilha, M. (2018). Testicular aging: an overview of ultrastructural, cellular and molecular alterations. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. A* 93, 234-245.
- Sartorius, G., Spasevska, S., Idan, A., et al. (2012). Serum testosterone, dihydrotestosterone and estradiol concentrations in older men self-reporting very good health: the healthy man study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 77, 755–763. doi:10.1111/j.1365-2265.2012.04432.x
- Sayed, M.M., Hassanein, K.M.A., Senosy, W. (2014). Protective effects of thymoquinone and l-cysteine on cadmium-induced reproductive toxicity in rats. *Toxicol. Reports.* 1, 612–20.
- Scazzocchio, B., Vari, R., Filesi, C., D'Archivio, M., Santangelo, C., Giovannini, C., Iacovelli, A., Silecchia, G., Li, Volti, G., Galvano, F., Masella, R. (2011). Cyanidin-3-O- β -glucoside and protocatechuic acid exert insulin-like effects by upregulating PPAR γ activity in human omental adipocytes. *Diabetes* 60, 2234-2244. Doi: 10.2337/db10-1461. Epub 2011 Jul 25.
- Schell, C., Albrecht, M., Spillner, S., Mayer, C., Kunz, L., Köhn, F. M., Mayerhofer, A. (2010). 15-Deoxy- delta12–14-prostaglandin-J2 induces hypertrophy and loss of contractility in human testicular peritubular cells: Implications for human male fertility. *Endocrinol.* 151, 1257–1268. Doi: <https://doi.org/10.1210/en.2009-132>.
- Schwarzenbach, H., Chakrabarti, G., Paust, H.J., Mukhopadhyay, A.K. (2004). Gonadotropin-mediated regulation of the murine VEGF expression in MA-10 Leydig cells. *J. Androl.* 25, 128–139.
- Seeley, R.R., Vanputte, C., Regan, J., Russo, A. (2014). Seeley's anatomy and physiology. Edição 10.
- Seiler, P., Cooper, T. G., Nieschlag, E. (2000). Sperm number and condition affect the number of basal cells and their expression of macrophage antigen in the murine epididymis. *Int. J. Androl.* 23, 65–76.
- Selmi, S., Rtibi, K., Grami, D., Sbai, H., Marzouki, L. (2018). *Lavandula stoechas* essential oils protect against Malathion-induced reproductive disruptions in male mice. *Lipids Health Dis* 8, 253-266. Doi: 10.1186/s12944-018-0891-5
- Serra, D., Mera, P., Malandrino, M.I., Mir, J.F., Herrero, L. (2012). Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *Antioxid. Redox Signal.* Doi: 10.1089/ars.2012.4875.
- Serre, V., Robaire, B. (1998). Segment-specific morphological changes in aging Brown Norway rat epididymis. *Biol. Reprod.* 58, 497-513.
- Serre, V., Robaire, B. (1999). The distribution of immune cells in the epithelium of the epididymis of the aging brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content. *Biol. Reprod.* 61, 705–714.
- Shao, W., Yu, Z., Chiang, Y., Yang, Y., Chai, T., Foltz, W., Lu, H., Fantus, I.G., Jin, T. (2012). Curcumin prevents high fat diet induced insulin resistance and obesity via attenuating lipogenesis in liver and inflammatory pathway in adipocytes. *PLoS One* 7, e28784.
- Sharma, R., Agarwal, A., Rohra, V.K., Assidi, M., Abu-Elmagd, M., Turki, R.F. (2015). Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring. *Reprod Biol Endocrinol.* 13, 35. Doi:10.1186/s12958-015-0028-x
- Sharma, R.K., Agarwal, A. (1996). Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 48, 835–850.
- Shehzad, A., Khan, S., Lee, Y. (2012). Curcumin molecular targets in obesity and obesity-related cancers. *Future Oncol.* 8, 179–190.
- Shupe, J., Cheng, J., Puri, P., Kostereva, N., Walker, W.H. (2011). Regulation of Sertoli germ cell adhesion and sperm release by FSH and non classical testosterone signaling. *Mol. Endocrinol.* 25 38–252.
- Si, H., Fu, Z., Babu, P.V., Zhen, W., Leroith, T., Meaney, M.P., Voelker, K.A., Jia, Z., Grange, R.W., Liu, D. (2011). Dietary epicatechin promotes survival of obese diabetic mice and *Drosophila melanogaster*. *J. Nutr.* 141, 1095–1100.
- Sibert, L., Lacarrière, E., Safsaf, A., Rives, N. (2014). Aging of the human testis. *Presse Medicale (Paris, France: 1983)* 43, 171–177. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2013.12.003>
- Sies, H., Stahl, W., Sevanian, A. (2005). Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J. Nutr.* 135, 969–972.
- Simas, J.N., Mendes, T.B., Paccola, C.C., Vendramini, V., Miraglia, S.M., 2017. Resveratrol attenuates reproductive alterations in type 1 diabetes-induced rats. *Int. J. Exp. Pathol.* 98, 312-328. Doi: 10.1111/iep.12251.
- Singer, R., Sagiv, M., Levinsky, H. e Allalouf, D. (1990). Andrological parameters in men with high sperm counts and possible correlation with age. *Arch. Androl.* 24 107–111.
- Singh, T., Newman, A.B. (2011). Inflammatory markers in population studies of aging. *Ageing Res. Rev.* 10, 319-329.
- Siriwardhana, N., Kalupahana, N.S., Cekanova, M., Lemieux, M., Greer, B., Moustaid-Moussa, N. (2013). Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *J. Nutr. Biochem.* 24, 613–623.

