



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Fabiana Araújo de Oliveira

O tratamento com resveratrol atenua alterações metabólicas, espermáticas e testiculares em ratos Wistar adultos alimentados com uma dieta de cafeteria

Rio de Janeiro

2018

Fabiana Araújo de Oliveira

**O tratamento com resveratrol atenua alterações metabólicas, espermáticas e testiculares em
ratos Wistar adultos alimentados com uma dieta de cafeteria**

Orientadora: Profa. Dra. Bianca Martins Gregório

Rio de Janeiro

2018

Fabiana Araújo de Oliveira

O tratamento com resveratrol atenua alterações metabólicas, espermáticas e testiculares em ratos Wistar adultos alimentados com uma dieta de cafeteria

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

Orientadora: Profa. Dra. Bianca Martins Gregório

Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Prof. Dr. Fernanda Amorim de Moraes Nascimento

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Dr. Isabele Bringhenti Sarmiento

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

À meu irmão Flávio, que enquanto esteve entre nós, nos alimentou com seu amor. Dedico esse trabalho ao meu irmão, que me deu o maior exemplo de força, para enfrentar os obstáculos da vida e serenidade para suportar o que não podemos mudar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser a base para que eu possa realizar tudo em minha vida.

Depois, não tenho palavras pra agradecer minha mãe, que tanto amo, minha maior incentivadora e a quem eu devo tudo o que sou e o que fiz até aqui.

A toda minha família por sempre se fazerem presentes me apoiando.

A minha querida orientadora, por me auxiliar na realização, orientando e aconselhando sempre que necessário.

Ao meu Professor da graduação, Jorge Luiz Medeiros Jr. que contribuiu imensamente para minha formação tanto na sala de aula, quanto fora dela e foi quem me apresentou à Unidade de Pesquisa Urogenital.

As amigas e conselheiras Pamella Campos e Carina Ribeiro, que tanto me ajudaram para que esse trabalho pudesse ter sido realizado.

A Priscila Rodrigues e Leonardo Matta que dividiram comigo parte desse trabalho, na fase inicial de biotério, sem eles esse trabalho não teria sido realizado. E ainda extendo meu agradecimento a Priscila que enquanto técnica, me auxiliou também em parte da metodologia.

A técnica Aline Penna que me auxiliou em algumas técnicas da minha metodologia.

Aos meus colegas de laboratório Angelo Fernandes, Edilaine Alves, Aline Souza, Gabriela Gonçalves, Rômulo Ferreira que se tornaram verdadeiros amigos nesses cinco anos de convivência.

Ao Prof Waldemar por ter me recebido na Unidade de Pesquisa Urogenital e orientado em inúmeras situações, todo meu respeito, carinho e admiração.

Ao Prof Diogo que contribuiu direta ou indiretamente para a confecção desse trabalho.

Ao Prof Francisco Sampaio pela oportunidade de fazer parte do curso de Pós graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

Viva como se fosse morrer amanhã. Aprenda como se fosse viver para sempre.

Mahatma Gandhi

RESUMO

DE OLIVEIRA, Fabiana Araújo. *O tratamento com resveratrol atenua alterações metabólicas, espermáticas e testiculares em ratos Wistar adultos alimentados com uma dieta de cafeteria*. 2018. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A associação entre a dieta da cafeteria, o estresse oxidativo e a redução da função reprodutiva masculina tem sido documentada. O uso de antioxidantes pode ser empregado para neutralizar os radicais livres e minimizar o dano causado aos testículos pela dieta de cafeteria. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da administração de resveratrol sobre os parâmetros metabólicos, espermáticos e testiculares de ratos alimentados com dieta de cafeteria. Ratos Wistar machos foram divididos ao desmame em dois grupos experimentais: grupo controle (C; n = 20) e cafeteria (CAF, n = 16). Aos 3 meses, metade deles foi tratada diariamente com resveratrol (C-R, n = 10; CAF-R, n = 8) a uma dosagem de 30 mg / kg de massa corporal durante um período de 2 meses. A dieta CAF foi confeccionada no laboratório a partir dos seguintes componentes: ração comercial (60 g / 100 g), leite condensado (25 g / 100 g) e gordura vegetal hidrogenada (15 g / 100 g), totalizando 550 kcal / 100 g. Os animais foram sacrificados aos 5 meses de idade. Foram avaliados dados biométricos (ingestão alimentar, massa corporal, pressão arterial sistólica) e parâmetros metabólicos (glicemia de jejum, teste de tolerância oral à glicose). Na eutanásia, o sangue foi coletado para análises posteriores. Os espermatozoides foram coletados da cauda do epidídimo para avaliar parâmetros espermáticos (viabilidade, motilidade e concentração) e os testículos foram removidos para análises histomorfométricas. Os dados foram analisados por *One-Way Anova* e $p < 0,05$ foi considerado significativo. Não houve diferenças na ingestão alimentar, no ganho ponderal e na pressão arterial sistólica entre os grupos. A dieta CAF promoveu hiperglicemia ($p < 0,0001$) e o tratamento com resveratrol reverteu esta condição ($p < 0,0001$). Quanto aos espermatozoides, a dieta CAF reduziu a viabilidade e motilidade, enquanto o resveratrol melhorou esses parâmetros ($p < 0,05$). No entanto, não houve diferença na concentração dos espermatozoides entre os grupos. Em relação à morfologia testicular, o diâmetro dos túbulos seminíferos não diferiu entre os grupos. Em contraste, a altura do epitélio seminífero foi reduzida no grupo CAF em comparação com o grupo C ($p = 0,0007$). A proliferação celular das células da linhagem espermatogênica também foi reduzida no grupo CAF em comparação com o grupo C. No entanto, o grupo CAF tratado com resveratrol (CAF-R) mostrou um aumento na taxa de proliferação celular em comparação com o grupo CAF não tratado ($p = 0,0024$). O consumo de dieta estilo cafeteria, embora não tenha modificado a massa corporal, promoveu redistribuição de gordura corporal e hiperglicemia. Além disso, promoveu um remodelamento adverso na morfologia testicular e nos parâmetros espermáticos, que foi atenuado pelo tratamento com resveratrol. Estes dados podem sugerir um efeito protetor deste antioxidante na espermatogênese.

Palavras-chave: Dieta de cafeteria. Testículo. Espermatozoides. Morfologia. Resveratrol.

ABSTRACT

DE OLIVEIRA, Fabiana Araújo. *Resveratrol attenuates metabolic, sperm and testicular changes in adult Wistar rats fed a cafeteria dietary*. 2018. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

The association between the cafeteria diet, oxidative stress and reduced male reproductive function has been well documented. Antioxidants can be used to neutralize free radicals and mitigate the damage done to the testicles by the CAF diet. This study aimed to evaluate the effects of resveratrol administration on the metabolic, sperm and testicular parameters of rats fed a CAF diet. At weaning, male Wistar rats were divided into 2 experimental groups: the control (C; n = 20) and cafeteria (CAF, n = 16) group. At 3 months, half of them were given daily supplementations of resveratrol (C-R, n = 10; CAF-R, n = 8) at a dosage of 30 mg / kg body weight for 2 months. The CAF diet was made in the laboratory from the following components: commercial chow (60 g / 100 g), condensed milk (25 g / 100 g) and hydrogenated fat (15 g / 100 g). The CAF diet provided a total of 550 kcal / 100 g. The animals were sacrificed at 5 months of age. In the animals, biometric data (food intake, body mass, systolic blood pressure) and metabolic parameters (fasting glycemia, oral glucose tolerance test) were evaluated. At euthanasia, the blood was collected for further analysis. Spermatozoa were collected from the tail of the epididymis to evaluate sperm parameters (viability, motility and concentration) and the testes were removed for histomorphometric analysis. Data were analyzed by one-way ANOVA, and $p < 0.05$ was considered significant. There were no differences in dietary intake, weight gain and systolic blood pressure among the groups. The CAF diet promoted hyperglycemia ($p < 0.0001$), and treatment with resveratrol reversed this condition ($p < 0.0001$). As for the sperm, the CAF diet reduced viability and motility, while resveratrol improved these parameters ($p < 0.05$). However there was no difference in sperm concentration among the groups. Regarding testicular morphology, the diameter of the seminiferous tubules did not differ among the groups. In contrast, the height of the seminiferous epithelium was reduced in the CAF group compared to that of the C group ($p = 0.0007$). Spermatogenic cell proliferation was also reduced in the CAF group compared to that of the C group. However, the resveratrol-treated CAF group (CAF-R) showed an increase in the cell proliferation rate compared that of the untreated CAF group ($p = 0.0024$). Although it did not modify body mass, the consumption of a CAF diet promoted hyperglycemia, adverse testicular morphology remodeling and abnormal sperm parameters, which were attenuated by treatment with resveratrol. These data may suggest a protective effect of this antioxidant on spermatogenesis.

