

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

HILARA NIEMEYER RUAS

**Efeitos da infusão comercial de Rooibos (*Aspalathus linearis*)
sobre o parênquima testicular de camundongos BALB/c
adultos submetidos à dieta hipercalórica**

**Julho
2021**

HILARA NIEMEYER RUAS

**Efeitos da infusão comercial de Rooibos (*Aspalathus linearis*)
sobre o parênquima testicular de camundongos BALB/c
adultos submetidos à dieta hipercalórica**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde, área de concentração: Patologia Investigativa, sob a orientação do Prof. Dr. Marcos de Lucca Moreira Gomes e coorientação da Dr^a Fernanda Carolina Ribeiro Dias.

Uberaba/MG

2021

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

R822e Ruas, Hilara Niemeyer
Efeitos da infusão comercial de Rooibos (*Aspalathus linearis*)
sobre o parênquima testicular de camundongos BALB/c adultos
submetidos à dieta hipercalórica / Hilara Niemeyer Ruas. -- 2021.
54 p. : il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2021
Orientador: Prof. Dr. Marcos de Lucca Moreira Gomes
Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Carolina Ribeiro Dias

1. Túbulos seminíferos. 2. Espermatozoides. 3. Estresse oxida-
tivo. 4. *Aspalathus*. 5. Obesidade. 6. Dieta hipercalórica. I. Gomes,
Marcos de Lucca Moreira. II. Universidade Federal do Triângulo
Mineiro. III. Título.

CDU 616.69

HILARA NIEMEYER RUAS

**Efeitos da infusão comercial de Rooibos (*Aspalathus linearis*)
sobre o parênquima testicular de camundongos BALB/c adultos
submetidos à dieta hipercalórica**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde, área de concentração: Patologia Investigativa, sob a orientação do Prof. Dr. Marcos de Lucca Moreira Gomes e coorientação da Dr^a Fernanda Carolina Ribeiro Dias.

Uberaba, 27 de julho de 2021

Banca Examinadora

Dr. Marcos de Lucca Moreira Gomes - Orientador
Universidade Federal do Triângulo Mineiro/UFTM

Prof. Dra. Angelica de Oliveira Gomes
Universidade Federal do Triângulo Mineiro/UFTM

Prof. Dr. Sérgio Luis Pinto da Matta
Universidade Federal de Viçosa/UFV

AGRADECIMENTOS

Agradecimento a todos profissionais que direta ou indiretamente contribuíram e se dedicaram para o desenvolvimento desse trabalho: aos professores da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Dr. Marcos de Lucca Moreira Gomes, Dra. Maria Laura Pinto Rodrigues, Dra. Angelica de Oliveira Gomes, Dr. Marcus Vinícius da Silva, Dra Maria Emília Soares Martins dos Santos; aos técnicos administrativos educacionais Dra. Lígia Carolina da Silva Prado, Ms. Lívia Alves Martins, Kelson Colmanetti Moreira, Ana Carolina Estevam dos Santos Frange, Christiane Ruffato Carminati, Ana Carolina de Moraes Oliveira; e a aluna Julia Menezes.

Em prosseguimento, segue meu agradecimento ao grupo de trabalho da Universidade Federal de Viçosa - UFV onde pude desenvolver importante etapa para complementação do presente trabalho. Minha gratidão à Prof. Dra. Mariella Bontempo Duca de Freitas do CCB-UFV, Dra. Fernanda Carolina Ribeiro Dias e Prof. Dr. Sérgio Luís Pinto da Matta.

RESUMO

O estresse oxidativo, devido à obesidade, desempenha um papel prejudicial no microambiente testicular e nos parâmetros do esperma. Esse comprometimento do potencial reprodutivo desencadeia uma sucessão de eventos que são prejudiciais às células testiculares, culminando na infertilidade. No presente estudo, exploramos o impacto de uma dieta hipercalórica em camundongos BALB/c machos como uma condição para desencadear danos ao processo espermatogênico e testamos o efeito antioxidante da espécie comercial *Aspalathus linearis* (Rooibos). Para isso, foi utilizada dieta hipercalórica (4,4 Kcal / g) composta por 74,2% de carboidratos, 5,8% de gordura e 20% de proteína nos animais divididos em 3 grupos (n = 8): Controle, HC (dieta hipercalórica e água) e HCR (dieta hipercalórica e Rooibos). Parâmetros morfométricos testiculares, dosagens enzimáticas, viabilidade celular e histopatologia tubular foram avaliados. O peso corporal aumentou em animais HCR nas semanas 3, 4 e 8, respectivamente. As análises morfométricas testiculares indicaram diminuição da altura do epitélio seminífero, com aumento do diâmetro tubular do grupo HCR, indicando alterações nas células germinativas. Os níveis de catalase foram menores em HC e HCR, enquanto os níveis de proteína carbonilada diminuíram em HC. As alterações registradas podem ser consideradas como uma resposta inicial aos danos causados pela dieta hipercalórica às células germinativas. Portanto, apesar de considerar o tempo de exposição à dieta relativamente curto, estimamos que ele induz estresse oxidativo capaz de afetar o epitélio seminífero e que a infusão de *A. linearis* comercial não demonstra benefício potencial na preservação celular.

Palavras-chave: obesidade; dieta hipercalórica; estresse oxidativo; *Aspalathus linearis* (Rooibos).

ABSTRACT

Oxidative stress due to obesity plays a detrimental role in the testicular microenvironment and sperm parameters. This impairment of reproductive potential triggers a succession of events that are harmful to testicular cells, culminating in infertility. In the present study, we explored the impact of a hypercaloric diet in male BALB/c mice as a condition to trigger damage to spermatogenesis. Hence, we have tested the antioxidant effect of the commercial species *Aspalathus linearis* (Rooibos). To do so, we used a hypercaloric diet (4.4 Kcal/g) composed of 74.2% carbohydrates, 5.8% fat and 20% protein in animals divided into 3 groups (n=8): Control, HC (hypercaloric diet and water) and HCR (hypercaloric diet and Rooibos). Testicular morphometric parameters, enzyme dosages, cell viability and tubular histopathology were evaluated. Body weight increased in HCR animals at weeks 3, 4 and 8, respectively. Testicular morphometric analyzes indicated decreased seminiferous epithelium height, with an increase in the tubular diameter of the HCR group, indicating germ cell's alterations. Catalase levels were lower in HC and HCR, while carbonyl protein was decreased in HC. The changes recorded may be considered as an initial response to the damage caused by the hypercaloric diet to the germ cells. Therefore, despite considering the time of exposure to the diet relatively short, we estimate that it induces oxidative stress capable of affecting the seminiferous epithelium and that the infusion of commercial *A. linearis* do not demonstrate a potential benefit in cell preservation.

Keywords: obesity; high-fat diet; oxidative stress; *Aspalathus linearis* (Rooibos).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Obesidade	10
1.2 Sistema Reprodutor Masculino: Testículos e Processo Espermatogênico	11
1.3 Efeitos do estresse oxidativo sobre o sistema reprodutor masculino	13
1.4 Substâncias antioxidantes	15
1.5 <i>Aspalathus linearis</i> - Rooibos	17
2 JUSTIFICATIVA	19
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Grupos Experimentais	21
4.2 Preparação da Dieta hipercalórica	21
4.3 Preparação da infusão de Rooibos	22
4.4 Consumo alimentar, ingestão e consumo hídrico	22
4.5 Coleta e processamento do material biológico	22
4.6 Morfometria testicular	23
4.6.1 Índice Gonadossomático (%)	23
4.6.2 Morfometria e cálculos das medidas dos túbulos seminíferos	23
4.6.3 Proporções volumétricas (%) dos componentes do parênquima testicular	24
4.6.4 Contagem populacional dos túbulos seminíferos	25
4.6.5 Razões entre os números celulares	27
4.6.6 Morfologia Espermática	27
4.7 Dosagens enzimáticas para detecção de Estresse Oxidativo	28
4.8 Avaliação da viabilidade celular	29
4.9 Histopatologia testicular	29
4.10 Análises Estatísticas	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
ARTIGO	38
5 CONCLUSÃO	54
6 ANEXOS	55

ANEXO 1 – Aprovação CEUA/UFTM	55
ANEXO 2 – Artigo submetido	56

1 INTRODUÇÃO

Com alta prevalência global ((MCPHERSON; LANE, 2015), a obesidade - definida como uma síndrome caracterizada por deposição excessiva de lipídios nos tecidos (LEISEGANG; DUTTA, 2020) - é uma desordem metabólica resultante de causas comportamentais, ambientais e hereditárias, sendo indiscutível o fato de que ela contribui para o comprometimento do potencial reprodutivo masculino (ABIAD et al., 2017; LIU; DING, 2017; PHILLIPS; TANPHAICHITR, 2010). Ademais, a obesidade promove ainda complicações cardiovasculares, hiperlipidemia, diabetes mellitus tipo 2 (FAN et al., 2018), vários tipos de câncer, neurodegeneração e aceleração do envelhecimento (LEISEGANG; HENKEL; AGARWAL, 2019). Ali; Martinez; Parekh (2020) confirmam que a infertilidade agora é considerada um problema de saúde global.

Para Leisegang *et al.* (2020) somente o Índice de Massa Corporal (IMC) - relação entre a massa corporal (kg) e o quadrado da altura do indivíduo (m^2) - não deve ser considerado como único indicador para obesidade, uma vez que não leva em consideração a distribuição e o tipo de gordura corporal acumulada. Também não considera as proporções de massa magra nem a distribuição da adiposidade visceral, o que poderia sub ou superestimar o risco de obesidade. Neste contexto, Agarwal *et al.* (2019) propõem que o potencial reprodutivo masculino não pode ser adequadamente avaliado se as espécies reativas de oxigênio (ERO's) forem negligenciadas. Neste sentido, McPerson e Lane (2015), descrevem que estudos com modelos animais promovem melhor avaliação do impacto da adiposidade sobre os parâmetros reprodutivos em machos, uma vez que avalia os parâmetros metabólicos, medidas de composição corporal, ganho de peso e medição de tecido adiposo que podem fornecer informações adicionais do estado inflamatório.

1.1 OBESIDADE

A obesidade induz o organismo a um estado inflamatório crônico ou pró-inflamatório onde os adipócitos, presentes no tecido adiposo, produzem e secretam uma grande quantidade de moléculas, denominadas adipocitocinas ou adipocinas (LEISEGANG et al., 2020). Esse tecido adiposo é constituído por pré-adipócitos – contendo ou não lipídios - células endoteliais e leucócitos (TILG; MOSCHEN, 2006).

Algumas citocinas como o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e as Interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-18), mediadoras da inflamação, são responsáveis por atrair macrófagos para a região-alvo (LIU; DING, 2017; MCPHERSON; LANE, 2015; TILG; MOSCHEN, 2006). As citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- α , prejudicam o epitélio seminífero e epididimal criando, assim, altos níveis de ERO's (LIU; DING, 2017), concomitante à redução dos níveis de antioxidantes (DUTTA; MAJZOUB; AGARWAL, 2019). Como Fan *et al.* (2018) descreveram, muitos estudos demonstraram que os adipócitos podem diretamente expressar TNF- α em roedores, sugerindo que esta citocina tem papel crucial na indução da resposta inflamatória em obesos.

A inflamação é uma resposta multissistêmica coordenada contra qualquer estímulo prejudicial, envolvendo uma interação complexa entre mediadores moleculares e celulares que acaba por direcionar o aumento das citocinas inflamatórias. Essas são sintetizadas por diferentes células: células imunes, células endoteliais, células do músculo liso arterial e adipócitos (LEISEGANG; HENKEL; AGARWAL, 2019). Leisegang e Dutta (2020) descrevem que a inflamação é responsável pelo aumento na formação de ERO's nos testículos, no trato reprodutivo e no sêmen, o que afeta negativamente a espermatogênese e esteroidogênese.

Com o aumento da prevalência de obesidade na população e elevação - em cerca de 15% - nas taxas de infertilidade entre casais obesos em idade reprodutiva (LEISEGANG; HENKEL; AGARWAL, 2019), estudos iniciaram investigações acerca do comprometimento do sistema reprodutor masculino gerado pela obesidade (ABIAD *et al.*, 2017; KEFER; AGARWAL; SABANEKH, 2009; LEISEGANG; HENKEL; AGARWAL, 2019; SALAS-HUETOS; BULLÓ; SALAS-SALVADÓ, 2017). Em linhas gerais, o excesso de tecido adiposo visceral em obesos ocasiona alterações nos níveis hormonais e promove um estado inflamatório crônico no trato reprodutor masculino, prejudicando fisiologicamente os espermatozoides, tanto durante a espermatogênese quanto na maturação espermática no epidídimo e, assim, reduzindo a qualidade espermática e aumentando o risco de infertilidade masculina (LIU; DING, 2017).

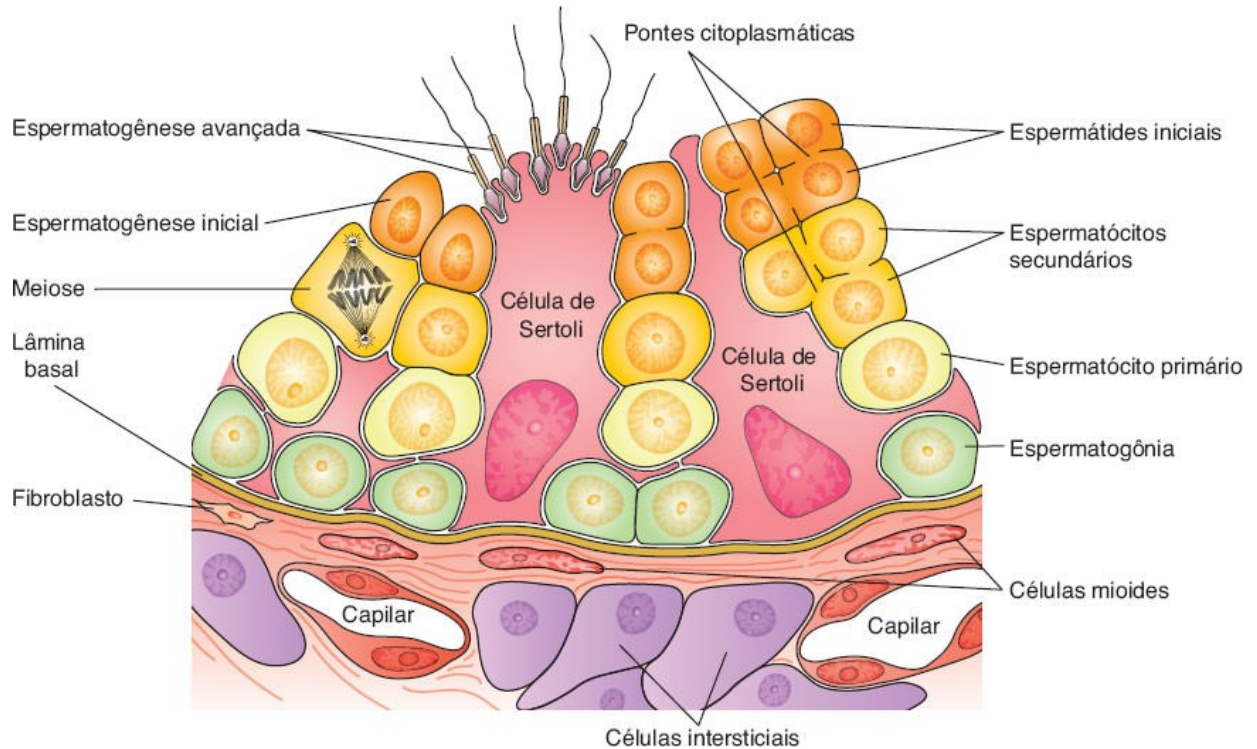
1.2 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO: TESTÍCULOS E PROCESSO ESPERMATOGÊNICO

O testículo, geralmente localizado no escroto, é um órgão com funções exócrinas e endócrinas e se mostra envolvido por uma espessa cápsula de tecido

conjuntivo - a albugínea. A atribuição endócrina dos testículos diz respeito a biossíntese hormonal - principalmente testosterona - enquanto sua função exócrina é responsável pela espermatogênese - produção, armazenamento e transporte de espermatozoides (HALES, 2002). Funcionalmente, os testículos podem ser divididos em dois compartimentos: o intersticial (intertubular) e o tubular (RUSSELL *et al.*, 1990).