- Smith, E.P., Boyd, J., Frank, G.R., Takahashi, H., Cohen, R.M., Specker, B., et al. (1994). Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N. Engl. J. Med.* 331, 1056–61.
- Snyder, P.J. (2014). Male Reproductive Aging. In: Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology (Seventh Edition). Jerome F. Strauss III, Robert L. Barbieri (Editors), 340-347.
- Stanton, P.G. (2016). Regulation of the blood-testis barrier. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 59 166–173. Doi:10.1016/j.semcdb.2016.06.018
- Strandgaard, C. e Miller, M.G. (1998). Germ cell apoptosis in rat testis after administration of 1,3-dinitrobenzene . *Reprod. Toxicol.* 12 97– 103.
- Strauss, R.S. (1999). Comparison of serum concentrations of -tocopherol and -carotene in a cross-sectional sample of obese and nonobese children (NHANES III). *J. Pediatr.* 134, 160–165.
- Sujarit, S., Pholpramool, C. (1985). Enhancement of sperm transport through the rat epididymis after castration. *J. Reprod. Fertil.* 74, 497–502.
- Sullivan, L.B., Chandel, N.S. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab.* 2, 2-17.
- Sullivan, R. (2015). Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. *A. J. Androl.* 17, 726–729. Doi:10.4103/1008- 682X.155255
- Syntin, P., Chen, H., Zirkin, B. R., Robaire, B. (2001). Gene expression in Brown Norway rat Leydig cells: Effects of age and of age-related germ cell loss. *Endocrinology*, 142, 5277–5285. Doi: <https://doi.org/10.1210/endo.142.12.8526>
- Syntin, P., Robaire B. (2001). Sperm Structural and Motility Changes During Aging in the Brown Norway Rat. *J. Androl.* 22, 235–244.
- Taha, E.A., Sayed, S.K., Gaber, H.D., Abdel, Hafez, H.K, Ghandour, N., Zahran, A., Mostafa, T. (2016). Does being overweight affect seminal variables in fertile men?. *Reproduct. BioMed. Online* 33, 703–708. Doi:10.1016/j.rbmo.2016.08.023
- Takahashi, J., Higashi, Y., LaNasa, J.A., et al. (1983). Studies of the human testis. XVIII. Simultaneous measurement of nine intratesticular steroids: evidence for reduced mitochondrial function in testis of elderly men. *J Clin Endocrinol Metab.* 56, 1178–1187. doi:10.1210/jcem-56-6-1178
- Takano, H., Abe, K., Ito, T. (1981). Changes in the mouse epididymis after ligation of the ductuli efferentes or proximal epididymal duct: qualitative and quantitative histological studies [author's translation]. *Kaibogaku Zasshi* 56, 79–90.
- Tenover, J.S. (2003). Declining testicular function in aging men. *Int J Impot Res.* 15, S3–S8. Doi:10.1038/sj.ijir.3901029.
- Timmers, S., Konings, E., Bilet, L., Houtkooper, R.H., van de Weijer, T., Goossens, G.H., Hoeks, J., van der Krieken, S., Ryu, D., Kersten, S., et al. (2011). Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell. Metab.* 14, 612–622.