Keywords: Cafeteria diet. Testis. Spermatozoids. Morphology. Resveratrol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Corte longitudinal do testículo representado em desenho esquemático....	17
Figura 2 –	Fotomicrografia do corte transversal do túbulo seminífero de rato.....	18
Figura 3 –	Desenho esquemático das etapas da espermatogênese.....	19
Figura 4 –	Modelo experimental.....	23
Figura 5 –	Utilização do software Image J para determinar o diâmetro dos túbulos seminíferos do testículo de rato.....	30
Figura 6 –	Utilização do software Image J para determinar a altura do epitélio seminífero do testículo de rato.....	31
Figura 7 –	Utilização do software Image J para contagem das células imunomarcadas dos túbulos seminíferos do testículo de rato.....	32
Figura 8 –	Utilização do software Image J para determinar a área dos túbulos seminíferos do testículo de rato.....	33
Figura 9 –	Utilização do software Image J para determinar as densidades das estruturas do compartimento tubular e intertubular do testículo de rato.....	34
Figura 10 –	Ingestão alimentar dos diferentes grupos experimentais aos 5 meses de idade.....	36
Figura 11 –	Ingestão alimentar em energia (Kcal) dos diferentes grupos experimentais aos 5 meses de idade.....	37
Figura 12 –	Ganho ponderal dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	37
Figura 13 –	PAS antes do tratamento com resveratrol (gráfico A) e PAS ao final do experimento (gráfico B) nos diferentes grupos experimentais.....	38
Figura 14 –	Área sob a curva de glicose aos 3 (gráfico A) e 5 meses de idade (gráfico B) dos diferentes grupos experimentais.....	39
Figura 15 –	Viabilidade dos espermatozóides dos diferentes grupos experimentais....	42
Figura 16 –	Motilidade dos espermatozóides dos diferentes grupos experimentais....	43
Figura 17 –	Concentração dos espermatozóides dos diferentes grupos experimentais	43
Figura 18 –	Diâmetro dos túbulos seminíferos dos diferentes grupos experimentais..	44
Figura 19 –	Altura do epitélio seminífero dos diferentes grupos experimentais.....	45
Figura 20 –	Imunomarcagem das células em proliferação celular nos túbulos	

seminiferos dos diferentes grupos.....	46
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição nutricional das dietas experimentais (g/100g).....	24
Tabela 2 – Peso dos depósitos de gordura dos diferentes grupos experimentais aos 5 meses de idade.....	40
Tabela 3 – Bioquímica sérica dos diferentes grupos experimentais aos 5 meses de idade.....	41
Tabela 4 – Peso e volume dos testículos dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	41
Tabela 5 – Análises dos espermatozoides, morfometria e estereologia do testículo dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAF	Cafeteria
CAF-C	Dieta de cafeteria sem tratamento com resveratrol
CAF-R	Dieta de cafeteria tratada com resveratrol
C-C	Dieta controle sem tratamento com resveratrol
C-R	Dieta controle tratada com resveratrol
CT	Colesterol Total
EO	Estresse Oxidativo
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HF	High fat
ON	Óxido nítrico
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PBS	Solução tampão fosfato-salino
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
TAG	Triacilglicerol
TOTG	Teste Oral de Tolerância à Glicose
Va	Volume absoluto
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
Vv	Densidade volumétrica

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
Kg	Quilograma
m ²	Metro quadrado
α	Alfa
$\pm$	Mais ou menos
mg	Miligrama
mm	Milimetro
g	Grama
Kcal	Kilocaloria
KJ	Kilojoule
°C	Graus centígrados
pH	Potencial de hidrogênio
+	Mais
X	Multiplicação
=	Igual
rpm	Rotações por minuto
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
x	Aumento da objetiva
<	Menor que
mmHg	Milimetro de mercúrio
dL	Decilitro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	15
1	OBJETIVOS.....	21
1.1	Geral.....	21
1.2	Específicos.....	21
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
2.1	Grupos experimentais e tratamento com resveratrol.....	22
2.2	Dietas experimentais, ingestão alimentar e biometria.....	23
2.3	Pressão arterial sistólica.....	24
2.4	Teste oral de tolerância a glicose.....	24
2.5	Eutanásia.....	25
2.6	Bioquímica sérica.....	25
2.7	Análise dos espermatozóides.....	26
2.7.1	<u>Viabilidade.....</u>	26
2.7.2	<u>Motilidade.....</u>	27
2.7.3	<u>Concentração.....</u>	27
2.8	Testículo: estrutura e quantificação.....	28
2.8.1	<u>Análises histológicas.....</u>	28
2.8.2	<u>Imunohistoquímica.....</u>	28
2.8.3	<u>Análises morfométricas.....</u>	29
2.9	Análise estatística.....	35
3	RESULTADOS.....	36
3.1	Ingestão alimentar e Ganho ponderal.....	36
3.2	Pressão arterial sistólica.....	38
3.3	Teste oral de tolerância a glicose.....	38
3.4	Massa dos depósitos de gordura.....	39
3.5	Bioquímica sérica.....	40
3.6	Parâmetros espermáticos e testiculares.....	41
3.6.1	<u>Peso e volume dos testículos.....</u>	41
3.6.2	<u>Análise dos espermatozoides.....</u>	42
3.6.3	<u>Morfometria e estereologia do testículo.....</u>	44
3.6.3.1	<u>Diâmetro e Altura do epitélio dos túbulos seminíferos.....</u>	44

3.6.3.2	Proliferação celular.....	45
3.6.3.3	Densidade volumétrica e volume absoluto das estruturas testiculares.....	46
4	DISCUSSÃO	49
	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXO A – Aprovação pela Comissão de ética para o cuidado e uso de animais experimentais.....	63
	ANEXO B – Artigo elaborado da dissertação e aceito pelo Asian Journal of Andrology.....	64

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, demonstrou-se uma tendência global à deterioração significativa na função reprodutiva masculina [1]. A infertilidade é um grande problema para a reprodução humana, e a infertilidade masculina representa cerca de 50% dos casos [2,3]. Tal fato tem sido amplamente correlacionado com a mudança dos hábitos alimentares. Nas últimas décadas ocorreram mudanças nos padrões alimentares da população mundial, as quais são associadas ao desenvolvimento das doenças crônicas [4,5,6].

A dieta ocidental, devido a sua natureza predominantemente processada, é cada vez mais barata e de fácil acesso em consequência da industrialização e da globalização. Ademais, as evidências validando os prejuízos à saúde advindos do consumo de dietas ocidentais são crescentes [7,8]. O papel da variabilidade nutricional na palatabilidade alimentar é bem compreendido pela indústria alimentícia. A combinação de altos níveis de gordura com açúcar resulta em maior palatabilidade [9]. O equivalente mais próximo da dieta alimentar ultraprocessada humana é a dieta de Cafeteria (CAF) que fornece aos animais alimentos variados adquiridos em supermercados, de alta densidade energética e altamente palatáveis, espelhando as principais características obesogênicas da dieta humana [10,11]. Esse padrão alimentar associado ao sedentarismo se relaciona positivamente com o sobrepeso/obesidade. Em longo prazo, a ingestão de dieta CAF vem sendo associada à síndrome metabólica (SM) [12], à um estado pré-diabético e ao acúmulo de lípidos no pâncreas [13], bem como níveis aumentados de prostaglandina E2 na próstata, rim e testículos de ratos que podem promover a inflamação dos tecidos [14].