Compõem o compartimento intersticial testicular: as células de Leydig, os vasos sanguíneos e os espaços linfáticos, além de nervos e de uma população celular variável constituída principalmente de fibroblastos e de macrófagos, os quais estão diretamente associados às células de Leydig. O compartimento tubular ou espermatogênico é formado pelo epitélio seminífero testicular constituído por células de Sertoli e células espermatogênicas como espermatogônias, espermatócitos primários e secundários, espermátides arredondadas e espermátides alongadas (HALES, 2002), sendo que as espermatogônias e os espermatócitos em pré-leptóteno que repousam sobre a lâmina basal, estão dispostos ordenadamente, desta até o lúmen tubular (SILVA, 2020), conforme Figura 1. Além dessas células, existem ainda células mioides, localizadas na região peritubular. Elas exercem papel auxiliar na regulação do processo espermatogênico nos testículos de mamíferos como, por exemplo, regulação no transporte de espermatozoides e fluido luminal por contração muscular, e, também, secretam fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular (UCHIDA *et al.*, 2020).

Figura 1 - Ilustração das células do compartimento intersticial e tubular de testículos.



Fonte: Junqueira e Carneiro (2017, p.427)

O processo espermatogênico envolve uma sequência única e especializada de eventos nas células do epitélio dos túbulos seminíferos que se inicia com a diferenciação das células germinativas testiculares primordiais e culmina com a produção de espermatozoides haploides funcionais sob a regulação e influência hormonal. Essa influência hormonal advém das células de Sertoli (CHEN1 et al., 2019; SCHULZ; MIURA, 2002). Além dessa função, as células de Sertoli ainda são responsáveis pela manutenção e viabilidade das células germinativas, transporte de nutrientes pela barreira hemato-testicular e sustentação entre os tipos celulares (RUSSELL *et al.*, 1990).

A espermatogênese pode ser, didaticamente, dividida em três fases, de acordo com diferentes características funcionais: (a) fase proliferativa ou espermatogonial representada por divisões mitóticas espermatogoniais rápidas e sucessivas; (b) fase meiótica que envolve a síntese de DNA no espermatócito em pré-leptóteno, síntese de RNA no espermatócito em paquíteno e finalização da meiose (durante a qual ocorre uma divisão reducional), acompanhada de recombinação gênica e uma divisão

equacional na qual, teoricamente, cada espermatócito secundário na fase de paquíteno dará origem a quatro espermátides haploides; e, finalmente, (c) fase de diferenciação ou espermiogênica, onde cada espermátide arredondada passa por profundas mudanças estruturais e bioquímicas diferenciando-se em espermatozoides (SHARPE, 1994).

As células germinativas testiculares estão associadas umas às outras, nos túbulos seminíferos, em agrupamentos denominados de estádios (SEGATELLI, 2003) que, muitas vezes, em análises histológicas de cortes transversais do tecido epitelial tubular, são facilmente identificáveis devido às características morfológicas nucleares típicas de cada componente celular em sua respectiva fase de desenvolvimento espermatogênico. Essa identificação dos estádios é denominada de Ciclo do Epitélio Seminífero (CES) (RUSSELL *et al.*, 1990) onde cada agrupamento celular (estádio) é identificado pelas características nucleares das células no processo de espermatogênese: uma onda progressiva e constante de formação de novos espermatozoides, desde o compartimento basal até o lúmen tubular (OLIVEIRA, 2014; SEGATELLI, 2003).

Especificamente em camundongos, foram caracterizados doze estádios (I - XII) pelo sistema acrossômico (RUSSELL *et al.*, 1990; HESS; DE FRANCA, 2008), sendo que o ciclo de diferenciação celular, desde a espermatogônia do tipo A1 até a espermição, compreende um período de, aproximadamente, 35 dias nos camundongos (GRISWOLD, 2016). Russell *et al.* (1990) citam que em ratos e camundongos os ciclos são de aproximadamente 59 e 39 dias, respectivamente.

Os doze estádios da espermatogênese podem ser divididos em grupos: grupo I (estádios I-V), grupo II (estádios VI - VIII) e grupo III (estádios IX - XII). Usualmente, os estádios VII e VIII são constantemente estabelecidos como estádios para análises histológicas, pois é possível identificar facilmente as vesículas acrossômicas das espermátides e, além disso, seus núcleos começam a mudar de forma (HESS; DE FRANCA, 2008). Sendo assim, nessa fase é possível determinar, devido a meiose, a maioria dos tipos celulares pela morfologia nuclear. Segundo Amann e Almquist (1964), as espermátides não são liberadas para o lúmen tubular antes do estágio VIII do ciclo do epitélio seminífero. Hess e De França (2008) mencionam que é nos estádios VII/VIII que o excesso citoplasmático é removido das células e dispensados no lúmen tubular - dando origem aos corpos residuais, estruturas características para

auxiliar na identificação do ciclo celular em cortes histológicos. Nessa etapa, portanto, é possível identificar com clareza todos os tipos celulares em formação bem definida.

Conforme Murta; Gomes; Martinez (2013), o número e as dimensões dos túbulos seminíferos diferem entre as espécies de mamíferos, sendo considerados indicadores da atividade espermatogênica. Sendo assim, a intensa atividade de proliferação celular na espermatogênese é responsável por alterações morfológicas nos testículos tais como aumento do diâmetro tubular, do volume tubular, da altura do epitélio, da proporção volumétrica dos túbulos seminíferos e, inevitavelmente, no peso dos testículos (HESS; DE FRANCA, 2008).

No sistema reprodutor masculino, a obesidade está intimamente relacionada às alterações fisiológicas que induzem, por exemplo, um desequilíbrio do sistema hormonal. Ocorrem alterações no eixo hipotálamo-pituitária-gônada, responsável pelas funções endócrinas reprodutivas (LEISEGANG; HENKEL; AGARWAL, 2019), com prejuízo nos níveis dos hormônios androgênicos e elevação nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, adipocitocinas, toxinas endógenas e exógenas. Além disso, ocorre desequilíbrio na relação crescimento, multiplicação e apoptose das células germinativas dos túbulos seminíferos, alterações nos parâmetros espermáticos, alteração na integridade do DNA espermático, disfunção erétil e prostatite subclínica (LEISEGANG et al., 2020).

Nos testículos, as citocinas pró-inflamatórias – IL-1, TNF- α e Interferon – agem de modo prejudicial e direto no epitélio seminífero, afetando a expressão das proteínas de junção das células de Sertoli, ocasionando distúrbios essencialmente na espermatogênese em modelos animais obesos induzidos por dieta (STANTON, 2016). Consoante Leisegang e Dutta (2020), nos modelos animais ocorre o influxo de citocinas inflamatórias e aumento da expressão de citocinas nas células testiculares.

O plasma seminal contém uma ampla variedade de citocinas que aparentemente se originam das células de Leydig e de Sertoli, epidídimo, próstata, vesícula seminal e glândulas bulbouretrais, as quais exercem um efeito fisiológico na espermatogênese e na função espermática (LEISEGANG; HENKEL; AGARWAL, 2019).

1.3 EFEITOS DO ESTRESSE OXIDATIVO SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

O Estresse Oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio sistêmico com produção exacerbada de ERO's pelo organismo. Evidências sugerem que o estresse oxidativo exerce um papel, independente da etiologia, na infertilidade masculina, com cerca de 30 a 80% dos casos de homens inférteis apresentando elevados níveis de espécies reativas no sêmen (AGARWAL et al., 2019; DUTTA; MAJZOUB; AGARWAL, 2019; WAGNER; CHENG; KO, 2018).

No sistema reprodutor, o estresse oxidativo, além do estado pró-inflamatório, é um outro mecanismo que pode ainda relacionar os efeitos negativos da obesidade sobre a fertilidade masculina (ABBASIHORMOZI et al., 2019; AITKEN; DREVET, 2020; MCPHERSON; LANE, 2015) já que acarreta alterações nos parâmetros seminais e fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA) (ALI; MARTINEZ; PAREKH, 2021).

Pequenas quantidades desses radicais livres, de tamanho relativamente pequeno e meia vida curta, (DUTTA; MAJZOUB; AGARWAL, 2019) são requisitados sob condições normais para desempenhar contribuições nas funções fisiológicas, incluindo a capacitação espermática, maturação, hiperativação, reação acrossômica entre outras funções espermáticas que precedem a fertilização (AGARWAL et al., 2019; AITKEN; DREVET, 2020; DUTTA; MAJZOUB; AGARWAL, 2019).

Contudo, a contínua produção de ERO's - em níveis patológicos - é descrita como uma causa idiopática da infertilidade masculina (AGARWAL et al., 2019; BANSAL; BILASPURI, 2011; OPUWARI; MONSEES, 2014), já que o estado de estresse oxidativo induz danos peroxidativos à membrana plasmática dos espermatozoides, além da fragmentação do DNA espermático (LEISEGANG et al., 2020) o que poderia ocasionar um quadro de apoptose celular (ALI; MARTINEZ; PAREKH, 2021; DUTTA; MAJZOUB; AGARWAL, 2019). Essa produção exacerbada teria ainda a capacidade de diminuir a eficácia da penetração dos espermatozoides à zona pelúcida e o potencial espermático de fertilização (AGARWAL et al., 2019), acometendo o desenvolvimento embrionário (MCPHERSON; LANE, 2015).

Conforme Wagner, Cheng, Ko (2018) aludem, algumas ERO's clinicamente importantes estão envolvidas diretamente na infertilidade, entre elas: radicais peróxido ($\cdot\text{ROO}^-$) e hidroxil ($\cdot\text{OH}$), ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2),

além de óxido nítrico (NO) e ânion peroxinitrito (ONOO⁻). Os espermatozoides são individualmente susceptíveis aos danos gerados pelo estresse oxidativo devido à capacidade defensiva limitante dos antioxidantes ou a sua baixa produção (DUTTA; MAJZOUB; AGARWAL, 2019), e ao fato de que as membranas compostas de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) - principalmente por ácido aracnoideico e docosahexaenoico - serem susceptíveis aos radicais livres resultando em peroxidação lipídica (ALI; MARTINEZ; PAREKH, 2021; BANSAL; BILASPURI, 2011; LIU; DING, 2017). Além disso, as enzimas antioxidantes intracelulares não são capazes de proteger a membrana plasmática dos espermatozoides, em especial a região do acrossoma e cauda dos espermatozoides, fazendo com que eles se tornem ainda mais dependentes da proteção antioxidante conferida pelo plasma seminal (SALEH; AGARWAL, 2002).

A peroxidação lipídica está relacionada a uma baixa fluidez de membrana com perda estimada de mais de 50% dos lipídios da membrana (DUTTA; MAJZOUB; AGARWAL, 2019; WAGNER; CHENG; KO, 2018) e, portanto, levando ao efluxo de ATP, prejudicando o movimento flagelar. Danos peroxidativos à membrana plasmática dos espermatozoides diminuem necessariamente a fluidez da membrana no processo de fertilização. Ainda, o desequilíbrio gerado pelo estado de estresse oxidativo afeta não só os componentes lipídicos como também os carboidratos, ácidos nucleicos e proteínas (DUTTA; MAJZOUB; AGARWAL, 2019).

A produção de espermatozoides imaturos, ocasionada por alguma parada ou desregulação no processo da espermiogênese, resulta em danos ao processo de capacitação dos espermatozoides, pois o processo de eliminação do excesso de citoplasma pela peça intermediária é danificado. Essa retenção do citoplasma nos espermatozoides ativa o sistema NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), o qual é fonte de elétrons desemparelhados que produzem novas espécies reativas e, logo, aumento no estado de estresse oxidativo (ALI; MARTINEZ; PAREKH, 2021; DUTTA; MAJZOUB; AGARWAL, 2019).

As ERO's seminais são produzidas, principalmente, por infiltrados de leucócitos fagocíticos ou espermatozoides imaturos ou anormais (AGARWAL et al., 2019; BANSAL; BILASPURI, 2011; LIU; DING, 2017) e das mitocôndrias envolvidas no metabolismo aeróbico (ALI; MARTINEZ; PAREKH, 2021; DUTTA; MAJZOUB; AGARWAL, 2019). McPherson e Lane (2015) constatam que o aumento do dano à estrutura do DNA espermático, gerado pelo aumento da adiposidade, também foi

confirmado em estudos com modelos machos obesos de roedores. Além disso, foi confirmada a existência de uma forte associação entre o aumento da adiposidade e o aumento dos níveis de ERO's seminal e espermático. Nesses modelos, alude-se que o aumento do estresse oxidativo poderia estar presente no parênquima testicular.

1.4 SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são substâncias, enzimáticas e não enzimáticas, que têm a função primordial de estabilizar, por meio de ligações químicas moleculares, as espécies reativas livres presentes no organismo, inclusive no sistema reprodutor evitando seus efeitos deletérios e injúrias celulares (ALI; MARTINEZ; PAREKH, 2021).

A capacidade total antioxidante do plasma seminal é mensurada através de níveis de antioxidantes categorizados em enzimáticos e não-enzimáticos (HUANG et al., 2018). Entre os antioxidantes enzimáticos estão a glutathiona redutase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (AITKEN; DREVET, 2020; RHEMREV et al., 2000). Entre os não enzimáticos destacam-se as vitaminas C, E e B, carnitinas, cisteínas, carotenoides, pentofilinas, taurinas, alguns metais, hipotaurinas e albumina. Outros antioxidantes não enzimáticos podem ser assimilados em alguns suplementos naturais (DUTTA; MAJZOUB; AGARWAL, 2019).

A produção de substâncias antioxidantes endógenas é um esforço sistêmico para prevenir o surgimento das espécies reativas e com isso tentar minimizar os danos como os citados anteriormente. Contudo, Rhemrev *et al.*, (2000) afirmam que devido ao seu baixo conteúdo citoplasmático, os espermatozoides apresentam baixas quantidades de antioxidantes endógenos. Assim, estas células são amplamente dependentes das propriedades antioxidantes dos fluidos que circundam o epitélio germinativo dos túbulos seminíferos e os espermatozoides no epidídimo (AITKEN; DREVET, 2020). Portanto, uma queda na capacidade antioxidante no plasma seminal poderia causar infertilidade masculina (HUANG et al., 2018).

Bioquimicamente, como resposta ao estresse oxidativo gerado pela produção exacerbada de ERO's, o plasma seminal está diretamente indicado como um poderoso fluido antioxidante repleto de enzimas de defesa contra injúrias celulares.

Dentre as enzimas de maior interesse, destaca-se a SOD que catalisa os íons superóxidos, de meia vida curtíssima, e os dismuta em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que prontamente serão removidos pela CAT. Os ânions superóxidos podem, também,

interagir com a espécie reativa óxido nítrico (NO), produzido pelo espermatozoide, e gerando um poderoso oxidante - o ânion peroxinitrito (ONOO-) (AITKEN; DREVET, 2020).

Os radicais livres formados são responsáveis também pela oxidação de lipídios e proteínas da membrana plasmática dos espermatozoides. Basicamente, peroxidação lipídica consiste na incorporação de oxigênio molecular aos ácidos graxos poli-insaturados da membrana dos espermatozoides levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, em condição extrema, à morte celular.

Uma das formas de se avaliar os danos causados pelos radicais livres de oxigênio à membrana plasmática é pela técnica do Malondialdeído (MDA). O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), por cisão beta, principalmente do ácido araquidônico. Portanto, o teste de MDA implica na avaliação da peroxidação em sistemas biológicos medindo a formação de produtos gerados pelas injúrias à membrana plasmática (LIMA; ABDALLA, 2001).

Outras enzimas antioxidantes de relevância no processo de estabilização dos radicais livres são a Catalase (CAT), que atua na decomposição de H_2O_2 a H_2O e O_2 , e a Glutathione peroxidase (GP_x), que atua sobre os peróxidos em geral, com utilização da glutathione como co-fator. A Glutathione é um bom marcador de homeostase celular e sua diminuição indicaria uma lesão oxidante (VASCONCELOS et al., 2007).

Segundo Agarwal *et al.* (2019), os antioxidantes exógenos têm a capacidade de minimizar os danos oxidativos de modo que várias formulações orais se encontram disponíveis no mercado para auxiliar no tratamento da infertilidade. Smits *et al.* (2019) concluíram que a ingestão oral de antioxidantes pode melhorar os parâmetros seminais porque eles diminuem os danos oxidativos, ajudando a manter a integridade dos espermatozoides humanos, o que aumenta as taxas de fertilização.

A condução de estudos a fim de buscar mecanismos de controle dos danos gerados aos homens obesos diagnosticados como inférteis, passa por mecanismos de mudanças comportamentais e estilo de vida, controle alimentar, prescrição de medicamentos, sugestões cirúrgicas, controle das comorbidades, entre outros, a fim de minimizar esses efeitos deletérios. Leisegang *et al.* (2020) determinam, no entanto, que vários tratamentos nutracêuticos e suplementos de ervas são considerados, também, como opções adicionais a este fim.