- Tortora, G.J. (2007). Princípios De Anatomia Humana. 10 Ed. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan.
- Tracy, R.P. (2003). Emerging relationships of inflammation, cardiovascular disease and chronic diseases of aging. *Int J Obes Relat. Metab. Disord.* 27, S29-S34.
- Tran, B., Oliver, S., Rosa, J., Galassetti, P. (2012). Aspects of inflammation and oxidative stress in pediatric obesity and type 1 diabetes: An overview of ten years of studies. *Exp. Diabetes Res.* Doi: 10.1155/2012/683680.
- Trindade, A. A. T., Simões, A. C. P., Silva, R. J., Macedo, C. S., Spadella, C. T. (2013). Long term evaluation of morphometric and ultrastructural changes of testes of alloxan-induced diabetic rats. *Acta Cir. Brasil.* 28(4) 256-265.
- Tsai, S.C., Lu, C.C., Lin, C.S., Wang, P.S. (2003). Antisteroidogenic actions of hydrogen peroxide on rat Leydig cells. *J. Cell Biochem.* 90, 1276–1286.
- Tsai, Y.S., Maeda, N. (2005). PPARgamma: a critical determinant of body fat distribution in human and mice. *Trend. Cardiovasc. Med.* 15, 81-85.
- Tsatsanis, C., Dermitzaki, E., Avgoustinaki, P., Malliaraki, N., Mytaras, V., Margioris, A.N. (2015). The impact of adipose tissue-derived factors on the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. *Hormones* 14, 549–562. Doi:10.14310/horm.2002.1649
- Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H., Osawa, T. (2003). Dietary cyanidin 3-O-b-Dglucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *J. Nutr.* 133, 2125–2130.
- Tunc, O., Bakos, H.W., Tremellen, K. (2011). Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrologia* 43, 121–128. Doi:10.1111/j.1439- 0272.2009.01032.x.
- Turner, T. T., Bomgardner, D., Jacobs, J. P., Nguyen, Q. A. (2003). Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduct.* 125, 871–878.
- Turner, T. T., Gleavy, J. L., Harris, J. M. (1990). Fluid movement in the lumen of the rat epididymis: effect of vasectomy
- Tzanetakou, I.P., Katsilambros, N.L., Benetos, A., Mikhaelidis, D.P., Perrea, D.N. (2012). “Is obesity linked to aging?”: Adipose tissue and the role of telomeres. *Ageing Res. Rev.* 11, 220–229.
- Veggi, P.C., Cavalcanti, R.N. e Meireles, M.A.A. (2014). Production of phenolic-rich extracts from Brazilian plants using supercritical and subcritical fluid extraction: experimental data and economic evaluation. *J. Food Engin.* 131 96-109.
- Veldhuis, J.D., Keenan, D.M., Iranmanesh, A., Takahashi, P.Y., Nehra, A.X. (2007). The ensemble male hypothalamo-pituitary-gonadal axis. In: Timiras, PS, editor. *Physiological Basis of Aging and Geriatrics.* 12. Taylor & Francis Group; LLC, Health Science Division, New York, 12, 185-203.
- Vendrame, S., Del Bo, C., Ciappellano, S., Riso, P., Klimis-Zacas, D. (2016). Berry fruit consumption and metabolic syndrome. *Antioxidants* 5, 5-34. Doi: 10.3390/antiox5040034.