O tecido adiposo é considerado um tecido metabolicamente ativo por secretar diversas citocinas que agem sistemicamente. Porém já foi bem descrito que conforme o tecido adiposo aumenta, ocorre uma mudança no perfil de citocinas secretadas pelos adipócitos, havendo aumento de citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), o que contribui para a instauração de uma inflamação sistêmica de baixo grau [15]. Outro importante acontecimento é a infiltração de macrófagos no tecido adiposo, considerados como componentes críticos da inflamação associada à obesidade [16]. Esta inflamação é associada com a SM, tendo a resistência à insulina (RI) como um ponto chave ligando a gordura abdominal ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas como o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) [16, 17]. Além disso, o tecido adiposo abdominal é capaz de afetar a função testicular através das suas secreções endócrinas na corrente sangüínea, com a

liberação de adipocinas, tais como a Leptina [18]. Aponta-se que o aumento do ganho ponderal pode interferir negativamente no sistema reprodutor masculino afetando a fertilidade por promover distúrbios na espermatogênese [19] e reduzir os níveis séricos de testosterona [20, 21].

Estudos em animais [22-26] e humanos [27-30] indicam que a associação entre obesidade e dietas hiperlipídicas resultam na perda da capacidade reprodutiva, afetando negativamente em nível molecular e estrutural os espermatozóides, bem como a saúde dos pacientes, fetos e descendentes subsequentes [22–31]. Em animais, a fisiologia testicular é sensível a alterações metabólicas sistêmicas e o metabolismo testicular pode ser perturbado por dietas hiperenergéticas [26]. O rompimento do metabolismo testicular está associado à diminuição da qualidade espermática [31]. Alguns componentes de dietas hiperenergéticas, como ácidos graxos trans e gorduras saturadas, têm o potencial de afetar adversamente o metabolismo lipídico testicular e prejudicar a produção de espermatozóides. Além disso, níveis elevados de colesterol plasmático induzido por uma dieta rica em colesterol afetam negativamente a espermatogênese em coelhos [25].

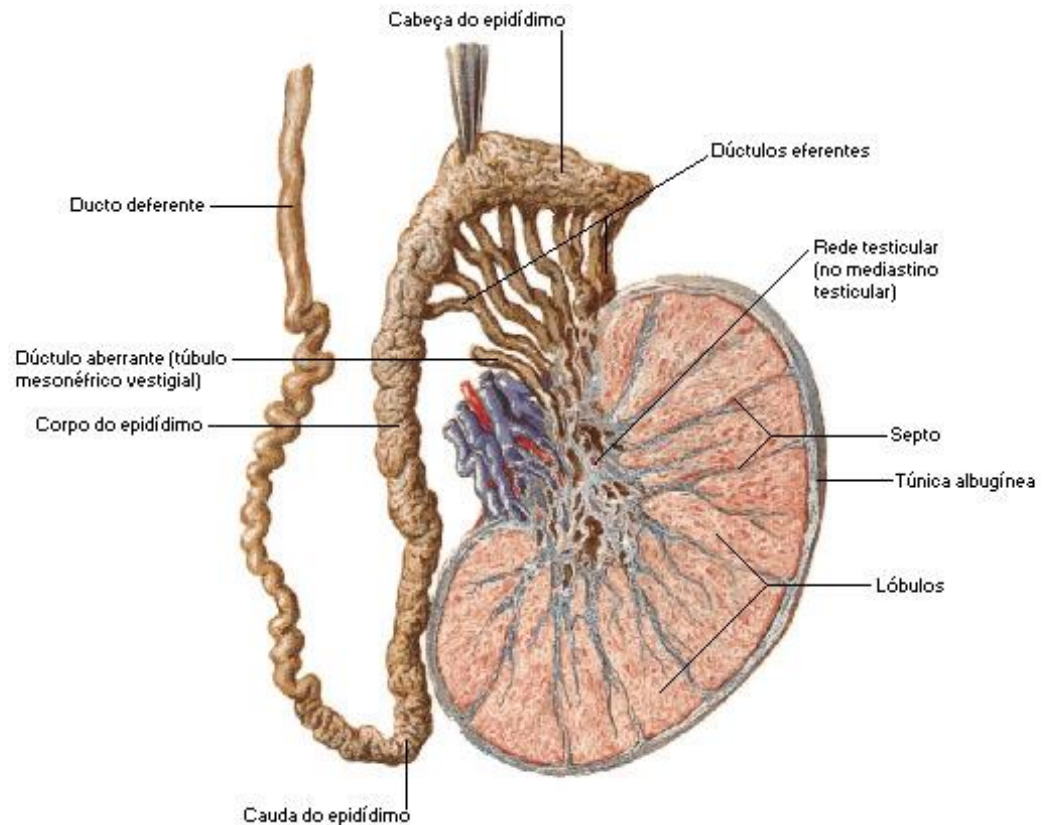
Anatomicamente, os testículos estão localizados no escroto e são envoltos por uma cápsula de natureza conjuntiva denominada de túnica albugínea. É um órgão com função exócrina (produtor e transportador dos espermatozóides) e função endócrina relacionada com a produção de hormônios esteroides, principalmente andrógenos, como a testosterona o principal hormônio sexual masculino [32].

Do ponto de vista histológico, o testículo humano é subdividido em dois compartimentos: tubular, que desempenha funções endócrinas e exócrinas, e compartimento intertubular, que possui função endócrina, de sustentação e nutrição do órgão. O compartimento tubular representa de 70 a 90% do parênquima testicular dos mamíferos sendo composto pelos túbulos seminíferos – estruturas formadas por epitélio seminífero e lúmen (conjunto de túbulos onde se encontram as células germinativas em diferentes estágios de diferenciação) - e células de Sertoli, que regulam a espermatogênese e desempenham diversas funções na produção espermática [33,34]. O compartimento intertubular preenche os espaços entre os túbulos seminíferos e é composto principalmente pelas células de Leydig, além dos vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população variável celular composta principalmente por fibroblastos, macrófagos e linfócitos [32,34].

Similarmente ao testículo do homem, o testículo do rato possui formato oval, porém são maiores proporcionalmente em comparação ao do homem em relação ao tamanho corporal

[33,37]. Porém a despeito dessa diferença o rato é muito utilizado como modelo experimental em diversos trabalhos para avaliação testicular [26,31] (Figura 1).

Figura 1 – Corte longitudinal do testículo humano representado em desenho esquemático



Fonte: NETTER FH, 2011.

A espermatogênese inicia-se com as espermatogônias (células diplóides), alinhando-se nos túbulos seminíferos nas porções mais basais. Após sucessivos processos de mitose tornam-se espermatócitos primários (também células diplóides). Estes passam pela meiose I e originam os espermatócitos secundários (células haplóides), que passam pela meiose II formando as espermátides (células haplóides). No estágio final chamado de espermiogênese, cada espermátide se transforma em um espermatozóide (células haplóides) (Figuras 2 e 3). Este processo é estimulado pelo hormônio folículo estimulante (FSH) e testosterona [32,34].