McPherson *et al.* (2019) afirmam que, em ratos, o estresse oxidativo gerado pela obesidade pode ter seus efeitos depletivos diminuídos pela administração concomitante de micronutrientes como zinco, selênio, licopeno, vitamina C e E, ácido fólico e extrato de chá verde.

Apesar da necessidade de estudos mais robustos e confirmatórios da ação da terapia antioxidante em humanos, estudos sugerem que a combinação de L-carnitina, vitamina C, coenzima Q₁₀, vitamina E, zinco, ácido fólico, selênio e vitamina B₁₂, poderia diminuir significativamente as taxas de fragmentação de DNA bem como diminuição da concentração espermática (ALI; MARTINEZ; PAREKH, 2021).

1.5 ASPALATHUS LINEARIS - ROOIBOS

A ingestão de fitonutrientes, originários de ervas medicinais apropriadas, como opção terapêutica, fornece melhorias tanto para obesidade quanto para infertilidade masculina (LEISEGANG *et al.*, 2020). Recentemente, tem aumentado o interesse no mecanismo de atuação de vários produtos naturais e comerciais, incluindo os chás e infusões de ervas, na prevenção e tratamento de doenças. Rooibos ainda tem despertado interesse devido à baixa concentração de tanino, como o ácido gálico, e por não conter cafeína (BRAMATI *et al.*, 2002).

Aspalathus linearis ou Rooibos é uma espécie arbustiva nativa das Montanhas Cedarberg, na região de Western Cape, na África do Sul (JOHNSON *et al.*, 2018), 2018), onde é extensivamente cultivada para uso comercial como infusão de ervas ou tisana (MCKAY; BLUMBERG, 2007). É manufaturada sob a forma de dois diferentes extratos: não-fermentado e fermentado ou oxidado (OPUWARI; MONSEES, 2014).

Por efeito de suas propriedades antioxidantes, Rooibos tem sido amplamente empregado em tratamentos naturais para a saúde humana (GILANI *et al.*, 2006) em consequência da grande proporção de compostos fenólicos em sua constituição (HONG; LEE; KIM, 2014; JOUBERT; DE BEER, 2011). Esses compostos fenólicos catalisam as enzimas da reação de oxirredução e íons metálicos - cobre e ferro - envolvidos na produção de espécies reativas (BRAMATI *et al.*, 2002).

Assim sendo, Heerden *et al.* (2003) e Sasaki; Nishida; Shimada (2018) descrevem que a *A. linearis* é rica em compostos fenólicos e flavonoides, principalmente pela aspalatina, sendo considerada o principal constituinte do chá comercial. A aspalatina é uma dihidrocalcona C-glicosilada natural, presente em

abundância na *A. linearis* não fermentada, com propriedades antioxidantes, natureza hidrofílica e baixa estabilidade (JOHNSON et al., 2018).

Estudos recentes demonstram os efeitos benéficos do chá de Rooibos devido a suas propriedades antioxidantes de combate ao estresse oxidativo de diferentes etiologias e os níveis de marcadores lipídicos no sangue (AWONIYI et al., 2012; SASAKI; NISHIDA; SHIMADA, 2018; ULIČNÁ et al., 2006). Neste sentido, Hong, Lee e Kim (2014), relatam que o uso de produtos naturais com potencial efeito antioxidante tem vantagens como, baixa ou nenhuma toxicidade, capacidade de neutralizar a maioria das espécies reativas, fácil acessibilidade e, ainda, apresentarem um complexo de antioxidantes em sua constituição.

Apesar de largamente empregado na preparação de infusões no uso comercial, a fermentação ou oxidação do material vegetal reduz consideravelmente a quantidade de aspalatina devido à conversão oxidativa em flavonas e flavanonas (DAMIANI et al., 2019; WALTERS et al., 2017) diminuindo a capacidade antioxidante, quando comparado ao extrato não fermentado (PRINGLE et al., 2018).

2 JUSTIFICATIVA

Considerada como um problema de saúde pública, especula-se que a obesidade cause efeitos prejudiciais metabólicos e celulares no organismo, dentre eles, no sistema reprodutor masculino culminando em infertilidade ou subfertilidade. Assim, acarretada pelo aumento no consumo de dietas hipercalóricas, acredita-se que a obesidade estabeleça íntima relação com a potencialização da produção de ERO's que, em desequilíbrio com sistema antioxidante, pode levar a alterações celulares e teciduais graves, culminando com a morte celular, como apontam estudos com roedores e humanos.

Portanto, o presente estudo utilizou a infusão da espécie vegetal *Aspalathus linearis* (popularmente conhecida como "Rooibos"), por apresentar características antioxidantes comprovadas, com a intenção de minimizar ou combater os efeitos adversos das ERO's nos testículos de camundongos obesos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar possíveis alterações estruturais no parênquima testicular, especialmente nos túbulos seminíferos e nos espermatozoides produzidos após a ingestão da dieta hipercalórica somente, e também acompanhada da ingestão da infusão de Rooibos (*A. linearis*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter dados biométricos corporais e testiculares, consumo alimentar, ingestão calórica e consumo hídrico para verificar a eficiência da dieta hipercalórica em induzir obesidade e causar alterações nas células do epitélio seminífero;
- Calcular o Índice Gonadosomático (IGS), mensurar a área, diâmetro e altura do epitélio dos túbulos seminíferos e do lúmen tubular para avaliar as alterações causadas pela dieta hipercalórica;
- Avaliar a proporção volumétrica dos compartimentos tubulares (epitélio seminífero e lúmen);
- Realizar a contagem da população celular de túbulos nos Estádios VII/VIII do ciclo do epitélio seminífero para registrar o potencial efeito danoso da dieta hipercalórica sobre o processo espermatogênico;
- Caracterizar perdas ou danos celulares capazes de diminuir ou cessar a produção espermática através das dosagens de compostos enzimáticos antioxidantes e subprodutos, além da avaliação da viabilidade celular da população celular do epitélio seminífero por dupla marcação fluorescente com laranja de acridina e iodeto de propídeo;
- Avaliar os efeitos da ingestão da infusão de Rooibos como substância protetora, prevenindo o surgimento de efeitos deletérios da dieta hipercalórica na população celular do epitélio dos túbulos seminíferos testiculares e sobre os espermatozoides

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Camundongos isogênicos machos BALB/c adultos (22 - 23 g com 8 semanas de vida) foram mantidos no biotério de manutenção do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de do Triângulo Mineiro (UFTM), com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas.

Após uma semana para aclimação e ambientação antes do início do tratamento, os camundongos foram divididos, aleatoriamente, em três grupos (n=8) e mantidos todos juntos em suas respectivas caixas durante as 8 semanas. Todos tiveram livre acesso à alimentação e à oferta hídrica, como descrito na Tabela 1. A dieta administrada e a oferta hídrica foram introduzidas concomitantemente do início até o final do experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais da UFTM (CEUA-UFTM) (protocolo 11/2018/CEUA/PROPPG - número: 23085.002424/2018-59).

Tabela 1 - Descrição dos grupos experimentais.

GRUPOS	DIETA ADMINISTRADA E OFERTA HÍDRICA
(C ¹)	dieta controle <i>ad libitum</i> e água <i>ad libitum</i>
(HC ²)	dieta HC <i>ad libitum</i> e água <i>ad libitum</i>
(HCR ³)	dieta HC <i>ad libitum</i> e infusão de Rooibos <i>ad libitum</i>

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

(1) Controle; (2) Dieta hipercalórica; (3) Dieta hipercalórica e Rooibos como única fonte hídrica durante todo o período de experimentação;

4.2 PREPARAÇÃO DA DIETA HIPERCALÓRICA

A dieta hipercalórica foi preparada segundo Oliveira *et al.*, (2013). Brevemente, a dieta hipercalórica foi composta por 45% de leite condensado comercial, 10% de açúcar refinado e 45% ração normocalórica. A composição nutricional e quantidade de calorias das dietas encontram-se discriminadas na Tabela 2. A seleção de tal dieta foi baseada no fato de que quando cronicamente administrada acarreta alterações bioquímicas diversas, como o aumento do colesterol total, triglicerídeos e o aumento de tecido adiposo retroperitoneal (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

4.3 PREPARAÇÃO DA INFUSÃO DE ROOIBOS

A infusão de Rooibos comercial foi preparada segundo Ulična *et al.*, (2006). Dois gramas e meio (2,5g) de Rooibos comercial foi fervido em 1000ml de água, por 10 minutos. A infusão de Rooibos foi deixada à temperatura ambiente para resfriar e em seguida filtrada, para retirada dos resíduos da solução.

Tabela 2 - Composição nutricional dos macronutrientes das dietas administradas

MACRONUTRIENTES	RAÇÃO	DIETA
	NORMOCALÓRICA* (4,0 Kcal/g)	HIPERCALÓRICA** (4,4 Kcal/g)
Carboidratos	65,8%	74,2%
Gorduras	3,1%	5,8%
Proteínas	31,1%	20%

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

* Labina Purina®.

** Dieta Hipercalórica (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

4.4 CONSUMO ALIMENTAR, INGESTÃO CALÓRICA E CONSUMO HÍDRICO

Os animais foram pesados semanalmente para determinação do peso corporal. Após o período de aclimação, o peso corporal dos camundongos no início do tratamento era similar nos grupos experimentais (25,04 g ± 0,36).

O consumo alimentar foi determinado pela diferença entre o peso da dieta ofertada no primeiro dia e o consumido pelos grupos no dia seguinte à oferta. A ingestão calórica foi calculada pela multiplicação da quantidade do consumo alimentar pelo valor da caloria de cada dieta.

Água e infusão de Rooibos foram ofertadas aos animais como única fonte hídrica. O material vegetal foi adquirido através da empresa Tea Shop (código 29001), em pacotes de 50g, contendo Rooibos puro (fermentado). O consumo hídrico foi mensurado diariamente até o final do experimento.

4.5 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Ao final da oitava semana, os animais foram eutanasiados e dissecados após anestesia intramuscular, aplicada no quadríceps femoral esquerdo com mistura de xilazina (10mg/kg) e ketamina (100mg/kg) considerando-se o peso de cada animal.

Ductos deferentes esquerdos foram retirados e congelados em criofrasco e acondicionados a -20°C , para sequente análise espermática. O peso dos testículos foi obtido após a eutanásia dos animais e retirada do órgão. Os testículos esquerdos foram congelados em nitrogênio líquido e criopreservados a -80°C , para posteriores análises enzimáticas de estresse oxidativo.

Os testículos direitos foram fixados - em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1mol/L, pH 7,2 por 24h - para análises histológicas. No processamento dos testículos para as secções histológicas, o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 95% e absoluto) por 30 minutos, com infiltração por 2 horas e inclusão em resina glicolmetacrilato Leica (Historesina[®]). Todo processamento foi realizado conforme recomendações do fabricante.

Foram feitos cortes histológicos com 3 μm de espessura em micrótomo automático (Leica[®] Jung RM2055), respeitando o intervalo de 40 μm entre os cortes. Posteriormente, as secções obtidas foram coradas com azul de toluidina/borato de sódio 1% para análise morfológica e morfométrica testicular.

As imagens foram capturadas utilizando o sistema de câmera Zeiss[®] AxioCam ICc5, integrado ao microscópio óptico Zeiss[®] Axiolab, em objetiva de 20X, com aumento final de imagem de 620X, utilizando o Software AxioCam. Com o Software Image Pro Plus foram determinadas as contagens de células do epitélio testicular e morfometria do túbulo seminífero a partir das imagens digitalizadas.

4.6 MORFOMETRIA TESTICULAR

4.6.1 Índice Gonadossomático (%)

O Índice Gonadossomático (IGS) representa a razão entre a peso corporal e peso testicular em porcentagem, obtidos após eutanásia do animal (MELO et al., 2010):

$$IGS = \frac{MG}{MC} \times 100$$

MG = massa total das gônadas

MC = massa corporal

4.6.2 Morfometria e cálculos das medidas dos túbulos seminíferos

Foram selecionadas nas imagens digitalizadas, 30 túbulos seminíferos com contorno o mais circular possível e sem sobreposição, para realização das medidas

morfométricas. Foram mensurados o diâmetro e a altura do epitélio dos túbulos selecionados, partindo da membrana basal até a luz tubular.

Para o cálculo da área do epitélio seminífero é necessário a obtenção das áreas dos túbulos e seus respectivos lúmens. Assim, o cálculo da área dos túbulos seminíferos, que inclui a área do lúmen tubular, foi realizado a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Área do túbulo} = \pi R_{tub}^2, \text{ onde R é o raio do túbulo}$$

O raio dos túbulos foi obtido a partir da divisão do diâmetro mensurado por 2.

Para se determinar a área do lúmen tubular foram realizados os seguintes cálculos:

a) Cálculo para diâmetro do lúmen:

$$\text{Diâmetro médio do lúmen} = \text{diâmetro médio do túbulo} - 2(\text{altura média do epitélio})$$

b) Cálculo para área do lúmen, obtido a partir do diâmetro médio tubular:

$$\text{Área do lúmen} = \pi R_{lum}^2, \text{ onde o R é o raio do lúmen}$$

A partir dos valores calculados para a área do túbulo e a área do lúmen, obteve-se a área do epitélio sendo também calculada a razão entre estas áreas:

$$\text{Área do epitélio} = \text{Área do túbulo} - \text{Área do lúmen}$$

$$\text{RET} = \frac{A_{epit}}{A_{tub}}$$

4.6.3 Proporções volumétricas (%) dos componentes do parênquima testicular

Imagens digitalizadas de trinta regiões do parênquima testicular foram utilizadas para obtenção das proporções volumétricas tubulares e intersticiais testiculares. Para tanto foi utilizado o software Image Pro Plus. Sobre as imagens foi sobreposto um retículo (grid) com 120 pontos de interseções onde as proporções foram estimadas a partir da contagem de 3600 pontos projetados na região selecionada. Foram contados o número de pontos localizados no interstício e nos túbulos seminíferos em cada imagem, sendo que o volume de cada componente do

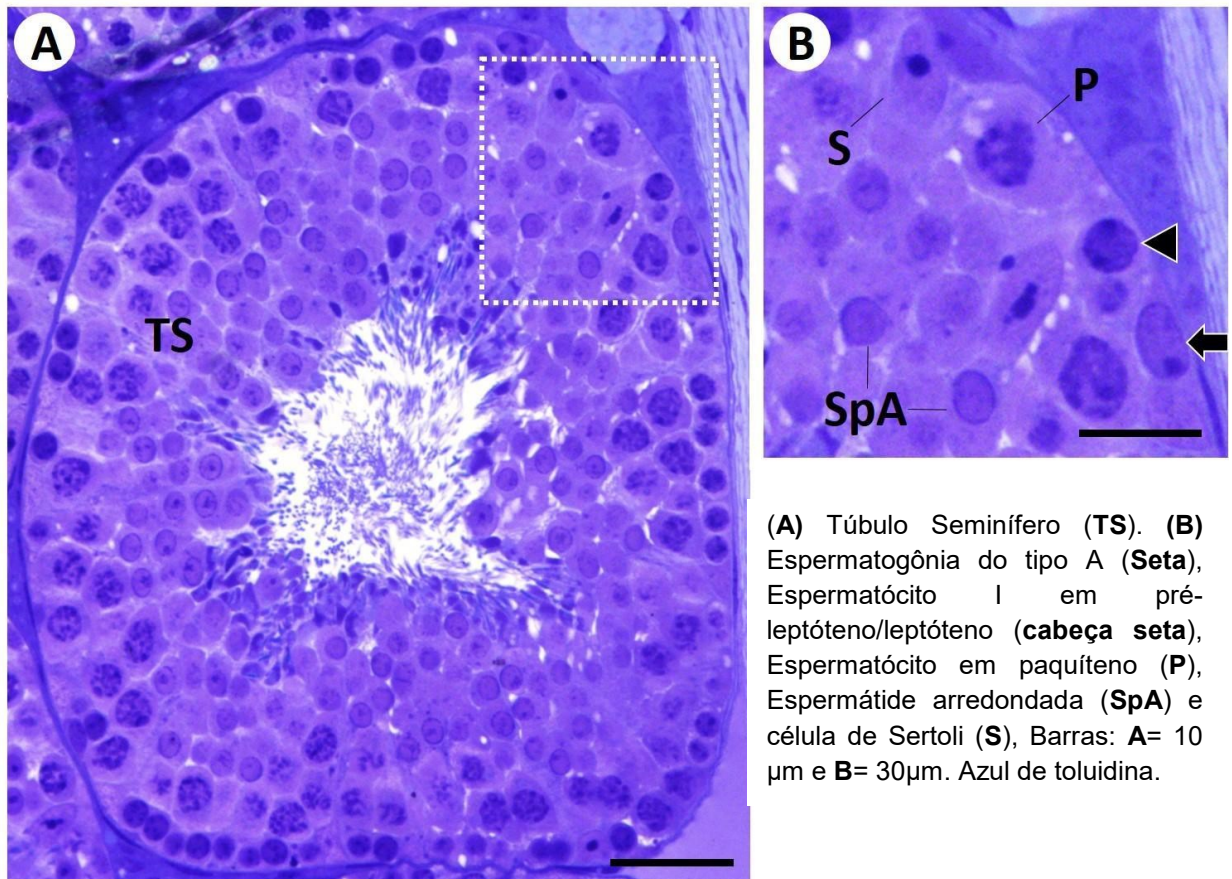
parênquima testicular foi estimado a partir do conhecimento do seu percentual ocupado nos testículos e do conhecimento do volume do parênquima testicular. Como a densidade do testículo dos mamíferos é em torno de 1 (TAE et al., 2005), seu peso foi considerado igual ao seu volume.