- Vendramini, V., Cedenho, A. P., Miraglia, S. M., Spaine, D. M. (2014). Reproductive function of the male obese Zucker rats: alteration in sperm production and sperm DNA damage. *Reprod. Sci.* 21, 221-229.
- Veri, J. P., Hermo, L., Robaire, B. (1993). Immunocytochemical localization of the Yf subunit of glutathione S-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis
- Vernet, P., Fulton, N., Wallace, C., Aitken, R.J. (2001). Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 65, 1102-1113.
- Vernet, P., Aitken, R.J., Drevet, J.R. (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 216, 31-39.
- Victor, V.M., Rocha, M., De la, F. M. (2004). Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *Int. Immunopharmacol.* 4, 327-47.
- Vidal, J.D., Whitney, K.M. (2014). Morphologic manifestations of testicular and epididymal toxicity. *Spermatogenesis* 45 98-108.
- Viguera-Villaseñor, R. M., Rojas-Castañeda, J. C., Chavez-Saldana, M., Gutiérrez-Pérez, O., García-Cruz, M. E., Cuevas-Alpuche, O., Zambrano, E. (2011). Alterations in the spermatogenic function generated by obesity in rats. *Acta Histochem.* 113, 214-220.
- Von Lanz, T., Neuhauser, G. (1964). Morphometrische Analyse des menschlichen Nebenhodens. *Z. Anat. Entwickl.* 124, 126-152.
- Walker, W.H., Fucci, L. e Habener, J.F. (1995). Expression of the gene encoding transcription factor cyclic adenosine 30,50-monophosphate (cAMP) response element-binding protein (CREB): regulation by follicle-stimulating hormone-induced cAMP signaling in primary rat Sertoli cells. *Endocrinol.* 136 3534-3545.
- Wallace, T.C., Slavin, M., Frankenfeld, C.L. (2016). Systematic review of anthocyanins and markers of cardiovascular disease. *Nutrients* 8, 9-32. Doi: 10.3390/nu8010032.
- Wang, F.F., Wang, Q., Chen, Y., Lin, Q., Gao, H.B., Zhang, P. (2012). Chronic stress induces ageing associated degeneration in rat Leydig cells. *Asian J Androl.* 14, 643-8.
- Wang, H. J., Wang, Q., Lv, Z. M., Wang, C. L., Li, C. P., Rong, Y. L. (2015). Resveratrol appears to protect against oxidative stress and steroidogenesis collapse in mice fed high-calorie and high-cholesterol diet. *Androl.* 47, 59-65.
- Wang, S., Kaufman, R.J. (2012). The impact of the unfolded protein response on human disease. *J. Cell. Biol.* 197, 857-867.
- Wang, S., Wang, G., Barton, B.E., Murphy, T.F., Huang, H.F. (2005). Impaired sperm function after spinal cord injury in the rat is associated with altered cyclic adenosine monophosphate signaling. *J. Androl.* 26, 592-600.
- Wang, W.H., Tyan, Y.C., Chen, Z.S., et al. (2014). Evaluation of the antioxidant activity and antiproliferative effect of the jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) seed extracts in oral carcinoma cells. *Biomed. Res. Int.* 2014, 185-196. Doi:10.1155/2014/185946
- Wang, Y., Chen, F., Ye, L., Zirkin, B., Chen, H. (2017). Steroidogenesis in Leydig cells: effects of aging and environmental factors. *Reproduction* 154, R111-R122. doi:10.1530/REP-17-0064
- Warolin, J., Coenen, K.R., Kantor, J.L., Whitaker, L.E., Wang, L., Acra, S.A., Roberts, L.J., Buchowski, M.S. (2013). The relationship of oxidative stress, adiposity and metabolic risk factors in healthy Black and White American youth. *Pediatr. Obese.* Doi: 10.1111/j.2047-6310.2012.00135.
- Warolin, J., Coenen, K.R., Kantor, J.L., Whitaker, L.E., Wang, L., Acra, S.A., Roberts, L.J., Buchowski, M.S. (2013). The relationship of oxidative stress, adiposity and metabolic risk factors in healthy Black and White American youth. *Pediatr. Obes.* Doi: 10.1111/j.2047-6310.2012.00135.
- Wazzan, W. C., Gwatkin, R. B. L., Thomas, A. J., Jr. (1990). Zona drilling enhances fertilization by mouse caput epididymal sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 27, 332-336.
- Weir, C.P., Robaire, B. (2007). Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the Brown Norway rat. *J. Androl.* 28, 229-240.
- Welsh, T.H., Hsueh, Jr. A. (1982). Mechanism of the inhibitory action of epidermal growth factor on testicular androgen biosynthesis in vitro. *J. Endocrinol.* 110, 1498-1506.
- Wheeler, C.R., Salzman, J.A., Elsayed, N.M., Omayse, S.T., Korte, D.W. Jr. (1990). Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Anal Biochem* 184, 193-199.
- Whiting, S., Derbyshire, E., Tiwari, B.K. (2012). Capsaicinoids and capsinoids. A potential role for weight management? A systematic review of the evidence. *Appetite* 59, 341-348.
- WHO. (2012). World Health Organization Fact Sheet for World Wide Prevalence of Obesity. Acessado em: 11 de abril de 2019. Disponível online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.
- Winterbourn, C.C., Hawkins, R.E., Brian, M., Carrell, R.W. (1975). Estimation of red-cell superoxide-dismutase activity. *J Lab Clin Med* 85, 337-341.
- World Health Organization. (2018). The Nutrition Challenge: Food System Solutions. 1st ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations 1-12.
- Wu, F.C., Tajar, A., Pye, S.R., et al. (2008). European Male Aging Study Group. Hypothalamic-pituitary-testicular axis disruptions in older men are differentially linked to age and modifiable risk factors: the European Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 93, 2737-2745. doi:10.1210/jc.2007-1972
- Wu, S.B., Dastmalchi, K., Long, C.L., Kennelly, E.J. (2012). Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. *J. Agric. Food Chem.* 60, 7513-7525.