Figura 2 – Fotomicrografia do corte transversal do túbulo seminífero de rato

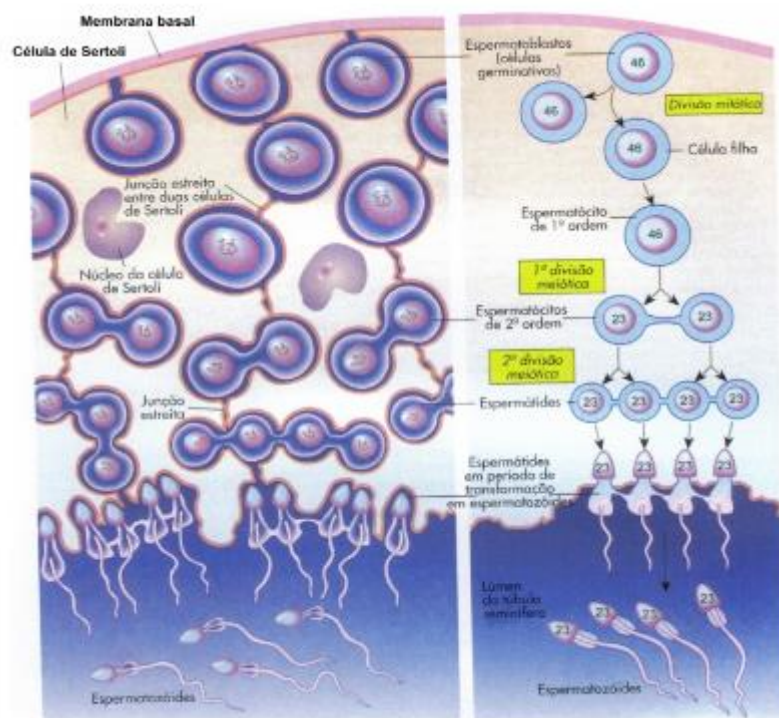


Legenda: Células da linhagem espermatogênica: a – célula de sertoli, b – espermatogônia, c – espermatócito primário, d – espermátide e e – espermatozóide.

Nota: Coloração de Hematoxilina e Eosina, 1000x.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 3 – Desenho esquemático das etapas da espermatogênese



Fonte: SEELEY et al, 1997.

Sabe-se que a adiposidade está relacionada ao estresse oxidativo (EO), e este, exerce efeitos negativos na função espermática. Quantidades excessivas de espécies reativas de oxigênio (EROs) causam um efeito deletério sobre o DNA dos espermatozoides, levando à formação de 8-oxodeoxiguanosina, o principal produto oxidativo do DNA do espermatozoide (que causa fragmentação e mutação) [38-40]. Para manter a função celular normal, o excesso de EROs deve ser continuamente inativado por antioxidantes. O uso de antioxidantes pode suprimir a formação de novas EROs e remover o seu excesso, prevenindo o EO [41,42]. Além disso, o consumo excessivo de dietas hiperenergéticas, ricas em ácidos graxos saturados e gorduras trans, pode resultar no acúmulo de ácidos graxos e produtos gordurosos tóxicos no ambiente testicular, dentro dos espermatozoides, levando a espermatogênese prejudicada e baixa síntese de testosterona pelas células de Leydig [5].

O resveratrol (3,5,4'- triidroxi-trans-estilbeno) é um polifenol natural, flavonóide, presente em mais de 70 variedades de plantas, incluindo alguns componentes da dieta humana sendo encontrado principalmente em uvas de casca vermelha, vinho tinto e amendoim [43-45]. Suas principais atividades são antioxidante [46], antiinflamatória [47], quimiopreventiva [48], cardioprotetora e anti-apoptótica [49]. Ademais, recentemente mostrou efeitos benéficos sobre doenças metabólicas, tais como diabetes e obesidade [50,51,52].

O mecanismo pelo qual o resveratrol exerce seus efeitos anti-inflamatório e anti-oxidativo baseia-se na produção de óxido nítrico (ON), na regulação da produção antioxidante endógena e na modulação de citocinas inflamatórias e quimiocinas [53,54]. Da mesma forma, o resveratrol é um potente eliminador de radicais livres. A alta eficiência do resveratrol pode ser devido aos três grupos hidroxila em sua estrutura. Assim, o uso do resveratrol como suplemento dietético promotor da saúde está aumentando consideravelmente [55]. O uso do resveratrol mostrou ser capaz de reduzir a inflamação do tecido adiposo [51] e simular os efeitos de uma restrição energética agindo no tecido adiposo e melhorando o perfil metabólico [56,57].

Embora os efeitos e as vias pelas quais o resveratrol age sobre o sistema reprodutor masculino ainda estejam obscuras, nos últimos anos, mostrou-se que o resveratrol protege os espermatócitos contra a peroxidação lipídica, além de aumentar a concentração e a motilidade dos espermatozóides [58]. Também foi relatado que o resveratrol aumenta a produção de espermatozóides e diminui a apoptose de células germinativas [59]. Yulug et al. (2014) relataram o potencial efeito protetor do resveratrol contra os danos causados pela alta produção de EROs na isquemia testicular, mostrando que a administração aguda de resveratrol reduziu a apoptose no epitélio seminífero de ratos [60]. Ribeiro et. al. (2014) mostraram que uso do resveratrol melhorou parâmetros de fertilidade, como potência e fecundidade e a morfologia testicular em animais que sofreram torção testicular [61]. Mendes et al. (2016) observaram uma redução da apoptose nos testículos e uma melhora dos parâmetros qualitativos espermáticos em ratos varicocelizados tratados com resveratrol [62]. Simas et al. (2017) mostraram que o tratamento com Resveratrol melhorou o nível glicêmico, os parâmetros quantitativos e qualitativos dos espermatozoides e o perfil hormonal em ratos com diabetes tipo 1 induzido [63]. Embora os efeitos e as vias nas quais o resveratrol age sobre o sistema reprodutor masculino ainda estejam obscuras, suspeita-se que ele atue aumentando a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, melhorando, portanto, a espermatogênese, aumentando os níveis séricos de testosterona e reduzindo a apoptose das células germinativas [64-66].

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Analisar o efeito da administração em longo prazo do resveratrol sobre os parâmetros metabólicos, espermáticos e testiculares de ratos Wistar alimentados com dieta de cafeteria.

1.2 Específicos

- a) Analisar as possíveis alterações metabólicas decorrentes da dieta estilo cafeteria e se o tratamento com resveratrol é capaz de promover efeitos benéficos.
- b) Estudar a motilidade, a concentração e a viabilidade dos espermatozóides, assim como a morfologia dos testículos dos ratos alimentados com dieta controle ou de cafeteria e tratados ou não com resveratrol.
- c) Verificar a densidade de proliferação celular nos túbulos seminíferos dos testículos dos ratos alimentados com dieta controle ou de cafeteria e tratados ou não com resveratrol.
- d) Avaliar por ensaio imunoenzimático (ELISA), as possíveis alterações sobre os níveis séricos de testosterona e insulina.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido na Unidade de Pesquisa Urogenital, Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). O projeto de pesquisa foi aprovado sob o número de protocolo 049/16 pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso com Animais (CEUA) do IBRAG da UERJ.

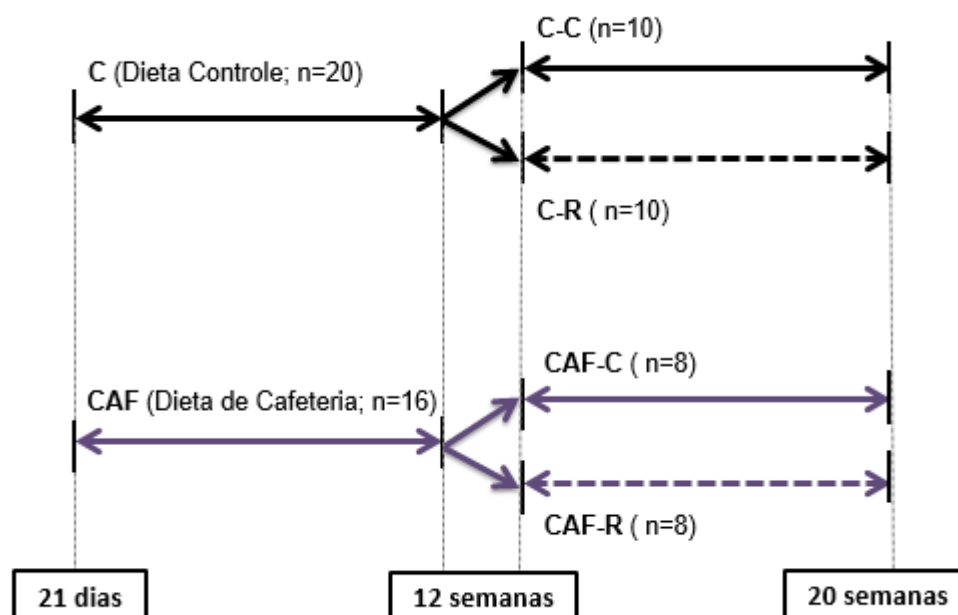
2.1 Grupos experimentais e tratamento com resveratrol

Foram utilizados 36 ratos Wistar machos provenientes da colônia da Unidade de Pesquisa Urogenital. No biotério, os animais foram alocados em caixas de polipropileno, em ambiente apropriado com temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade controladas ($60\pm 10\%$) e ciclo de luz (12-12h claro/escuro).