4.6.4 Contagem populacional dos túbulos seminíferos

O quantitativo das populações celulares que compõem os túbulos seminíferos no Estádio VII/VIII - classificado de acordo com o método acrossômico de Oakberg (1956) – foi obtido a partir da contagem dos núcleos das células germinativas e de nucléolos das células de Sertoli, segundo Oliveira *et al.*, (2020). Foram utilizadas 10 secções transversais de túbulos seminíferos, escolhidos ao acaso, obtidos em imagens digitalizadas de cada um dos animais deste trabalho. As secções histológicas utilizadas para obtenção das imagens apresentavam 3 μ m de espessura e intervalo de 40 μ m entre secções contíguas. Foram considerados os núcleos e nucléolos dos seguintes tipos celulares (Figura 2) para as contagens:

- Espermatogônias do tipo A (GoA);
- Espermatócitos I, na fase de leptóteno/preleptoteno (SPTL);
- Espermatócitos I, na fase de paquíteno (SPTP);
- Espermatídes arredondadas (SPDAr);
- Células de Sertoli (CS).

Figura 2 - População de células germinativas testiculares nos estádios VII/VIII.



(A) Túbulo Seminífero (TS). (B) Espermatogônia do tipo A (Seta), Espermatócito I em pré-leptóteno/leptóteno (cabeça seta), Espermatócito em paquíteno (P), Espermátide arredondada (SpA) e célula de Sertoli (S), Barras: A= 10 μm e B= 30μm. Azul de toluidina.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

A retração dos tecidos no processamento das amostras é um fator que deve ser considerado nas medições morfométricas. Para inclusões testiculares em resina plástica, a retração chega a responder de 3 a 5% (MORAIS et al., 2009). Portanto, o número total de cada tipo celular foi corrigido utilizando-se a seguinte fórmula proposta por Amann; Almquist (1962):

$$n^{\circ} \text{ corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{espessura do corte}}{\text{espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{DNM}{2}\right)^2 - \left(\frac{DNM}{4}\right)^2}}$$

DNM = diâmetro nuclear/nucleolar médio

O diâmetro nuclear/nucleolar médio representa a média dos diâmetros maior e menor de 10 núcleos de cada tipo celular em análise, para cada animal. Os diâmetros nucleares/nucleolares foram medidos utilizando-se programa de análise de imagem ImageJ, a partir de imagens digitais capturadas em objetiva de 20X.

4.6.5 Razões entre os números celulares

Com a finalidade de se avaliar a eficiência do processo espermatogênico e das células de Sertoli, foram estimadas as razões entre os números corrigidos de células da linhagem espermatogênica e o número de células de Sertoli no Estádio VII/VIII do ciclo do epitélio seminífero. As seguintes razões foram consideradas:

$\frac{\text{Espermatócito primário em preleptóteno/leptóteno}}{\text{Espermatogônia tipo A}}$	coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais;
$\frac{\text{Espermátides arredondadas}}{\text{Espermatogônia tipo A}}$	rendimento geral da espermatogênese;
$\frac{\text{Espermátides arredondadas}}{\text{Espermatócitos primários em paquíteno}}$	índice meiótico;
$\frac{\text{Espermátides arredondadas}}{\text{Núcleo de Células de Sertoli}}$	índice de Célula de Sertoli
$\frac{\text{Número total corrigido de células germinativas}}{\text{Nucléolos de Células de Sertoli}}$	capacidade total de suporte da célula de Sertoli.

4.6.6 Morfologia dos espermatozoides

Espermatozoides criopreservados, contidos em um centímetro de ducto deferente, adjacente ao epidídimo, foram coletados e ressuspensos em solução de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH=7, por 15 minutos. Foi colocada uma gota da solução em uma lâmina e cobriu-se com lamínula. A lâmina foi imediatamente observada em microscópio de luz, com contraste de fase, em objetiva de 40X. Foram avaliados 200 espermatozoides de cada animal, com o objetivo de se verificar a presença de anormalidades na cabeça e cauda (SEED et al., 1996).

4.7 DOSAGENS ENZIMÁTICAS PARA DETECÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO

O testículo esquerdo foi removido, criopreservado e mantido a -80°C no Laboratório de Bioquímica/UFTM até a análise para estresse oxidativo realizada no Laboratório de Ecotoxicologia de Quirópteros/UFV.

Primeiramente, retirou-se a túnica albugínea de cada testículo para posterior pesagem e homogeneização do mesmo. Esta foi feita em $1000\mu\text{L}$ de solução tampão fosfato de potássio 20mM ($\text{pH } 7.4$) e centrifugados a 12000 rpm , 4°C , por 10 minutos. Após a centrifugação do homogenato, este material foi fracionado sendo o sobrenadante e o pellet armazenados, separadamente, em criofrascos a -20°C . O sobrenadante foi utilizado para dosagem de óxido nítrico (NO), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST), malondialdeído (MDA) e níveis de proteína total. O pellet formado foi ressuspensionado em ácido tricloroacético 10% para posterior dosagem de proteína carbonilada. Foram feitas duplicatas de todas as amostras.

Os dados bioquímicos foram normalizados em relação aos níveis de proteína total no sobrenadante. Todas as atividades enzimáticas foram determinadas em duplicata usando um espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu).

A atividade de CAT foi avaliada de acordo com o método descrito por Aebi (1984), onde a taxa de decomposição de H_2O_2 foi medida nos tempos 0, 30 e 60 segundos. A atividade da SOD foi determinada nos sobrenadantes conforme o método descrito por Del Mestro e McDonald (1985) e da glutathione S-transferase (GST) pela formação conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Os níveis de malondialdeído (MDA), foram determinados utilizando a solução TBARS (ácido tricloroacético 15% / ácido tiobarbitúrico $0,375\%$ / ácido clorídrico $0,25\text{M}$).

Os níveis totais de MDA em cada amostra foram determinados por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMPO) (WALLIN et al., 1993). A concentração do óxido nítrico (NO) foi determinada indiretamente através do teor de nitrito/nitrato pela reação de Griess (RICART-JANÉ; LLOBERA; LÓPEZ-TEJERO, 2002). A proteína total foi mensurada utilizando albumina do soro bovino como curva padrão (LOWRY et al., 1951), e utilizada para homogeneização dos dados de estresse.

4.8 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A partir de secções semisseriadas de 1µm de túbulos seminíferos feitas em micrótomo automático (Leica[®] Jung RM2055) e coradas por laranja de acridina (AO) e iodeto de propídeo (IP), foram capturadas imagens digitalizadas para avaliação da viabilidade e alterações de morfologia celular. Foram analisados 10 campos por região por animal das células que compõem o epitélio dos túbulos seminíferos.

Pelo método proposto por Giri e Roy (2016), a classificação celular realizada foi baseada na fragmentação e condensação do núcleo celular, bem como pela integridade da membrana, segundo dupla marcação fluorescente por laranja de acridina e iodeto de propídeo (CARDOSO, 2012).

Fundamentado em Dias *et al.* (2019), os critérios histomorfológicos para classificação da viabilidade celular indicaram que células viáveis apresentam núcleo verde, o que torna seu reconhecimento facilmente perceptível. Células apoptóticas exibem coloração variando entre amarelo e laranja, em concordância com a estimativa de perda da integridade de membrana apontada pela marcação com iodeto propídeo. Laranja de acridina demonstra potencial em corar tanto células viáveis quanto células em morte celular (apoptose celular), enquanto o iodeto propídeo revela somente células que apresentam perda de integridade celular (GIRI; ROY, 2016).

4.9 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA TESTICULAR

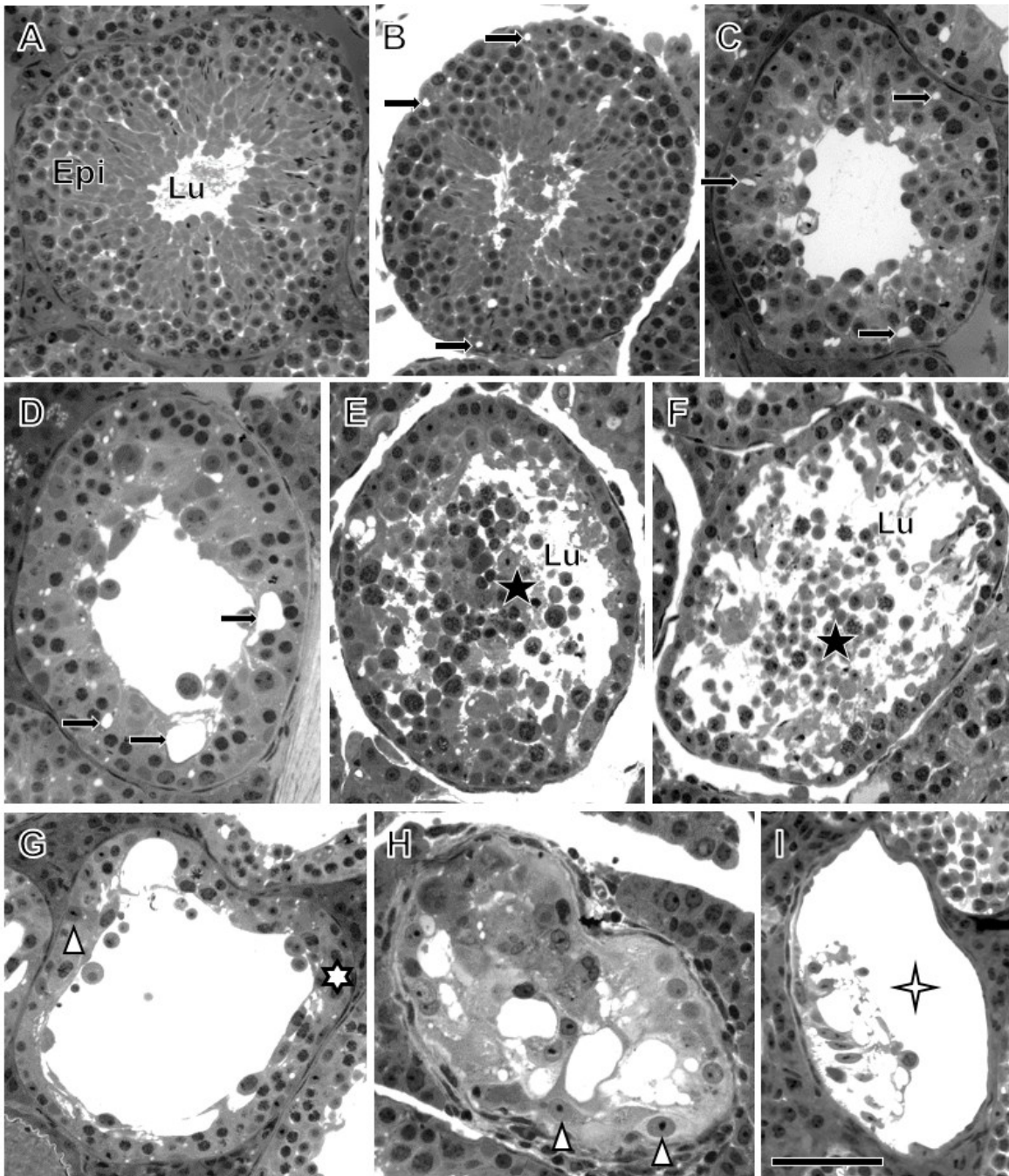
As proporções de túbulos seminíferos normais e patológicos foram estimadas pela contagem de 200 túbulos aleatórios em preparações histológicas dos testículos de cada animal. De acordo com Johnsen (1970), são 10 os níveis de alteração do túbulo seminífero, porém neste estudo os escores foram modificados para 8 níveis: Nível 1 - túbulos intactos com células germinativas dispostas em seu local de localização normal e poucos vacúolos; Nível 2 - vacúolos na base do epitélio; Nível 3 - vacúolos no ápice do epitélio; Nível 4 - vacúolos no ápice e na base do epitélio; Nível 5 - células espermatogênicas na luz tubular e degeneração celular; Nível 6 - túbulos com apenas células basais; Nível 7 - túbulos com apenas células de Sertoli; Nível 8 - túbulos sem células de Sertoli ou células germinativas, caracterizando um estado de degeneração irreversível. Esses níveis foram agrupados em normal (Nível 1),

patologias leves (Níveis 2 e 3), patologias moderadas (Níveis 4 e 5) e patologias graves (Níveis 6, 7 e 8), como descrito por Dias *et al.* (2020) e ilustrados na Figura 3.

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando Software GraphPad Prism versão 5.00.288. Os dados obtidos foram analisados através do teste de Shapiro-Wilk para avaliação quanto à normalidade. Para os dados com distribuição normal foi utilizada One-way ANOVA, seguido do teste de Tukey, ou Two-way ANOVA (para peso corporal). Para dados que não apresentaram distribuição normal foi usado o teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância (α) definido para o presente estudo foi de 5% ($p < 0,05$).

Figura 3 - Análise histopatológica de túbulos seminíferos.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

(A) Túbulo seminífero normal: Epitélio (**Epi**), lúmen tubular (**Lu**); (**B, C**) Patologias leves: Vacúolos intraepiteliais (→); (**D,E**) Patologia Moderada: Vacúolo intraepitelial (→), Células epiteliais descamadas (★); (**F,G,H**) Patologias Severas: epitélios com células basais (☆) e células de Sertoli (Δ); (**I**) Túbulo seminífero com células de Sertoli (Δ). Barra: 100µm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASIHORMOZI, S. et al. Stress hormone and oxidative stress biomarkers link obesity and diabetes with reduced fertility potential. **Cell Journal**, Tehran, v. 21, n. 3, p. 307–313, 1 dez. 2019. DOI: 10.22074/cellj.2019.6339. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31210437/>. Acesso em: 2 set. 2020.
- ABIAD, F. et al. Management of weight loss in obesity-associated male infertility: a spotlight on bariatric surgery. **Human Fertility**, Cambridge, v. 20, n. 4, p. 227–235, 2017. DOI: 10.1080/14647273.2017.1317369. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28460579/>. Acesso em: 9 jun. 2021.
- AGARWAL, A. et al. Male oxidative stress infertility (MOSI): proposed terminology and clinical practice guidelines for management of idiopathic male infertility. **World Journal of Men's Health**, Seoul, v. 37, n. 3, p. 296–312, 2019. DOI: 10.5534/wjmh.190055. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31081299/>. Acesso em: 2 set. 2020.
- AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. The importance of oxidative stress in determining the functionality of mammalian spermatozoa: A two-edged sword. **Antioxidants (Basel)**, Switzerland, v. 9, n. 2, p. 1–19, 2020. DOI: 10.3390/antiox9020111. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/2/111>. Acesso em 4 set. 2020.
- ALI, M.; MARTINEZ, M.; PAREKH, N. Are antioxidants a viable treatment option for male infertility? **Andrologia**, Berlin, Grosse, v. 53, n. 1, p. 1–12, 2021. DOI: 10.1111/and.13644. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/and.13644>. Acesso em: 9 jun. 2021.
- AWONIYI, D. O. et al. The effects of rooibos (*Aspalathus linearis*), green te (*Camelli sinensis*) and commercial rooibos and green te supplements on epididymal sperm in oxidative stress-induced rats. **Phytotherapy Research**, England, v. 26, n. 8, p. 1231–1239, 2012. DOI: 10.1002/ptr.3717. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.3717>. Acesso em 9 jun. 2021.
- BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. **Veterinary Medicine International**, Cairo, v. 2011, p. 1–7, 2011. DOI: 10.4061/2011/686137. Disponível em: www.hindawi.com/journals/vmi/2011/686137/. Acesso em 3 set. 2020.
- BRAMATI, L. et al. Quantitative characterization of flavonoid compounds in Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) by LC-UV/DAD. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 20, p. 5513–5519, 2002. DOI: 10.1021/jf025697h. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12236672/>. Acesso em 15 jun. 2021.
- CARDOSO, P. C. DOS S. **Avaliação in vitro dos possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos das drogas antimaláricas artemisinina e artemeter em linfócitos humanos**. 2012. Tese (Doutorado em Neurociências e Biologia Celular) -- Universidade Federal do Pará, Belém, 2012. Disponível em: http://repositorio.ufpa.br/jspui/bitstream/2011/3288/1/Tese_AvaliacaoVitroPossiveis.pdf. Acesso em: 10 jun. 2021.
- CHEN1, R. et al. Prostate cancer risk prediction models in Eastern Asian populations: current status, racial difference, and future directions. **Asian Journal of Andrology**, Beijing, v. 21, n. July, p. 1–4, 2019. DOI: 10.4103/aja.aja. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/2091>. Acesso em: 9 jun. 2021.