- Xi, Y.P., Nette, E.G., King, D.W., Rosen, M. (1982). Age-related changes in normal human basement membrane. *Mech Ageing Dev.* 19, 315–324. Doi:10.1016/0047-6374(82)90015-X
- Xia, S., Zhang, X., Zheng, S., Khanabdali, R., Kalionis, B., Wu, J., Tai, X. (2016). An update on inflamm-aging: Mechanisms, prevention, and treatment. *J. Immunol. Res.* 8426874. Doi: doi.org/10.1155/2016/8426874
- Yuzefovych, L.V., Musiyenko, S.I., Wilson, G.L., Rachek, L.I. (2013). Mitochondrial DNA damage and dysfunction, and oxidative stress are associated with endoplasmic reticulum stress, protein degradation and apoptosis in high fat diet-induced insulin resistance mice. *PLoS One* 8, e54059.
- Zhang, E., Xu, F., Liang, H., Yan, J., Xu, H., Li, Z., Wen, X., Weng, J. (2015). GLP-1 receptor agonist exenatide attenuates the detrimental effects of obesity on inflammatory profile in testis and sperm quality in mice. *Am. J. Reproduct. Immunol.* 74, 457–466. Doi:10.1111/aji.12420
- Zhang, H., Yin, Y., Wang, G., Liu, Z., Liu, L., Sun, F. (2014). Interleukin-6 disrupts blood-testis barrier through inhibiting protein degradation or activating phosphorylated ERK in Sertoli cells. *Sci. Reports* 4, 4260. Doi:10.1038/srep04260.
- Zheng-mei, L.V., Wang, Q.J., Yuan-hua, C., Wang, S., Haung, D., 2015. Resveratrol attenuates inflammation and oxidative stress in epididymal white adipose tissue: Implications for its involvement in improving steroidogenesis in diet-induced obese mice. *Mol. Reprod. Develop.* 82, 321-328. Doi: <https://doi.org/10.1002/mrd.22478>.
- Zingg, J.M., Hasan, S.T., Meydani, M. (2013). Molecular mechanisms of hypolipidemic effects of curcumin. *Biofactors* 101-121. Doi: 10.1002/biof.1072.
- Zirkin, B. R., Chen, H. (2000). Regulation of leydig cell steroidogenic function during aging. *Biology of Reproduction*, 63, 977–981. Doi: <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.4.977>.
- Zirkin, B.R., Santulli, R., Strandberg, J.D., Wright, W.W., Ewing, L.L. (1993). Testicular steroidogenesis in the aging brown Norway rat. *J Androl.* 14, 118– 123. doi:10.1002/j.1939–4640.1993.tb01663.x.