Os animais foram divididos ao desmame (21 dias de idade) em dois grupos experimentais: dieta controle (C; $n=20$) e dieta de cafeteria (CAF; $n=16$), mantendo-se com este padrão até o início do tratamento com resveratrol aos 3 meses de idade (12 semanas). Nesse momento, os grupos foram novamente divididos, formando 4 grupos experimentais: dieta controle sem tratamento com resveratrol (C-C; $n=10$), dieta de cafeteria sem tratamento com resveratrol (CAF-C; $n=8$), dieta controle tratado com resveratrol (C-R; $n=10$) e dieta de cafeteria tratado com resveratrol (CAF-R; $n=8$), conforme ilustrado na figura 3.

A administração do resveratrol (Terraternal[®] 99% de pureza, Santa Clara, CA, USA) foi feita diariamente por meio de gavagem orogástrica, na dosagem 30 mg/Kg de massa corporal [59], por um período de 2 meses. O resveratrol foi diluído em água, padronizando a concentração de 10 mg/mL, por possuir solubilidade média em água. A solução foi mantida em constante agitação em um agitador modelo C-MAG HS 7 S1 (IKA[®], Campinas, São Paulo, Brasil) para evitar que o mesmo precipitasse e se depositasse no fundo do recipiente. De forma similar, os grupos não tratados receberam água, também por meio de gavagem orogástrica, a fim de simular o estresse sofrido pelos animais dos grupos tratados. Os animais receberam dieta e água *ad libitum* diariamente.

Figura 4 – Desenho Experimental



Legenda: Grupo C-C (dieta controle sem tratamento com resveratrol), CAF-C (dieta de cafeteria sem tratamento com resveratrol), C-R (dieta controle tratado com resveratrol) e CAF-R (dieta de cafeteria tratado com resveratrol).

Fonte: A autora, 2018

2.2 Dietas experimentais, ingestão alimentar e biometria

Para os grupos que receberam a dieta controle, ofertamos ração comercial (Nuvilab[®]) 430kcal/100g. A dieta CAF foi manipulada no laboratório, tendo como constituintes: ração comercial 60g/100g, leite condensado (Nestle[®]) 25g/100g e gordura vegetal hidrogenada (Primor[®]) 15g/100g, totalizando 550kcal/100g. A ingestão alimentar foi registrada diariamente, mediante a subtração entre a quantidade total de ração ofertada e a quantidade restante na caixa. A quantidade restante da dieta CAF, devido ao alto teor lipídico, foi desprezada. A tabela 1 detalha a composição nutricional das dietas experimentais. Ao longo do experimento, a massa corporal dos animais foi mensurada semanalmente, por meio de balança digital (Urano[®] Canoas, Rio Grande do Sul, Brasil).

Tabela 1 – Composição nutricional das dietas experimentais (g/100g)

Componentes	Dieta Controle	Dieta de Cafeteria
Carboidratos	71,0	55,0
Proteínas	23,0	15,0
Lipídios	6,0	30,0
AGS	0 - 9	7 - 1
AGMI	1 - 3	9 - 8
AGPI	3 - 7	5 - 6
AG trans	0 - 1	7 - 5
Energia (kcal)	430,0	550,0
Energia (KJ)	1800,0	2300,0

Legenda: AGS (ácido graxo saturado), AGMI (ácido graxo moniinsaturado), AGPI (ácido graxo poliinsaturado), AG trans (ácido graxo trans).

2.3 Pressão arterial sistólica

A partir dos 3 meses de idade, a pressão arterial sistólica (PAS) foi aferida semanalmente no período noturno, sempre no mesmo horário. Os animais foram aquecidos em uma câmara de acrílico, com temperatura de 37°C durante 10 minutos, para dilatação da artéria caudal. Sequencialmente, eles foram acondicionados em contensores de acrílico e a pressão arterial da cauda do animal foi verificada utilizando o pletismógrafo de cauda versão 2.11 (Insight®, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Foram realizadas 3 medições e o resultado final da PAS foi mensurado a partir da média entre as 3 medidas.

2.4 Teste oral de tolerância a glicose

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foi realizado em dois momentos: antes da administração do resveratrol (aos 3 meses de idade) e após o seu uso (aos 5 meses de idade). Os animais foram submetidos a jejum de 12 horas, com posterior administração de soro glicosado hipertônico (2g/Kg de massa corporal de glicose a 50%), por gavagem orogástrica. O sangue foi coletado da veia caudal dos animais nos tempos 0 (antes da administração de

glicose) e 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração da solução hipertônica de glicose, com glicosímetro apropriado (Accu-Chek[®], Roche, São Paulo, SP, Brasil).

2.5 Eutanásia

Aos 5 meses de idade (20 semanas), os animais foram mortos por sobredose anestésica (administração intraperitoneal de Tiopental[®]) na dose de 100 mg/Kg, após sofrerem jejum de 12 horas. Durante a eutanásia, o tórax dos animais foi aberto e o sangue foi coletado por punção cardíaca diretamente do átrio direito. Após a coleta, ele foi imediatamente centrifugado e armazenado à -20°C para posteriores análises séricas. Em seguida, os espermatozoides foram coletados diretamente da cauda do epidídimo para análises posteriores. Após, os testículos e os depósitos de gordura epididimária, retroperitoneal e subcutânea foram dissecados. Os depósitos de gordura foram pesados separadamente e fixados em formaldeído a 4% em tampão fosfato (pH 7,2). Quanto aos testículos, o volume (mL) foi determinado pelo método de Sherle [67] e a massa (g) foi obtida por meio de balança digital (Urano[®] Canoas, Rio Grande do Sul, Brasil). Na sequência, o polo superior do órgão foi removido e a porção remanescente do testículo foi imediatamente fixada em solução de bouin por 24 horas. Após esse período, o material foi clivado e imerso em fixador para microscopia de luz (formaldeído a 4% em tampão fosfato pH 7,2) durante 48 horas.

2.6 Bioquímica sérica

O soro foi separado por centrifugação (3000 rpm, por 8 min), à temperatura ambiente e armazenado a -20°C até a realização das análises bioquímicas. As concentrações de glicose, triacilglicerol (TAG), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de alta densidade (HDL), colesterol total (CT) e glicose foram determinadas por método colorimétrico (espectrofotometria) a partir de kit comercialmente disponível (BioSystems[®] - Cat. 11506 – Barcelona, Espanha).

A dosagem sérica de insulina foi analisada pelo método de ELISA a partir do kit comercialmente disponível: insulina para ratos/camundongos (Millipore[®] - Cat. EZRMI-13K

– St Charles, Missouri, EUA). As amostras foram analisadas em duplicata, com um coeficiente de variação de 1,4%. Igualmente, a dosagem sérica de testosterona foi obtida pelo mesmo método, a partir de kit comercialmente disponível (Cloud-clone corp.[®] - Cat. CEA458Ge – Wuhan, China).