DAMIANI, E. et al. Impact of Cold versus Hot Brewing on the Phenolic Profile and Antioxidant Capacity of Rooibos (*Aspalathus linearis*) Herbal Tea. **Antioxidants (Basel)**, Basel, Switzerland, v. 8, n. 10, p. 499, 2019. DOI: 10.3390/antiox8100499. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6826389/>. Acesso em 05 abr. 2021.

DUTTA, S.; MAJZOUN, A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. **Arab Journal of Urology**, Cairo, v. 17, n. 2, p. 87–97, 2019. DOI: 10.1080/2090598X.2019.1599624 . Disponível em: <https://doi.org/10.1080/2090598X.2019.1599624>. Acesso em: 04 set. 2020.

FAN, W. et al. Obesity or overweight, a chronic inflammatory status in male reproductive system, leads to mice and human subfertility. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 8, n. JAN, p. 1–11, 2018. DOI: 10.3389/fphys.2017.01117. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5758580/>. Acesso em 9 jun. 2021.

GILANI, A. H. et al. Antispasmodic effects of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) is mediated predominantly through K⁺-channel activation. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, DOI: 10.1111/j.1742-7843.2006.pto_507.x, v. 99, n. 5, p. 365–373, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17076689/>. Acesso em 7 abr. 2020.

GIRI, B. R.; ROY, B. Cysticercus fasciolaris infection induced oxidative stress and apoptosis in rat liver: a strategy for host-parasite cross talk. **Parasitology Research**, Berlin, v. 115, n. 7, p. 2617–2624, 2016. DOI: 10.1007/s00436-016-5008-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26987645/>. Acesso em: 10 jun. 2021.

GRISWOLD, M. D. Spermatogenesis: The commitment to Meiosis. **Physiological Reviews**, Washington, v. 96, n. 1, p. 1–17, 2016. DOI: 10.1152/physrev.00013.2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26537427/>. Acesso em 15 abr. 2021.

HALES, D. B. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. **Journal of Reproductive Immunology**, Amsterdam, v. 57, n. 1–2, p. 3–18, 2002. DOI: 10.1016/S0165-0378(02)00020-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12385830/>. Acesso em 15 abr. 2021.

HESS, R. A.; DE FRANCA, L. R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: CHENG C.Y. (Ed.). **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 2008. ed. Springer, New York, NY: [s.n.]. v. 636p. 1–15.

HONG, I. S.; LEE, H. Y.; KIM, H. P. Anti-oxidative effects of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) on immobilization-induced oxidative stress in rat brain. **PLoS ONE**, San Francisco, CA, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0087061. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0087061>. Acesso em: 16 abr. 2020.

HUANG, C. et al. Is male infertility associated with increased oxidative stress in seminal plasma? A-meta analysis. **Oncotarget**, Albany, N.Y. v. 9, n. 36, p. 24494–24513, 2018. DOI: 10.18632/oncotarget.25075. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5966266/>. Acesso em: 9 jun. 2021.

JOHNSON, R. et al. Aspalathin from Rooibos (*Aspalathus linearis*): A Bioactive C - glucosyl Dihydrochalcone with Potential to Target the Metabolic Syndrome. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 84, n. 9–10, p. 568–583, 2018. DOI: 10.1055/s-0044-100622. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29388183/>. Acesso em: 9 jun 2021.

JOUBERT, E.; DE BEER, D. Rooibos (*Aspalathus linearis*) beyond the farm gate: From herbal tea to potential phytopharmaceutical. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 77, n. 4, p. 869–886, 2011. DOI: 10.1016/j.sajb.2011.07.004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629911001086>. Acesso em: 5 jun. 2021.

KEFER, J. C.; AGARWAL, A.; SABANEKH, E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. **International Journal of Urology**, Tokyo, New York, v. 16, n. 5, p. 449–457, 2009. DOI: 10.1111/j.1442-2042.2009.02280.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19383039/>. Acesso em 8 jun. 2021.

LEISEGANG, K. et al. Obesity and male infertility: Mechanisms and management. **Andrologia**, Berlin, Grosse, v. 53, n. 1, p. 1–14, 2020. DOI: 10.1111/and.13617. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32399992/>. Acesso em 7 abr. 2021.

LEISEGANG, K.; DUTTA, S. Do lifestyle practices impede male fertility? **Andrologia** Berlin, Grosse, v. 00:e13595, n. February, p. 1–13, 2020. DOI: 10.1111/and.13595. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/and.13595>. Acesso em: 4 set. 2020.

LEISEGANG, K.; HENKEL, R.; AGARWAL, A. Obesity and metabolic syndrome associated with systemic inflammation and the impact on the male reproductive system. **American Journal of Reproductive Immunology**, New York, n. February, p. 1–14, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31373727/>. Acesso em 14 nov. 2019.

LIU, Y.; DING, Z. Obesity, a serious etiologic factor for male subfertility in modern society. **Reproduction**, Cambridge, UK, v. 154, n. 4, p. R123–R131, 2017. DOI: 10.1530/REP-17-0161. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28747541/>. Acesso em 11 nov. 2019.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, MD, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951. DOI: 10.1016/s0021-9258(19)52451-6. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819524516?via%3Dihub>. Acesso em 10 jun. 2021.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. REVIEW ARTICLE A Review of the Bioactivity of South African Herbal Teas : Rooibos (*Aspalathus linearis*) and Honeybush (*Cyclopia intermedia*). **Phytotherapy Research**, London, v. 16, p. 1–16, 2007. DOI: 10.1002/ptr. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.1992>. Acesso em: 4 jul. 2020.

MCPHERSON, N. O.; LANE, M. Male obesity and subfertility, is it really about increased adiposity? **Asian Journal of Andrology**, Beijing, v. 17, n. 3, p. 450–458, 2015. DOI: 10.4103/1008-682X.148076. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4430951/>. Acesso em: 9 jun. 2021.

MELO, F. C. S. A. et al. The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. **Biological Research**,

Santiago, v. 43, n. 4, p. 445–450, 2010. DOI: 10.4067/S0716-97602010000400009. Disponível: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-97602010000400009&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 9 jun. 2021.

MORAIS, A. C. T. et al. Parâmetros morfofisiológicos testiculares de camundongos (*Mus musculus*) suplementados com geleia real. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 1, p. 110–118, 2009. DOI: 10.1590/S0102-09352009000100016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/jsphdctJRVhdbX8dLtCQJBp/?lang=pt>. Acesso em: 12 jun. 2021.

MURTA, D. V. F.; GOMES, V. C. L.; MARTINEZ, L. C. R. A organização celular dos testículos de mamíferos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 20, p. 1–12, 2013. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/0PbE0m8vhpKbA8V_2013-6-21-15-52-4.pdf. Acesso em: 4 jun. 2020.

OLIVEIRA, C. F. A. **Estudo comparado da função testicular de camundongos adultos BALB / c selvagens e portadores de mutação nos genes Foxn1 e Prkdc**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-9N8JLL/1/disserta_ao_carolina_felipe.pdf. Acesso em: 4 out. 2020.

OLIVEIRA, M. C. et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obesity**, Silver Spring, MD, v. 21, n. 9, p. 1-12, 2013. DOI: 10.1002/oby.20230. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/oby.20230>. Acesso em: 11 nov. 2019.

OPUWARI, C. S.; MONSEES, T. K. In vivo effects of *Aspalathus linearis* (rooibos) on male rat reproductive functions. **Andrologia**, Berlin, v. 46, n. 8, p. 867–877, 2014. DOI: 10.1111/and.12158. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/and.12158>. Acesso em: 12 nov. 2019.

PHILLIPS, K. P.; TANPHAICHITR, N. Mechanisms of obesity-induced male infertility. **Expert Review of Endocrinology and Metabolism**, London, UK v. 5, n. 2, p. 229–251, 2010. DOI: 10.1586/eem.09.65. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30764048/>. Acesso em 13 set. 2020.

PRINGLE, N. A. et al. Potential Therapeutic Benefits of Green and Fermented Rooibos (*Aspalathus linearis*) in Dermal Wound Healing Authors. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 84, p. 645–652, 2018. DOI: 10.1055/a-0578-8827. Disponível em: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/pdf/10.1055/a-0578-8827.pdf>. Acesso em 15 mai. 2021.

RHEMREV, J. P. T. et al. Quantification of the nonenzymatic fast and slow TRAP in a postaddition assay in human seminal plasma and the antioxidant contributions of various seminal compounds. **Journal of Andrology**, Philadelphia, Toronto, v. 21, n. 6, p. 913–920, 2000. DOI: 10.1002/j.1939-4640.2000.tb03422.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03422.x?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em: 15 mai. 2021.

RICART-JANÉ, D.; LLOBERA, M.; LÓPEZ-TEJERO, M. D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, Orlando, FL, v. 6, n. 2, p. 178–185,

2002. DOI: 10.1006/niox.2001.0392. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1089860301903921?via%3Dihub>. Acesso em: 10 jun. 2021.
- SALAS-HUETOS, A.; BULLÓ, M.; SALAS-SALVADÓ, J. Dietary patterns, foods and nutrients in male fertility parameters and fecundability: A systematic review of observational studies. **Human Reproduction Update**, Oxford, UK , v. 23, n. 4, p. 371–389, 2017. DOI: 10.1093/humupd/dmx006. Disponível em: <https://academic.oup.com/humupd/article/23/4/371/3065333>. Acesso em: 8 jun. 2021.
- SALEH, R. A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, Philadelphia, Toronto, v. 23, n. 6, p. 737–752, 2002. DOI: 10.1002/j.1939-4640.2002.tb02324.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02324.x?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em: 5 mai. 2021.
- SASAKI, M.; NISHIDA, N.; SHIMADA, M. A beneficial role of rooibos in diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. **Molecules**, Basel, Switzerland v. 23, n. 4, p. 1–15, 2018. DOI: 10.3390/molecules23040839. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6017582/>. Acesso em: 9 jun. 2021.
- SCHULZ, R. W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 43–56, 2002. DOI: 10.1023/A:1023303427191. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1023303427191>. Acesso em: 5 mai. 2021.
- SEED, J. et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: A consensus report. **Reproductive Toxicology**, Elmsford, N.Y., v. 10, n. 3, p. 237–244, 1996. DOI: 10.1016/0890-6238(96)00028-7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0890623896000287?via%3Dihub>. Acesso em: 9 jun. 2021.
- SEGATELLI, T. M. **Análise quantitativa, duração do ciclo do epitélio seminífero e produção espermática do testículo do gerbilo da Mangólia (*Meriones unguiculatus*)**. 2003. Tese (Doutorado em Biologia celular e estrutural na área de Anatomia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/317533/1/Segatelli_TaniaMara_D.pdf. Acesso em: 5 mar. 2021.
- SILVA, A. A. DA. **A infecção pelo vírus Zika causa alterações morfológicas testiculares e espermáticas em camundongos balb/C adultos**. 2020. Dissertação (Mestrado em Biologia Aplicada à saúde) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/37857/1/DISSERTAÇÃO Anderson Arnaldo da Silva.pdf>. Acesso em: 5 fev. 2021.
- STANTON, P. G. Regulation of the blood-testis barrier. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, London, UK, v. 59, p. 166–173, 2016. DOI: 10.1016/j.semcdb.2016.06.018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952116301793?via%3Dihub>. Acesso em: 5 fev. 2021.
- TAE, H. J. et al. Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus karpowi*) during the breeding and non-breeding seasons.

Veterinary Research Communications, Amsterdam, v. 29, n. 7, p. 629–643, 2005. DOI: 10.1007/s11259-005-3080-8. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11259-005-3080-8>. Acesso em: 16 fev. 2021.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: Mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, London, UK, v. 6, n. 10, p. 772–783, 2006. DOI: 10.1038/nri1937. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri1937>. Acesso em: 9 jun. 2021.

UCHIDA, A. et al. Development and function of smooth muscle cells is modulated by Hic1 in mouse testis. **Development (Cambridge)**, Cambridge, UK, v. 147, n. 13, 2020. DOI: 10.1242/dev.185884. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7375483/>. Acesso em: 16 fev. 2021.

ULIČNÁ, O. et al. Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) partially prevents oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **Physiological Research**, Praha, v. 55, n. 2, p. 157–164, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15910170/>. Acesso em 9 jun. 2021.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: Main analytical methods for their determination. **Quimica Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007. DOI: 10.1590/s0100-40422007000500046. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/3m4YvKPKckKKFGvgYzyyWjn/abstract/?lang=en>. Acesso em: 5 mai. 2021.

WAGNER, H.; CHENG, J. W.; KO, E. Y. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. **Arab Journal of Urology**, Cairo, v. 16, n. 1, p. 35–43, 2018. DOI: 10.1016/j.aju.2017.11.001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5922220/>. Acesso em: 4 nov. 2019.

WALLIN, B. et al. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: Its use for evaluation of antioxidants. **Analytical Biochemistry**, Orlando FL, v. 208, n. 1, p. 10-15, 1993. DOI: 10.1006/abio.1993.1002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326978371002X?via%3Dihub>. Acesso em: 9 jun. 2021.

WALTERS, N. A. et al. Improved HPLC method for rooibos phenolics targeting changes due to fermentation. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 55, p. 20–29, 2017. DOI: 10.1016/j.jfca.2016.11.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157516301934>. Acesso em: 8 jun. 2021.

ARTIGO

**Effects of rooibos (*Aspalathus linearis*) on the testicular parenchyma of adult
BALB/c mice submitted to a hypercaloric diet**

O artigo encontra-se nas normas do periódico Brazilian Archives of Biology and
Technology
(ISSN – 1678-4324)

EFFECTS OF ROOIBOS (*ASPALATHUS LINEARIS*) ON THE TESTICULAR PARENCHYMA OF ADULT BALB/C MICE SUBMITTED TO A HYPERCALORIC DIET

Hilara Niemeyer Ruas¹

<https://orcid.org/0000-0003-0992-7622>

Fernanda Carolina Ribeiro Dias¹

<https://orcid.org/0000-0002-6530-4684>

João Vitor Lopes-Ferreira¹

<https://orcid.org/0000-0001-7069-988X>

Maria Emília Soares Martins dos Santos²

<https://orcid.org/0000-0001-08922-0867>

Angelica de Oliveira Gomes²

<https://orcid.org/0000-0001-8719-2794>

Mariella Bontempo Freitas³

<https://orcid.org/0000-0001-5132-242X>

Marcos de Lucca Moreira Gomes*

<https://orcid.org/0000-0003-4397-4609>

¹ Federal University of Triângulo Mineiro, Department of Structural Biology, Uberaba, MG, Brazil; ² Federal University of Triângulo Mineiro, Department of Biochemistry, Physiology and Pharmacology Structural Biology, Uberaba, MG, Brazil. ³ Federal University of Viçosa, Department of Animal Biology, Viçosa, MG, Brazil.

*Correspondence: marcos.gomes@uftm.edu.br; Tel.: +55-34-37006440 (M.L.M.G.)