ANEXOS I



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DO EXTRATO DA CASCA DE JABUTICABA FRENTE A SENESCÊNCIA E OBESIDADE SOBRE O TESTÍCULO E EPIDIDIMO DE CAMUNDONGOS (FVB)**", protocolo nº **4038-1**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder / Lívia Cuquetto Leite**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e 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**, e foi aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **27 de outubro de 2015**.

Vigência do projeto: **11/2015-03/2016**

Espécie/Linhagem: **Camundongo isogênico / FVB/JUnib**

No. de animais: **50**

Idade/Peso: **11 meses / 60g**

Sexo: **machos**

Origem: **CEMIB/UNICAMP**

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 27 de outubro de 2015.

Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXOS II



CEUA/Unicamp

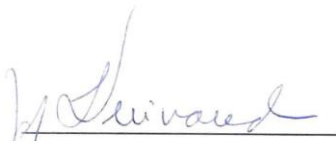
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

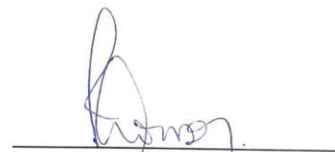
Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DO EXTRATO DA CASCA DE JABUTICABA FRENTE A SENESCÊNCIA E OBESIDADE SOBRE O TESTÍCULO E EPIDIDIMO DE CAMUNDONGOS (FVB)** (protocolo CEUA/UNICAMP nº **4038-1**), de responsabilidade da **Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder e Livia Cuquetto Leite**, teve a solicitação de prorrogação de término do projeto em 15/07/2019 aprovada pela CEUA/UNICAMP.

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP em 27/10/2015.

Campinas, 19 de julho de 2018.



Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Coordenador



Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXOS III



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Comissão de Ética no Uso de Animais



CEUA/UNICAMP

Certificamos que **LÍVIA CUQUETTO LEITE** concluiu o curso online **Legislação e procedimentos para utilização de animais de laboratório**, oferecido pelo **Instituto de Biologia da UNICAMP** e pela **Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório - CEUA/UNICAMP**.

Este certificado tem validade de 02 (dois) anos a partir da data de emissão.

Campinas, 01 de maio de 2019.

A handwritten signature in blue ink that reads "Wagner José Fávaro".


Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Professor Assistente Doutor
Presidente da CEUA/UNICAMP


ANEXOS IV

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DO EXTRATO DA CASCA DE JABUTICABA FRENTE À SENESCÊNCIA E OBESIDADE SOBRE O TESTÍCULO E EPIDÍDIMO DE CAMUNDONGOS (FVB)**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 09 de setembro de 2019

Assinatura: 
Nome do(a) autor(a): **Livia Cuquetto Leite**
RG n.º 17 122 110

Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): **Mary Anne Heidi Dolder**
RG n.º 3 188 240