2.7 Análise dos espermatozóides

Durante a eutanásia, a cauda do epidídimo foi dissecada e clivada três vezes para a retirada dos espermatozóides. Em seguida, ela foi imersa em 5 mL de solução tampão fosfato-salino (PBS) com 0,5% de albumina de soro bovino (A9647, *Albmin from bovine serum*, Sigma[®], Frederick, EUA) a 37°C. Na sequência, a solução contendo a cauda do epidídimo foi cuidadosamente agitada para disseminação dos espermatozóides do órgão para o meio líquido. A solução resultante, chamada de solução espermática foi então utilizada para todas as análises dos espermatozóides. Todo material utilizado nas análises foi mantido à 37°C para conservação dos espermatozóides [61].

2.7.1 Viabilidade

A viabilidade dos espermatozóides foi avaliada à partir do teste hipo-osmótico que avalia a integridade e o funcionamento da membrana plasmática desta célula [68]. A solução espermática foi diluída (1:5) em uma solução à base de água, contendo citrato de sódio a 0,735% e frutose a 1,351% com osmolaridade de 100 mOsm/L, sendo inferior à osmolaridade do meio intracelular e consequentemente classificada como hipo-osmótica. Os espermatozóides foram mantidos nesta solução por 30 minutos à 37°C. Em seguida, foram retirados 10 µL da solução, depositados sobre lâmina histológica e cobertos por lamínula. Esta parte foi observada por microscopia de luz com aumento de 200x em microscópio BH-2 (Olympus[®], Tóquio, Japão). Os espermatozóides que apresentaram dobramento da cauda foram considerados viáveis. Esta alteração morfológica é observada somente em espermatozóides com membrana plasmática íntegra e funcional em consequência da entrada

de líquido para o meio intra-celular. Este dado foi expresso pela porcentagem de células com dobramento de cauda em relação ao número total de células analisadas.

2.7.2 Motilidade

Utilizamos 100 µl da solução espermática, previamente diluída (entre 1 a 5 vezes) de acordo com a sua turbidez, afim de facilitar a contagem dos espermatozóides. Em seguida, 10 µL foram coletados desta solução e depositados sobre uma câmara de Neubauer espelhada, coberta por lamínula. Esta amostra foi visualizada em contraste de fase e gravada em vídeo por uma câmera Basler (Vision Technologie™®, Ahrensburg, Alemanha) acoplada a um microscópio H550S (Nikon, Tóquio, Japão) sob aumento de 100x. A partir dos vídeos determinou-se a motilidade dos espermatozóides, que foi expressa como porcentagem de espermatozóides em movimento (progressivo ou não). Nos vídeos, o número de células imóveis foi contado, e subtraído do número total de espermatozóides em cada campo. O resultado dessa subtração foi dividido pelo número total de espermatozóides e multiplicado por 100 para determinação da porcentagem de espermatozóides móveis [61].

2.7.3 Concentração

A concentração dos espermatozóides foi determinada a partir dos mesmos arquivos de vídeo usados para determinação da motilidade. Nos arquivos de vídeo foram contados o número de espermatozóides sobre 5 quadrantes da câmara de Neubauer (gravados separadamente em 2 vídeos), perfazendo um volume total de 2×10^{-5} mL. O resultado encontrado foi corrigido para a diluição da solução espermática e convertido em espermatozóides / mL, unidade em que foram expressos os resultados [61, 69].

2.8 Testículo: estrutura e quantificação

2.8.1 Análises histológicas

Os fragmentos testiculares foram desidratados em alcoóis com concentrações crescentes até alcançar o álcool absoluto, diafanizados em xilol e incluídos em paraplast plus® (Sigma-Aldrich C., St.Louis, MO, USA). O material foi seccionado com 5 µm de espessura (com intervalos de 20 µm entre os cortes) e corado com hematoxilina-eosina. Para cada análise, foram avaliados 25 campos/animal obtidos de 5 cortes em 2 lâminas histológicas.

2.8.2 Imunohistoquímica

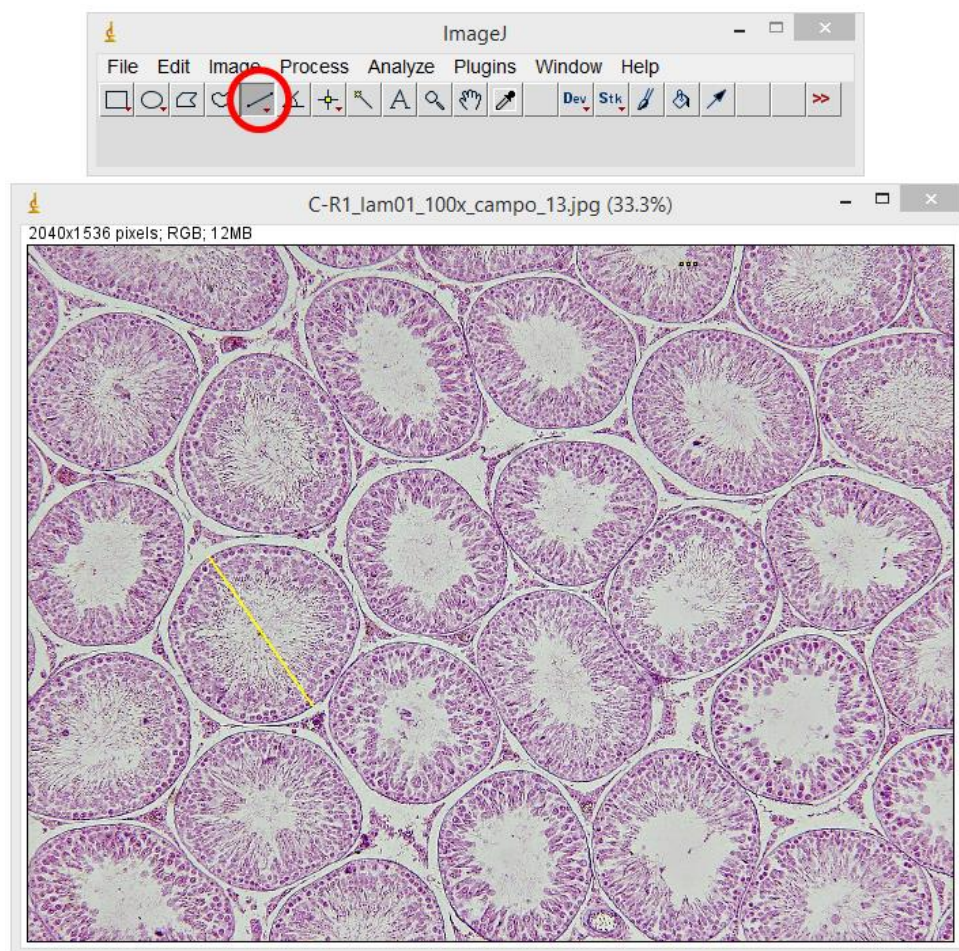
Os cortes foram desparafinados em estufa e xilol, hidratados em uma série decrescente de álcoois e lavados em PBS. Após a desparafinização, a recuperação antigênica dos testículos foi realizada com Tris-EDTA (pH 9,0) por 12 horas (overnight), à 60°C. Afim de evitar ligações inespecíficas foi feita a inibição da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% por 15 minutos, longe da luz, e solução de bloqueio de soro de cabra a 10% por 10 minutos (Kit Invitrogen®, Referência: 859643, Frederick, USA). A seguir, os cortes foram incubados com anticorpo anti-PCNA (PC10, Ref: 180110, Invitrogen®, Camarillo, USA) durante 1h a 37°C (1:100 diluído em tampão PBS/BSA1%). Posteriormente, foi feita a incubação com anticorpo secundário e a reação foi amplificada a partir do sistema biotina-estreptavidina (Kit Invitrogen®, Ref: 859643, Frederick, USA). A imunocoloração foi visualizada após a incubação das secções com 3,3 diaminobenzidina tetraclorato-DAB (Ref: 859643, Invitrogen®, Frederick, USA) e contra-coradas com Hematoxilina de Harris a 50%. Simultaneamente, foram obtidas as lâminas controle negativo (sem a adição do anticorpo primário).