- Obesity plays an important role in triggering oxidative stress in the testis.
- Catalase level is decreased due to the hypercaloric diet.
- Rooibos is not able to counteract oxidative stress induced by the hypercaloric

Abstract: Oxidative stress due to obesity plays a detrimental role in the testicular microenvironment and sperm parameters. This impairment of reproductive potential triggers a succession of events that are harmful to testicular cells, culminating in infertility. In the present study, we explored the impact of a hypercaloric diet in male BALB/c mice as a condition to trigger damage to the spermatogenic process and we tested the antioxidant effect of the commercial species *Aspalathus linearis* (Rooibos). For this, we used a hypercaloric diet (4.4 Kcal/g) composed of 74.2% carbohydrates, 5.8% fat and 20% protein in animals divided into 3 groups (n=8): Control, HC (hypercaloric diet and water) and HCR (hypercaloric diet and Rooibos). Morphometric parameters, enzyme dosages, cell viability and tubular histopathology were evaluated. Body weight increased in HCR animals at weeks 3, 4 and 8, respectively, and good acceptance of the administered diet based on food consumption. Testicular morphometric analyzes indicated

decreased seminiferous epithelium height, with an increase in the tubular diameter of the HCR group, indicating germ cell's alterations. Catalase levels were lower in HC and HCR, while carbonyl protein was decreased in HC. The changes recorded may be considered as an initial response to the damage caused by the hypercaloric diet to the germ cells. Therefore, despite considering the time of exposure to the diet relatively short, we estimate that it induces oxidative stress capable of affecting the seminiferous epithelium and that the infusion of commercial *A. linearis* do not demonstrate a potential benefit in cell preservation.

Keywords: reproduction; obesity; high fat diet; testis; oxidative stress.

INTRODUCTION

Several studies address the impairment of the male reproductive system due to obesity [1, 2, 3], stating that the increase in infertility is due to the prevalence of obesity in male subjects [1]. Excess visceral adipose tissue in obese individuals causes changes in hormone levels and promotes a chronic inflammatory state in the male reproductive tract, physiologically harming sperm during both spermatogenesis and sperm maturation in the epididymis, reducing sperm quality and increasing the risk of male infertility [4].

Several mechanisms relate the negative effects of obesity on fertility, such as the production of adipokines by adipose tissue, inducing severe inflammation and oxidative stress in the male reproductive tract. In particular, reactive oxygen species play a fundamental role in sperm maturation, fertilization capacity and sperm parameters. Although indispensable, excess produced ROS require antioxidant defense mechanisms to counteract this dysregulation. Oxidative stress is characterized by systemic imbalance with exacerbated production of ROS by the body. Evidence suggests that oxidative stress is related, regardless of etiology, to male infertility. About 30 to 80% of infertile men have high levels of reactive species in the semen [5, 6, 7].

The administration of antioxidants is one of the methods to counteract oxidative stress side effects in the reproductive tract. Recently, the interest in the performance of various natural and commercial products to prevent and treat several diseases, due to the antioxidant characteristics of their main components, has increased. In this context, the species *Aspalathus linearis*, popularly known as Rooibos, stands out. Recent studies demonstrate the beneficial effects of using Rooibos tea, due to its effectiveness in lowering the levels of blood lipid markers [8, 9, 10].

Therefore, considering that obesity generates metabolic and inflammatory impairment in the body and in the reproductive tract, especially in the testicular parenchyma, we seek to investigate how the harmful effects caused by obesity could be attenuated. In this study, aimed to confirm the harmful potential of the hypercaloric diet on the spermatogenic process and to determine whether the administration of the species *A. linearis* is able to attenuate or minimize the effects of oxidative stress in the male reproductive tract.

MATERIAL AND METHODS

Experimental groups

Adult male BALB/c mice (22 - 23 g) were kept in the animal facility of the Biochemistry Department of the Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM) for 8 weeks, with controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and light cycle (12/12h dark/light cycles). The animals were divided into three groups (n=8): Control (normocaloric diet and water), HC (hypercaloric diet and water) and HCR (hypercaloric diet and Rooibos). All had free access to food and water supply. The administered diet and the water were introduced together from the beginning to the end of the experiment. The normocaloric diet (4.0 Kcal/g) contained 65.8% carbohydrates, 3.1% fat and 31.1% protein. The hypercaloric diet (4.4 Kcal/g) was prepared by supplementing the normocaloric

ration (Labina Purina®) resulting in 74.2% carbohydrates, 5.8% fat and 20% proteins, according to OLIVEIRA *et al.* [11].

Body weight was measured every week, while water intake and food supply were measured daily. The commercial infusion of Rooibos was prepared following Ulična *et al.* [8]. All experimental procedures were evaluated and approved by the Ethics Committee for the Use of Animals at UFTM (CEUA-UFTM) (protocol 11/2018/CEUA/PROPPG - number: 23085.002424/2018-59).

Tissue harvesting and processing

The animals were euthanized and dissected after intramuscular anesthesia, applied to the left quadriceps with a mixture of xylazine (10mg/kg) and ketamine (100mg/kg) considering the weight of each animal. Left vas deferens were removed, frozen in a cryovial and stored at -20°C for subsequent sperm analysis. Testicular weight was measured after animals were euthanized and the organ was removed.

The left testes were frozen in liquid nitrogen and cryopreserved at -80°C, for further enzymatic analysis of oxidative stress. The right testes were fixed in 2.5% glutaraldehyde solution in 0.1mol/L sodium phosphate buffer, pH 7.2 for 24h, for histological analysis. Briefly, the material was routinely dehydrated in ethanol and embedded in glycolmethacrylate (Historesina®), according to the manufacturer's recommendations. Histological sections with 3µm of thickness were made in an automatic microtome (Leica ® Jung RM2055), respecting the interval of 40 µm between sections. Histological sections were stained with toluidine blue/1% sodium borate for morphological and testicular morphometric analysis.

Testis morphometry

The gonadosomatic index (IGS, %) was obtained by dividing the testicular weight by the body weight multiplied by 100 [12]. The mean seminiferous tubule diameter was obtained after measuring 10 cross-sections of random seminiferous tubules from each animal. The height of the seminiferous epithelium was measured in the same tubular sections as the tubule diameter was obtained (as the average of two diametrically opposite measurements). The areas of the seminiferous tubule (STAr), lumen (LAr) and epithelium (EAr) were estimated according to the formulas: STAr = πTR^2 (TR = tubular radius); LAr = πLR^2 (LR = luminal radius); EAr = STAr - LAr. The epithelial/tubule ratio (ETR) ratio was calculated using the formula: RET = EAr/STAr.

The volumetric proportions (%) of the testicular parenchyma components were analyzed using an orthogonal grid with 357 intersection points placed on the testicular parenchyma digital images (100X magnification). The number of intersections located over the interstitium and the seminiferous tubules was counted, determining the proportion of each component in 10 images per animal. All morphometrical analysis were made using the ImageJ software.

Germ and Sertoli cells count

Germ cell's populations that make up the seminiferous tubules in Stage VII/VIII of the seminiferous epithelium cycle [13] were counted according to Oliveira *et al.* [14], and corrected for the mean nuclear/nucleolar diameter, as described by Amann, Almquist [15]. Populations of type A spermatogonia (GoA), primary spermatocytes in leptotene/pre-leptotene (SPTL) and pachytene (SPTP), round spermatids (SPDAr) and Sertoli cells (SC) were quantified in 10 cross sections of the tubule seminiferous per animal.

In order to evaluate the efficiency of the spermatogenic process and of the Sertoli cells, the ratios between the germ cell's populations, as well as between germ cells and Sertoli cells were estimated. The following ratios were used: spermatogonial mitosis efficiency coefficient (SPTL/GoA); general spermatogenesis yield (SPDAr/GoA); meiotic index (SPDAr/SPTP); Sertoli cell index (SPDAr/SC); Sertoli cell's total support capacity (GoA + SPTL + SPTP + SPDAr/SC).

Sperm morphology

Cryopreserved sperm, contained in one centimeter of the vas deferens adjacent to the epididymis, were collected and resuspended in a 0.1M sodium phosphate buffer solution, pH=7, for 15 minutes. One drop of the solution was placed on a slide and covered with a cover slip. The slide was immediately observed under a light microscope, with phase contrast, in a 40X objective. Two hundred sperm from each animal were evaluated in order to verify the presence of abnormalities in the head and tail [16].

Oxidative stress analysis

Enzyme assays for oxidative stress were performed from testicular samples kept at -80°C. Each testis was weighed and homogenized in 1000µL of a 20mM potassium phosphate buffer solution (pH 7.4) and centrifuged at 12000 rpm, 4°C, for 10 minutes. After centrifuging the homogenate, this material was fractionated and the supernatant and pellet stored separately in cryovials at -20°C. The supernatant was used to measure nitric oxide (NO), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST), malondialdehyde (MDA) and total protein levels. The pellet formed was resuspended in 10% trichloroacetic acid for subsequent dosage of carbonyl protein. Duplicates were made for all samples. All enzyme activities were determined in duplicate using a spectrophotometer (UV-Mini 1240, Shimadzu).

CAT activity was evaluated according to the method described by Aebi [17], where the decomposition rate of H₂O₂ was measured at 0, 30 and 60 seconds. SOD activity was determined using the supernatants according to the method described by Del Mestro and McDonald [18], while glutathione S-transferase (GST) levels were determined by the formation of conjugated glutathione-2,4-dinitrobenzene (CDNB). Malondialdehyde (MDA) levels were determined using TBARS solution (15% trichloroacetic acid / 0.375% thiobarbituric acid / 0.25M hydrochloric acid).

The total MDA levels in each sample were determined using a standard curve from known concentrations of 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMPO) [19]. The concentration of nitric oxide (NO) was indirectly determined through the content of nitrite/nitrate by the Griess reaction [20]. Total protein was measured using bovine serum albumin as standard curve [21], and used for homogenization of oxidative stress data.

Germ cell viability

Semi-serial histological sections (1µm) of the seminiferous tubules were stained with acridine orange (AO) and propidium iodide (PI). Digital images were used to assess viability and cell morphology changes.

Ten fields showing seminiferous tubules were analyzed per region and per animal [22,23,24]. The cell classification was based on the fragmentation and condensation of the cell nucleus, as well as the integrity of the membrane, according to double fluorescent labeling by acridine orange and propidium iodide [23]. The histomorphological criteria for classification of cell viability indicated that viable cells have a green nucleus, which makes their recognition easily noticeable. Apoptotic cells show color ranging from yellow to orange in agreement with the estimate of loss of membrane integrity indicated by labeling with propidium iodide. acridine orange demonstrates potential in staining both viable cells and cells dying, while propidium iodide reveals only cells that show loss of cell integrity [22,24].

Histopathology analysis

The proportions of normal and pathological seminiferous tubules were estimated by counting 200 random tubules in histological preparations from the testes of each animal. According to Johnsen [25], there are 10 levels of alteration in the seminiferous tubule. In our study, the scores were modified to 8 levels: Level 1 - intact tubules with germ cells arranged in their normal location and few vacuoles; Level 2 - vacuoles at the base of the epithelium; Level 3 - vacuoles at the apex of the epithelium; Level 4 - vacuoles at the apex and base of the epithelium; Level 5 -

spermatogenic cells in tubular lumen and cell degeneration; Level 6 - tubules with only basal cells; Level 7 - tubules with only Sertoli cells; Level 8 - tubules without Sertoli or germ cells, characterizing a state of irreversible degeneration. These levels were grouped into normal (Level 1), mild pathologies (Levels 2 and 3), moderate pathologies (Levels 4 and 5), and severe pathologies (Levels 6, 7 and 8), as described by Dias *et al.* [26].

Statistics

Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism Software version 5.00.288. Data were analysed using the Shapiro-Wilk t test to assess normality. For parametric data we used ANOVA followed by Tukey test. For non-parametric data, the Kruskal-Wallis test was used. The significance level was defined as 5%.

RESULTS

Food/water consumption and caloric intake

During the eight weeks of treatment, both food intake (Fig. 1A) and energy intake (Fig. 1B) were significantly higher among mice from groups C and HCR ($p < 0.001$) and from groups HC and HCR ($p < 0.05$). Food consumption in the HC group, however, was not different from that in the control group, although caloric intake was higher ($p < 0.001$). Water consumption in the HCR group was higher than in the HC group ($p < 0.001$), with the same diet, while water consumption of the HC group was lower than the control ($p < 0.001$) (Fig. 1C).

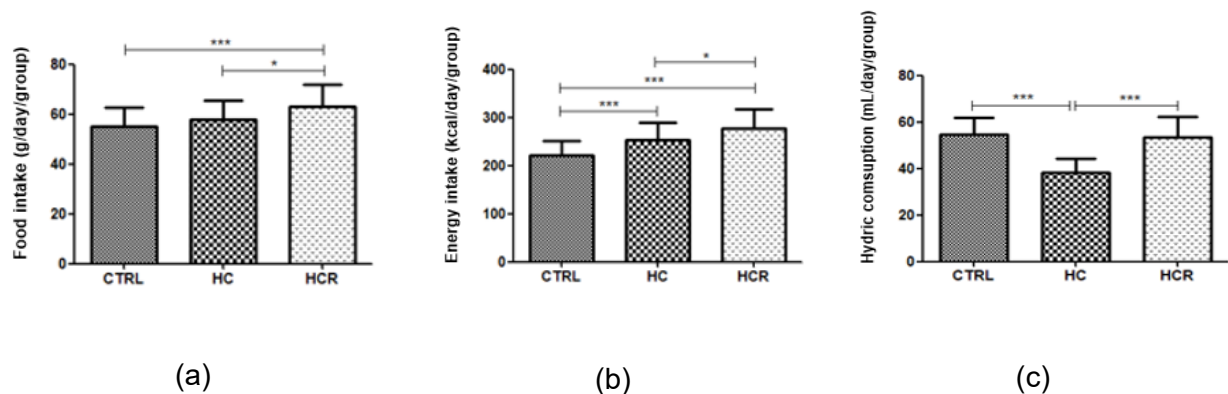


Figure 1. (a) Daily food intake (g/day), (b) Daily energy intake (kcal/day) and (c) Daily hydric consumption (mL/day). Treatment time = 8 weeks. Data are mean \pm SD. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. CTRL= control, HC= hypercaloric diet, HCR= hypercaloric diet+Rooibos.

Body and testicular weight

Animals fed hypercaloric diet and treated with Rooibos infusion gained weight compared to the other groups at weeks 3, 4 and 8, respectively (Fig. 2A). Despite the increase in body weight, the testicular weight (Fig. 2B) and the GSI (Fig. 2C) were not altered.

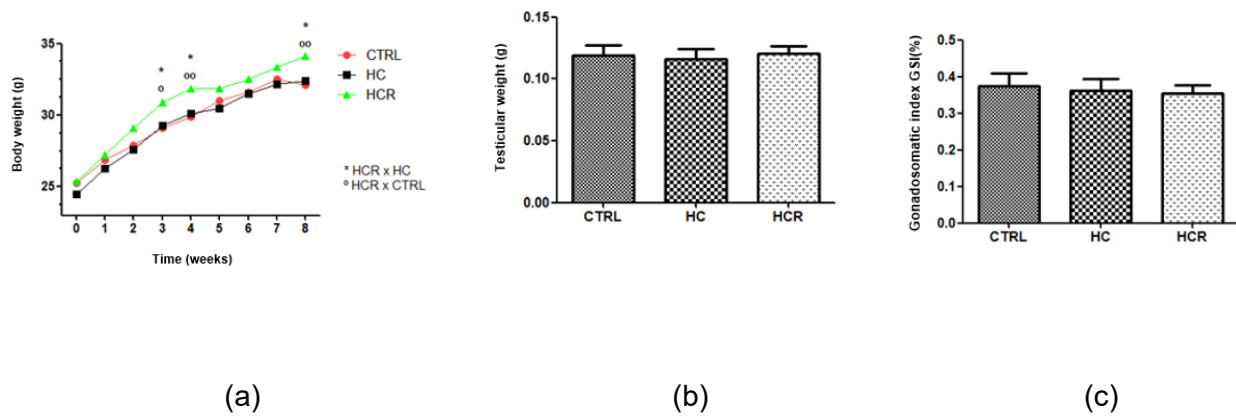


Figure 2. Body and testis weights. (a) Weekly weight gain of animals treated with a normocaloric and hypercaloric diet, with or without Rooibos, (b) Testicular weight and (c) gonadosomatic index. Data are mean \pm SD. * $p < 0.05$. CTRL= control, HC= hypercaloric diet, HCR= hypercaloric diet+Rooibos.

Testicular morphometry

No statistical differences were found in the morphometric measurements of the seminiferous tubules (Table 1).

Table 1. Seminiferous tubules morphometry.