2.8.3 Análises morfométricas

Para a análise morfométrica e quantitativa dos testículos foi utilizado um sistema de vídeo-microscopia com microscópio de luz Olympus BX51 (Tokyo, Japan) acoplado a uma câmara digital (Olympus DP70 - Tokyo, Japan). As imagens foram capturadas com o auxílio do *software Image Proplus*[®], version 5.0 (Media Cybernetics, Silver spring, MD, USA).

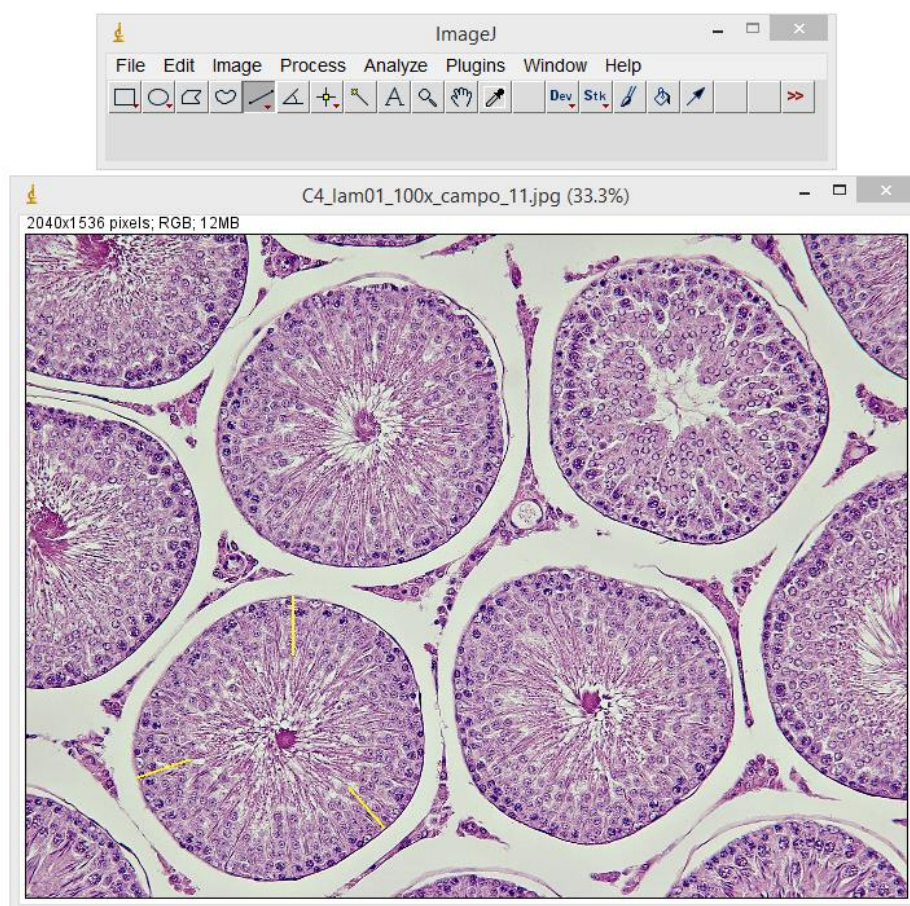
O diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio seminífero foram mensurados utilizando o *software Image J*[®] (ImageProcessingandAnalysis in Java) (Figuras 4 e 5). Após a calibração do sistema, ambas as medidas foram determinadas a partir da ferramenta "*straight line*". Foram mensurados o diâmetro de 125 túbulos seminíferos de cada testículo, capturados de forma aleatória, sendo excluídos os túbulos menos circulares. Uma reta foi traçada em cada secção transversal do túbulo seminífero, sendo essa distância medida. O resultado desta análise foi considerado a média dos 125 diâmetros mensurados de cada testículo. Em relação a altura do epitélio seminífero, três porções equidistantes de cada secção transversal dos túbulos seminíferos foram mensuradas, e se estendiam do início da túnica própria até a célula mais interna em direção ao lúmen do túbulo seminífero, exceto os espermatozóides, sendo a média das três distâncias calculada. As análises morfométricas foram realizadas com um aumento de 100x para o diâmetro dos túbulos seminíferos e um aumento de 200x para a altura do epitélio seminífero. Para cada análise, foram avaliados 25 campos/animal obtidos de 5 cortes em 2 lâminas histológicas.

Figura 5 – Utilização do software Image J para determinar o diâmetro dos túbulos seminíferos do testículo de rato



Legenda: Aplicabilidade da ferramenta “*straight line*” do software Image J, destacada pelo círculo vermelho. Através da reta traçada em amarelo podemos mensurar o diâmetro do túbulo seminífero.
Nota: HE, 100x.
Fonte: A autora, 2018.

Figura 6 – Utilização do software Image J para determinar a altura do epitélio seminífero do testículo de rato



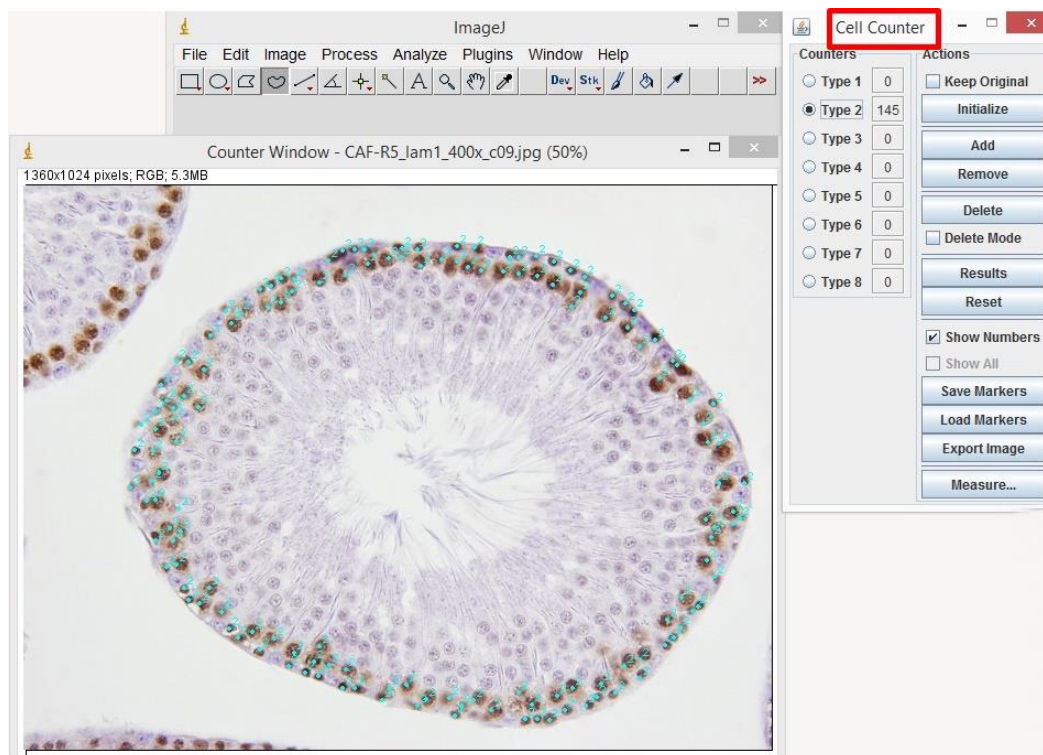
Legenda: As retas em amarelo mostram como foi feita a mensuração da altura do epitélio de um túbulo seminífero.

Nota: HE, 200x.

Fonte: A autora, 2018.