Seminiferous tubule	Control	HC	HCR
Tubule diameter (μm)	223.0 \pm 11.56	226.2 \pm 11.64	228.5 \pm 0.78
Lumen diameter (μm)	63.57 \pm 16.63	67.63 \pm 23.46	81.59 \pm 9.55
Epithelium height (μm)	79.70 \pm 11.25	79.30 \pm 17.14	74.75 \pm 4.23
Tubule area (μm^2)	39136 \pm 4045	40285 \pm 4129	41024 \pm 281.40
Lumen area (μm^2)	3364 \pm 1711	3952 \pm 2320	5286 \pm 1249
Epithelium area (μm^2)	35772 \pm 4688	36332 \pm 6316	36678 \pm 1894
ETR	0.92 \pm 0.04	0.90 \pm 0.07	0.87 \pm 0.03
IVP (%)	9.29 \pm 2.41	7.38 \pm 0.94	7.94 \pm 1.43
TVP (%)	90.71 \pm 2.41	92.62 \pm 0.94	92.06 \pm 1.43

¹ (ETR) Epithelium/tubule ratio; (IVP) Interstitium volumetric proportion; (TVP) Tubule volumetric proportion. Values are mean \pm SD (ANOVA and t test, $p < 0.05$). HC= hypercaloric diet, HCR= hypercaloric diet+Rooibos.

Germ and Sertoli cell counts

There was an increase in the number of spermatocytes in pre-leptotene/leptotene (SPTL) in the HC and HCR groups ($p < 0.01$). To evaluate the efficiency of the spermatogenic process and the efficiency of Sertoli cells, spermatogenic yield, mitotic index, meiotic index, Sertoli cell index

and total carrying capacity of Sertoli cells were estimated. The mitotic index was significantly higher in the HC ($p<0.05$) and HCR ($p<0.01$) groups (Table 2).

Table 2. Germ and Sertoli cells count by seminiferous tubules cross-sections in stage VII/VIII of the seminiferous epithelium, as well as the ratios between cell populations.

Parameters	Control	HC	HCR
Spermatogonia	0.85 ± 0.14	0.68 ± 0.12	0.62 ± 0.21
Spermatocyte in pre-leptotene/leptotene	11.49 ± 0.89 ^b	13.98 ± 1.26 ^a	12.99 ± 1.53 ^{ab}
Spermatocyte in pachytene	8.25 ± 0.83	9.15 ± 1.71	8.26 ± 1.42
Round spermatid	18.38 ± 2.08	20.16 ± 3.26	18.60 ± 2.52
Sertoli Cell	2.60 ± 0.36	3.05 ± 0.53	2.45 ± 0.52
Spermatogenic yield	21.83 ± 2.82	30.21 ± 6.88	32.81 ± 12.73
Mitotic index	13.70 ± 1.93 ^a	21.17 ± 5.12 ^b	22.19 ± 4.81 ^b
Meiotic index	2.24 ± 0.32	2.23 ± 0.30	2.33 ± 0.60
Sertoli cell index	7.19 ± 1.46	6.86 ± 1.99	8.01 ± 2.62
Sertoli support capacity	15.21 ± 2.60	14.94 ± 3.83	17.18 ± 3.92

¹ Values are mean ± SD. Different superscripts (^{a,b}) are $p<0.05$ (ANOVA and t test, n=6) HC= hypercaloric diet, HCR= hypercaloric diet+Rooibos.

Sperm morphology

There were no significant changes in sperm morphology (Table 3).

Table 3. Sperm morphology.

Sperm parameters (%)	Control	HC	HCR
Normal	97.25 ± 0.68	97.92 ± 1.28	97.66 ± 1.47
Tail defects	2.58 ± 0.58	1.75 ± 1.33	1.67 ± 0.87
Head defects	0.17 ± 0.25	0.33 ± 0.60	0.67 ± 0.75

Oxidative stress assay

The levels of carbonylated protein were reduced in HC ($p<0.05$). Furthermore, catalase levels decreased in the HC and HCR groups ($p<0.01$) when compared to the control, as well as a decrease in the HCR group compared to the HC group. MDA, ON, SOD and GST levels were not changed (Figure 3).

Germ cell viability

Figure 4 illustrates the assessment of cell viability (%) in histological sections of seminiferous epithelium stained by acridine orange/propidium iodide. No changes on germ cells viability were observed between groups.

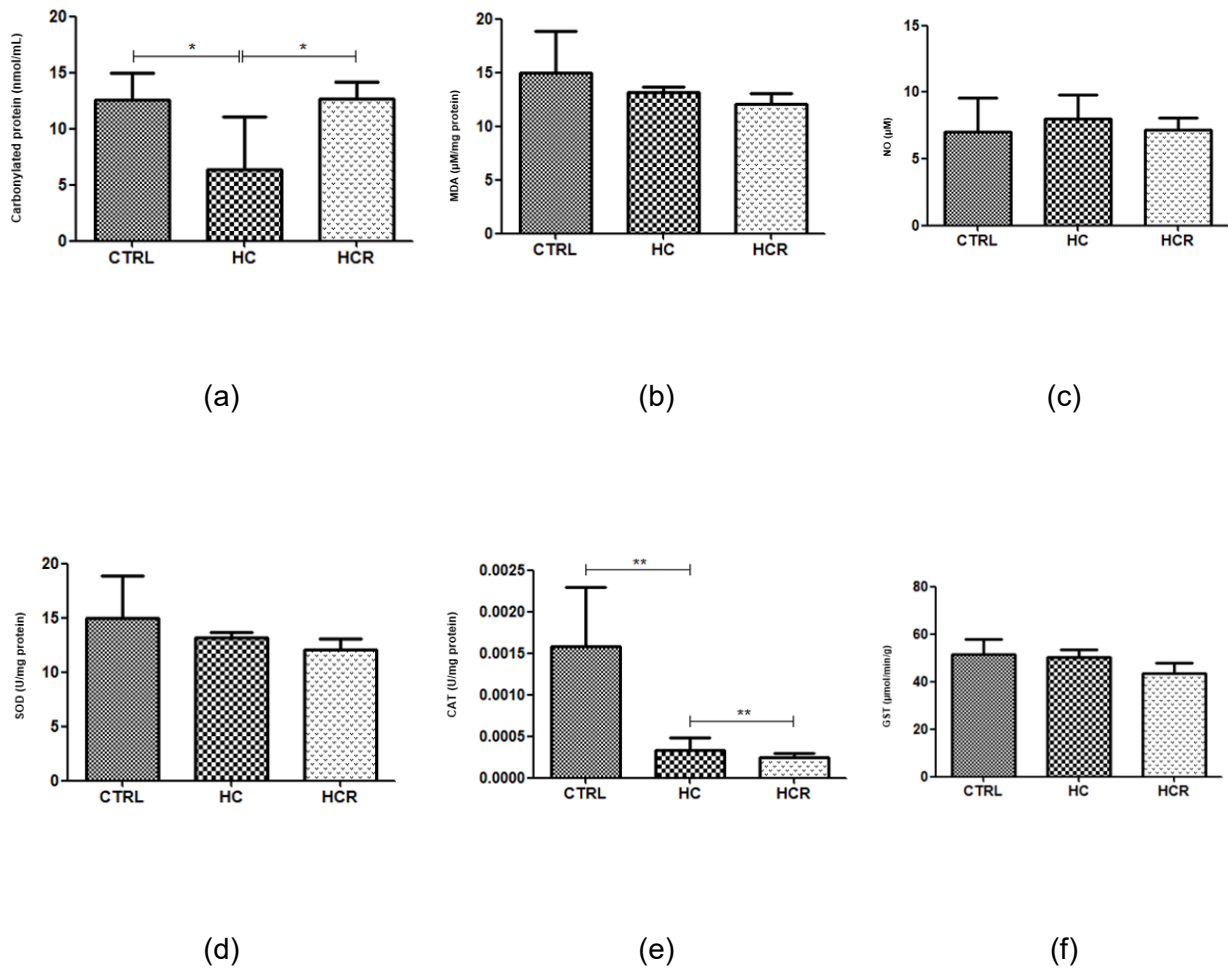


Figure 3. Levels of **(A)** Carbonylated protein; **(B)** Malondialdehyde (MDA); **(C)** Nitric oxide (NO); **(D)** Superoxide dismutase (SOD); **(E)** Catalase (CAT) and **(F)** Glutathione-S-transferase (GST). (Date are mean \pm SD, ANOVA and t test, *p<0,05; **p<0,01, n=4) **CTRL** = Control, **HC**= hypercaloric diet, **HCR**= hypercaloric diet+Roibos.

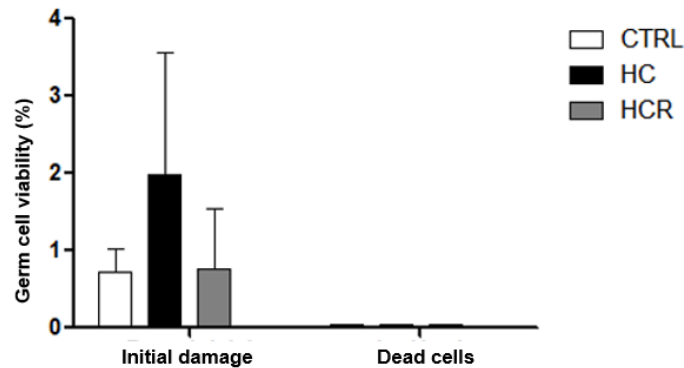


Figure 4. Germ cell viability (%) in histological sections of seminiferous tubule epithelium of BALB/c mice labeled with acridine orange and AO/IP propidium iodide (Data are reported as mean \pm standard deviation of the mean, ANOVA and t test) **CTRL** = Control, **HC**= hypercaloric diet, **HCR**= hypercaloric diet+Rooibos.

Histopathology

No significant pathological alterations were observed in the seminiferous tubules of HC and HCR groups (Figure 5).

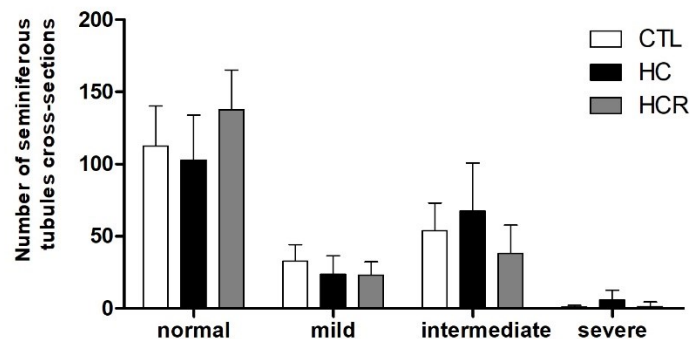


Figure 5. Histopathological evaluation of seminiferous tubules cross-sections, considering alterations within the seminiferous epithelium (mean \pm SD, ANOVA and t test) **CTRL** = Control, **HC**= hypercaloric diet, **HCR**= hypercaloric diet+Rooibos.

DISCUSSION

In the present study, we explored the potential impact of the induction of a hypercaloric diet in male BALB/c mice as a condition triggering damage to the testicular seminiferous tubules in order to test the attenuating effect of the plant species *Aspalathus linearis* on testicular cells.

The adoption of controlled hypercaloric diets has been widely used in animal models for inducing the state of obesity as a result of higher caloric intake, whether from lipids or carbohydrates [27, 28]. In this sense, we observed a relevant acceptance of the hypercaloric refined carbohydrate diet by the treated mice, which might be due to the increase in food

consumption between the groups. The inclusion of condensed milk in diets could help to increase food intake [29]. The consumption of palatable and high-calorie foods are among the most important predisposing factors for obesity in rodents [30, 31]. On the other hand, there are studies that reveal that the lower food intake of hypercaloric diets, both lipidic and carbohydrates, but with high caloric content, still express important body weight gain [28, 29, 32, 33, 34, 35].

It is worth mentioning that the energy composition of the diet is also a factor for weight gain in attempts to induce obesity in animal models. Pereira *et al.*, [27] report that the dietary intake of the high-fat diet (42% lipids) was lower than the normocaloric diet consumed by the control group. However, despite the low food intake, the treated animals showed weight gain because the energy density of the high-fat diet was higher. The animal's age at the beginning of the experimental protocol can also interfere with body mass gain, since young animals would convert energy gain into lean mass and not exclusively into weight gain [31]. Gómez-Elías *et al.* [32] assume that different strains of mice chosen for the experimental design could influence the response to treatments for inducing obesity and fertility. Questions such as time and energy efficiency of treatments must be analysed, so that the induction of obesity in rodents is efficient and reflects possible changes. Thus, Funes *et al.*, [34] indicate that the longer the treatment period for inducing obesity by diet in rodents, the more the data tend to show significant changes in body weight and cause changes in testicular health. In the present study, there was a significant increase in food consumption and caloric intake. Although food consumption of the HC group was similar to that of the control group, their energy intake was higher, which demonstrates that the diet, by itself, has sufficient caloric intake. The HCR group also showed increased energy intake when compared to the control and HC group. Despite the record of energy efficiency by diet, the body weight of the animals was significantly higher, especially at the end of the treatment for the HCR group. Although such increase in energy intake and body weight has been recorded, testicular weight was not altered over the experimental time, as also described previously by Gómez-Elías *et al.*, [32], Scarton *et al.*, [36] and Nematollah *et al.*, [37]. On the other hand, Oliveira *et al.* [11] did not record changes in body weight and food consumption, although the diet was able to expand retroperitoneal adipose tissue.

Considering water consumption, Morton [38] describes the Rooibos tea as a beverage with a pleasant aroma and a non-astringent taste. We consider that the differences in the amount of volume ingested by the control and HC groups, and between the HC and HCR groups may have been influenced by this characteristic. However, some studies demonstrate that water consumption by animals on normocaloric diets is equivalent to those on a hypercaloric diet [28, 39]. Despite the increase in water consumption body weight gain was not altered, following the results from Awoniyi *et al.* [10]. Canda *et al.* [40] in order to verify the potential attenuating effect of Rooibos in Wistar rats induced to a framework of oxidative stress, they verified that the water consumption of Rooibos was lower than the group that received water as the sole water source. Despite the lower water consumption of Rooibos, the animals' body weight was not different between groups. Thus, we assumed that Rooibos intake would not imply to increase body mass.

Testicular weight and volume are often used to assess testicular development. As in our study Opuwari and Monsees [41] did not find significant changes in testis weight and body weight after treatment with Rooibos (fermented) at a concentration of 2% and 5%. However, the authors believe that prolonged consumption of Rooibos could generate subtle structural changes in the male reproductive system. Thus, despite the increase in food and caloric intakes, the extension of the treatment period would possibly induce considerable increases in body and testicular weights. Also, there is great variation in the literature regarding the period that best describes an obesity condition and the type of diet administered [31, 27, 42]. Yuan *et al.* [43] report that the decrease in testicular weight and volume is accompanied by hyperleptinemia, which is harmful to the testicular structure. In their study, they assume that the exposure time to the diet was not long enough to cause changes in body weight, nor in testicle weight. Kenagy and Trombulak [44] and Lozi [45] relate the size of the testes to the reproductive physiology of males and attest that

testicular biometry is able to provide information that inferred changes in the rate of sperm production.

The GSI showed no significant changes between groups, which can be explained by the maintenance of testicular weight, because even with the increase in body weight, this proportionally did not reflect the increase in testicular weight. Mu *et al.* [46] demonstrated that male Sprague-Dawley rats maintained on high-calorie diets for a period of 8 weeks presented a reduction in GSI and testicular weight, indicating alterations in spermatogenesis. In addition, the authors cite atrophy in the diameter of the seminiferous tubule, predictive of the loss of sperm production capacity. In general, species whose testes have a high proportion of seminiferous tubules produce more sperm per mass unit [47].

The morphometry of the seminiferous tubules shows us the number of two distinct populations of cells that make up the seminiferous epithelium: germ cells and Sertoli cells [48]. It is known that obesity can cause damage to testicular cells causing changes, mainly, in the structure of the seminiferous epithelium in human and animal models [49]. Our results indicate a decreasing trend in epithelial height and ETR (epithelium/tubule ratio) in the HCR group, with an increase in the lumen diameter. Although germ cell quantity and tubular diameter are related parameters, the decrease in the number of cells would not necessarily result in a decrease in the height of the epithelium, which would be possible due to cell rearrangement and increased intercellular distance [50, 51].

The determination of spermatogenesis efficiency can be assessed by counting the germ cell population. The number of primary spermatocytes in pre-leptotene was increased due to the hypercaloric diet intake, thus increasing the mitotic index. However, such increase was not reflected in an increase of the spermatogenic yield, nor in the numbers of other cells present in the adluminal epithelial space, including Sertoli cells. Sertoli cells regulate sperm production and testicle size as they support limited numbers of germ cells [52,53]. According to Opuwari and Monsees [41], long-term Rooibos intake would be harmful to sperm, which was not observed in the present study.

Despite all morphological analyses did not show important testicular alterations, the oxidative stress analyses showed reduction in carbonyl protein levels due to the hypercaloric diet intake. The dosage of carbonylated protein is often used as a marker of protein oxidation, being an indicator of the oxidant/antioxidant balance within the tissues [54]. On the other hand, MDA levels did not indicate changes between groups, which points to the absence of lipid damage to germ cell membranes, indicating that the treatments did not induce the generation of a sufficient amount of lipid peroxides capable of changing the structure of the plasma membranes of such cells. Awoniyi *et al.* [10] reveal that the polyphenols present in Rooibos bind to lipid peroxides and, in this way, prevent the lipid peroxidation cascade. With the increased production of reactive oxygen species, there is activation of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH, in that order) to reduce the amount of reactive oxygen species. SOD catalyzes the reaction of converting the superoxide radical to H₂O₂ [55], while CAT converts H₂O₂ to oxygen and water [56]. Both groups treated with the hypercaloric diet showed significant reductions of CAT levels, which may indicate that this enzyme reached exhaustion and its activity maintained normal to low levels of MDA and carbonyl protein. Thus, Rooibos was not able to prevent CAT exhaustion induced by the hypercaloric diet.

GST, in turn, is responsible for cell detoxification [57] and activated after CAT depletion. GST activity was not changed between experimental groups. Thus, we believe there is an increase in ROS and that the first line of antioxidant defense was not enough to contain the increases in reactive oxygen species. The activation of the second line of defense naturally occurs to contain ROS increase, however, CAT, even reaching exhaustion, was capable of preventing lipid and protein damage in sperm membranes and in the testicular microenvironment, explainable by GST levels. Such assumption corroborates the fact that germ cell viability was not altered due to hypercaloric and/or Rooibos intake. In addition, no significant histopathological alterations were

noticed due to Rooibos and/or the hypercaloric intake, corroborating the germ cells analysis previously discussed.

CONCLUSION

The hypercaloric diet proposed for 8 weeks was able to induce changes in the levels of carbonylated protein and catalase, indicating the beginning of the testicular oxidative stress process. However, such alterations were not able to induce significant changes in the testicular parenchyma, or even in the viability of cell germ cells. Furthermore, despite not causing testicular damage, the infusion of Rooibos at the concentration used in this work, failed to reverse the action of the hypercaloric diet on the exhaustion of the catalase enzyme. Further studies with a long-term intake of both Rooibos and the hypercaloric diet might be performed to verify the possible harmful effects of the hypercaloric diet over the testicular germ cells.

Funding: This research was funded by UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO (Edital 30/2018).

Acknowledgments: The authors wish to thank the Laboratory of Chiroptera Ecology/DBA/UFV for providing the reagents to perform the oxidative stress analysis.

Conflicts of Interest: “The authors declare no conflict of interest.”

REFERENCES

1. Leisegang K, Henkel R, Agarwal A. Obesity and metabolic syndrome associated with systemic inflammation and the impact on the male reproductive system. *Am J Reprod Immunol.* 2019;(February):1–14.
2. Salas-Huetos A, Bulló M, Salas-Salvadó J. Dietary patterns, foods and nutrients in male fertility parameters and fecundability: a systematic review of observational studies. *Hum Reprod Update.* 2017;23(4):371–89.
3. Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *Int J Urol.* 2009;16(5):449–57.
4. Liu Y, Ding Z. Obesity, a serious etiologic factor for male subfertility in modern society. *Reproduction.* 2017;154(4):R123–31.
5. Agarwal A, Parekh N, Selvam MKP, Henkel R, Shah R, Homa ST, et al. Male oxidative stress infertility (MOSI): proposed terminology and clinical practice guidelines for management of idiopathic male infertility. *World J Mens Health.* 2019;37(3):296–312.
6. Dutta S, Majzoub A, Agarwal A. Oxidative stress and sperm function: a systematic review on evaluation and management. *Arab J Urol [Internet].* 2019 [cited 2020 Set 4];17(2):87–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31285919/> doi: <https://doi.org/10.1080/2090598X.2019.1599624>
7. Wagner H, Cheng JW, Ko EY. Role of reactive oxygen species in male infertility: an updated review of literature. *Arab J Urol [Internet].* 2018 [cited 2019 Nov 4];16(1):35–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29713534/> doi: <https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.001>.
8. Uličná O, Vančová O, Božek P, Čársky J, Šebeková K, Boor P, et al. Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) partially prevents oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Physiol Res.* 2006;55(2):157–64.
9. Sasaki M, Nishida N, Shimada M. A beneficial role of rooibos in diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Molecules.* 2018;23(4):1–15.
10. Awoniyi DO, Aboua YG, Marnewick J, Brooks N. The effects of rooibos (*Aspalathus linearis*), green te (*Camelli sinensis*) and commercial rooibos and green te supplements on epididymal sperm in oxidative stress-induced rats. *Phyther Res.* 2012;26(8):1231–9.
11. Oliveira MC, Menezes-Garcia Z, Henriques MCC, Soriani FM, Pinho V, Faria AMC, et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-

- containing diet in mice. *Obesity*. 2013;21(9).
12. Melo FCSA, Matta SLP, Paula TAR, Gomes MLM, Oliveira LC. The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. *Biol Res*. 2010;43(4):445–50.
 13. Oakberg EF. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat*. 1956;99(3):507–16.
 14. Oliveira CF, Lara NL, Lacerda SM, Resende RR, França LR, Avelar GF. *Foxn1* and *Prkdc* genes are important for testis function: evidence from nude and scid adult mice. *Cell Tissue Res*. 2020;380(3):615–25.
 15. Amann RP, Almquist JO. Reproductive Capacity of Dairy Bulls. VIII. Direct and Indirect Measurement of Testicular Sperm Production. *J Dairy Sci* [Internet]. 1962 [cited 2021 Jun 9];45(6):774–81. Available from: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(62\)89487-9/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(62)89487-9/fulltext) doi: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(62\)89487-9](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(62)89487-9)
 16. Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reprod Toxicol*. 1996;10(3):237–44.
 17. Aebi H. [13] Catalase in Vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105(C):121–6.
 18. Maestro RF del, McDonald W. Oxidative enzymes in tissue homogenates. In: Greenwald RA. CRC handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton: CRC Press; 1985.
 19. Wallin B, Rosengren B, Shertzer HG, Camejo G. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Anal Biochem*. 1993;208(1):10-15.
 20. Ricart-Jané D, Llobera M, López-Tejero MD. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. *Nitric Oxide- Biol Chem*. 2002;6(2):178–85.
 21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* [Internet]. 1951 [cited 2021 Jun 10];193(1):265–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14907713/> doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
 22. Giri BR, Roy B. *Cysticercus fasciolaris* infection induced oxidative stress and apoptosis in rat liver: a strategy for host-parasite cross talk. *Parasitol Res* [Internet]. 2016 [cited 2021 Jun 10];115(7):2617–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26987645/> doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5008-3>
 23. Cardoso PCS. Avaliação in vitro dos possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos das drogas antimaláricas artemisinina e artemeter em linfócitos humanos [dissertação]. Belém (PA): UFPA; 2012.
 24. Dias FCR, Martins ALP, Melo FCSA, Cupertino MC, Gomes MLM, Oliveira JMFR, et al. Hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* alters the organization of the seminiferous tubules by modulating the oxidative state and the microstructural reorganization of the mice testes. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2019 [cited 2021 Jun 10];233(December 2018):179–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30605740/> doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.12.047>
 25. Johnsen SG. Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*. 1970;1(1):2–25.
 26. Dias FCR, Machado-Neves M, Lima GDA, Martins ALP, Menezes TP, Melo FCSA, et al. How bad is brazilian ginseng extract for reproductive parameters in mice? *Histol Histopathol*. 2020;35(10):1135–49.
 27. Pereira JL, E Souza PCS, Shinzato VI, Sasso S, Santo BLS do E, Santana LF, et al. Ganho de peso e alterações metabólicas em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica. *Ciência & Saúde*. 2018;11(1):51.
 28. Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RAM, Nogueira CR, et al. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(6):968–74.
 29. Chu HF, Pan MH, Ho CT, Tseng YH, Wang WWL, Chau CF. Variations in the efficacy of resistant maltodextrin on body fat reduction in rats fed different high-fat models. *J Agric Food Chem*. 2014;62(1):192–7.
 30. Velloso LA. The brain is the conductor: diet-induced inflammation overlapping physiological control of body mass and metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009;53(2):151–8.

31. Rosini TC, Silva ASR, Moraes C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. *Rev Assoc Med Bras.* 2012;58(3):383–7.
32. Gómez-Eliás MD, Rainero Cáceres TS, Giaccagli MM, Guazzone VA, Dalton GN, De Siervi A, et al. Association between high-fat diet feeding and male fertility in high reproductive performance mice. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–9.
33. White PAS, Cercato LM, Araújo JMD, Souza LA, Soares AF, Barbosa APO, et al. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2013;57(5):339–45.
34. Funes A, Saez Lancellotti TE, Santillan LD, Della Vedova MC, Monclus MA, Cabrillana ME, et al. A chronic high-fat diet causes sperm head alterations in C57BL/6J mice. *Heliyon [Internet].* 2019 [cited 2021 Jun 12];5(11):e02868. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6895587/> doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02868>
35. Fan Y, Liu Y, Xue K, Gu G, Fan W, Xu Y, et al. Diet-induced obesity in male C57BL/6 mice decreases fertility as a consequence of disrupted blood-testis barrier. *PLoS One.* 2015;10(4):1–15.
36. Ribeiro S, Scarton S, Barbosa Retameiro AC, Tereza A, Guimarães B, Meire R, et al. Sericin exerts antioxidation on testis and epididymis of C57BL/6 mice fed high fat diet. *Int J Dev Res.* 2017;7(10):15813–20.
37. Asadi N, Bahmani M, Kheradmand A, Rafieian-Kopaei M. The impact of oxidative stress on testicular function and the role of antioxidants in improving it: a review. *J Clin Diagnostic Res.* 2017;11(5):IE01–5.
38. Morton JF. Rooibos Tea, *Aspalathus linearis*, a Caffeineless, Low-Tannin Beverage 1. *Econ Bot.* 1983;37(2):164–73.
39. Lin B, Hasegawa Y, Takane K, Koibuchi N, Cao C, Kim-Mitsuyama S. High-fat-diet intake enhances cerebral amyloid angiopathy and cognitive impairment in a mouse model of alzheimer's disease, independently of metabolic disorders. *J Am Heart Assoc.* 2016;5(6):1–16.
40. Canda BD, Oguntibeju OO, Marnewick JL. Effects of consumption of rooibos (*Aspalathus linearis*) and a rooibos-derived commercial supplement on hepatic tissue injury by tert -butyl hydroperoxide in wistar rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:9.
41. Opuwari CS, Monsees TK. In vivo effects of *Aspalathus linearis* (rooibos) on male rat reproductive functions. *Andrologia.* 2014;46(8):867–77.
42. Mathijs I, Cunha DA da, Himpe E, Ladrerie L, Chellan N, Roux CR, et al. Phenylpropenoic acid glucoside augments pancreatic beta cell mass in high-fat diet-fed mice and protects beta cells from ER stress-induced apoptosis. *Mol Nutr Food Res.* 2014;58(10):1980–90.
43. Yuan M, Huang G, Li J, Zhang J, Li F, Li K, et al. Hyperleptinemia directly affects testicular maturation at different sexual stages in mice, and suppressor of cytokine signaling 3 is involved in this process. *Reprod Biol Endocrinol [Internet].* 2014 [cited 2021 Aug 17 Jun 14];12(1):1–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24502529/> doi: 10.1186/1477-7827-12-15
44. Kenagy GJ, Trombulak SC. Size and function of mammalian testes in relation to body size. *Journal Mammal [Internet].* 1986 [cited 2021 Jun 14];67(1):1–22. Available from: <https://academic.oup.com/jmammal/article-abstract/67/1/1/897920> doi: <https://doi.org/10.2307/1380997>
45. Lozi AA. Toxicidade comparada dos metais pesados, arsênio, cádmio, chumbo, cromo e níquel, sobre parâmetros reprodutivos de camundongos machos adultos após exposição aguda [dissertação] [Internet]. Viçosa MG: UFV; 2019 [cited 2021 Jun 14]. Available from: <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/25645>
46. Mu Y, Yan WJ, Yin TL, Yang J. Curcumin ameliorates high-fat diet-induced spermatogenesis dysfunction. *Mol Med Rep.* 2016;14(4):3588–94.
47. Hess RA, Franca LR de. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Cheng C.Y., editor. *Advances in experimental medicine and biology.* 2008 th ed. New York, NY: Springer; 2008. p. 1–15.
48. Karl J, Capel B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol.* 1998;203(2):323–33.
49. McPherson NO, Lane M. Male obesity and subfertility, is it really about increased adiposity? *Asian J Androl.* 2015;17(3):450–8.

50. Gholami S, Ansari-Lari M, Khalili L. Histologic and histomorphometric changes of testis following oral exposure to methyl tertiary-butyl ether in adult rat. *Iran J Vet Res.* 2015;16(3):288–92.
51. Oliveira CFA, Lara NLM, Cardoso BRL, França LR, Avelar GF. Comparative testis structure and function in three representative mice strains. *Cell Tissue Res.* 2020;382(2):391–404.
52. Mäkelä JA, Koskenniemi JJ, Virtanen HE, Toppari J. Testis Development. *Endocr Rev.* 2019;40(4):857–905.
53. Gonçalves RV, Novaes RD, Leite JPV, Vilela EF, Cupertino MC, Nunes LG, et al. Hepatoprotective effect of *Bathysa cuspidata* in a murine model of severe toxic liver injury. *Int J Exp Pathol.* 2012;93(5):370–6.
54. Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of Oxidative Stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int [Internet].* 2011 [cited 2020 Set 20];2011:1–7. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/vmi/2011/686137/>
55. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem [Internet].* 1974 [cited 2021 Jun. 16];249(22):7130–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4436300/> doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)

5 CONCLUSÃO

A dieta hipercalórica proposta por 8 semanas foi capaz de induzir alterações nos níveis de proteína carbonilada e catalase, indicando o início do processo de estresse oxidativo testicular. No entanto, tais alterações não foram capazes de induzir alterações significativas no parênquima testicular, nem mesmo na viabilidade das células germinativas das células. Além disso, apesar de não causar dano testicular, a infusão de Rooibos na concentração utilizada neste trabalho não conseguiu reverter a ação da dieta hipercalórica sobre o esgotamento da enzima catalase. Mais estudos com uma ingestão de longo prazo de Rooibos e da dieta hipercalórica podem ser realizados para verificar os possíveis efeitos prejudiciais da dieta hipercalórica sobre as células germinativas testiculares.

6 ANEXOS

ANEXO 1 – Aprovação CEUA/UFTM

25/01/2019

CEVUFTM - 0053821 - Parecer Técnico



Universidade Federal do Triângulo Mineiro
 Comissão de Ética no Uso de Animais
 R. Madre Maria José, nº 122 - Bairro Abadia Uberaba/MG CEP 38025-100
 (34) 3700-6764 E-mail: ceua@uftm.edu.br

Uberaba, 18 de maio de 2018

PARECER Nº 11/2018/CEUA/PROPPG
PROCESSO Nº 23085.002424/2018-59
INTERESSADO: MARIA EMILIA SOARES MARTINS DOS SANTOS, NÚCLEO DE BIOTÉRIOS
ASSUNTO: Parecer de aprovação da proposta " Efeito do Rooibos (*Aspalathus linearis*) na prevenção e tratamento de alterações metabólicas em animais alimentados com uma dieta rica em carboidratos "

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do Rooibos (*Aspalathus linearis*) na prevenção e tratamento de alterações metabólicas em animais alimentados com uma dieta rica em carboidratos", registrada com o nº 23085.002424/2018-59, sob a responsabilidade de Maria Emilia Soares Martins dos Santos – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em reunião de **11/05/2018**.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	18/05/2018 à 31/12/2018
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongos isogênicos Balb/c
Nº de animais	32
Peso/idade	4-5 semanas/14-16gramas
Gênero	machos
Origem	Biotério Central da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues
 Coordenador da CEUA

Documento assinado eletronicamente por ALDO ROGELIS AQUILES RODRIGUES, Coordenador(a) da Comissão de Ética no Uso de Animais, em 18/05/2018, às 16:42, conforme horário oficial de Brasília, com

ANEXO 2 – Artigo submetido

Brazilian Archives of Biology and Technology

**EFFECTS OF ROOIBOS (ASPALATHUS LINEARIS) ON THE TESTICULAR PARENCHYMA OF ADULT BALB/C MICE SUBMITTED TO A HYPERCALORIC DIET**

Journal:	<i>Brazilian Archives of Biology and Technology</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Keyword:	reproduction, obesity, high fat diet, testis, oxidative stress

SCHOLARONE™
Manuscripts