A taxa de proliferação celular foi mensurada com o auxílio das ferramentas “*cell counter*” (figura 6) e “*free hand selections*” (figura 7). Todos os núcleos das células da linhagem espermatogênica imunomarcados com o anticorpo anti-PCNA foram quantificados e tiveram a sua área de localização delimitada. As fotomicrografias foram obtidas utilizando-se o aumento de 400x. Para esta análise, também foram avaliados 125 tubulos/animal, em 25 campos/animal obtidos de 5 cortes em 2 lâminas.

Figura 7 – Utilização do software Image J para contagem das células imunomarcadas dos túbulos seminíferos do testículo de rato

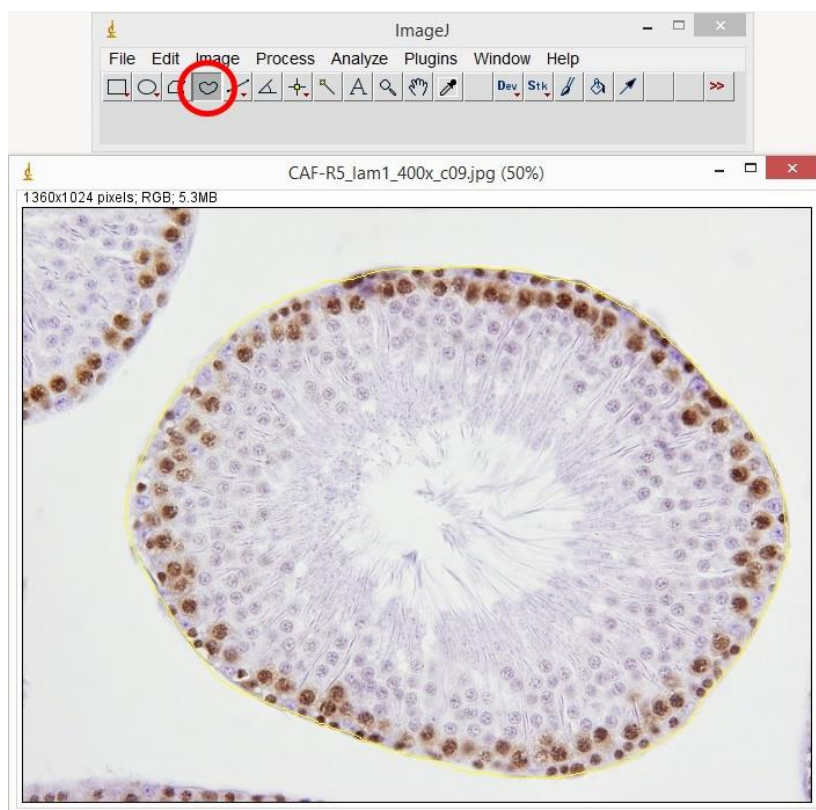


Legenda: Utilização da ferramenta “cell counter” destacada pelo retângulo vermelho.

Nota: Com o auxílio desta ferramenta selecionamos um type para contar as células imunomarcadas na fotomicrografia. Imunomarcção com anti PCNA, 400x.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 8 – Utilização do software Image J para determinar a área dos túbulos seminíferos do testículo de rato



Legenda: Utilização da ferramenta “*freehand selections*” destacada pelo círculo vermelho.

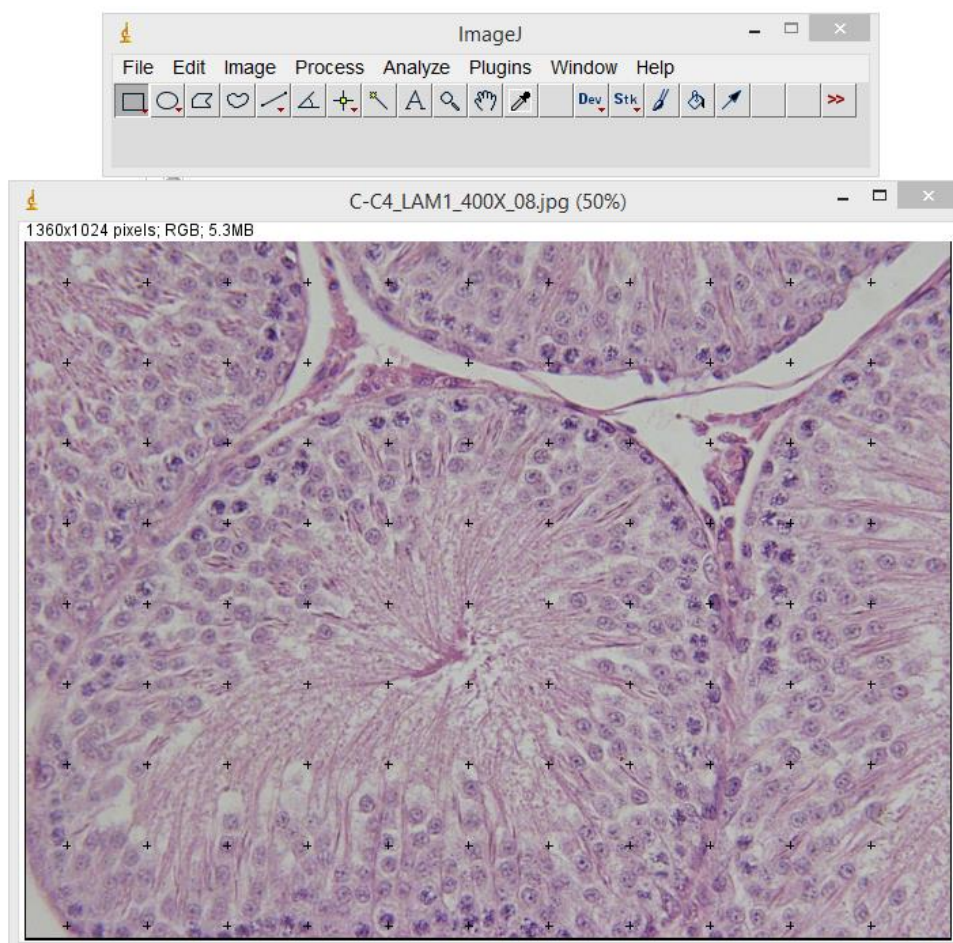
Nota: Com esta ferramenta contorna-se o túbulo seminífero, mostrado pela linha amarela e a partir daí obtém-se a área do mesmo. Imunomarcção com anti PCNA, 400x.

Fonte: A autora, 2018.

A densidade volumétrica (V_v) das estruturas testiculares foi determinada pelo método de contagem de pontos, através da sobreposição de uma grade de 100 pontos às fotomicrografias, usando a ferramenta “*grid*” (Figura 8). Em seguida, com o auxílio da ferramenta “*cell counter*” contamos os pontos da grade, sendo considerados: túnica própria, epitélio seminífero, lúmen tubular (a soma destes três parâmetros foi considerada como o compartimento tubular), espaço intersticial e vasos sanguíneos (estes dois parâmetros juntos foram considerados como compartimento intertubular). A densidade volumétrica do espaço intersticial (compartimento intertubular) foi considerada como o somatório da densidade volumétrica dos vasos sanguíneos e das outras estruturas neste espaço, contadas em conjunto (células de Leydig, fibroblastos, colágeno, etc) [70]. O resultado desta análise foi expresso em porcentagem em relação ao número de pontos. Em cada testículo foram analisados 25 campos/animal. Para cada parâmetro, o resultado de cada estrutura, expresso em porcentagem,

foi calculado pela média dos resultados em cada imagem analisada. Para esta análise, foram utilizadas imagens capturadas sob aumento de 400x.

Figura 9 – Utilização do software Image J para determinar as densidades das estruturas do compartimento tubular e intertubular do testículo de rato



Legenda: As cruzes em preto sobrepostas a fotomicrografia são utilizadas como auxílio para contar as densidades das estruturas do compartimento tubular e intertubular.

Nota: HE, 400x.

Fonte: A autora, 2018.

O Volume absoluto (Va) da túnica própria, epitélio seminífero, lúmen tubular, compartimento tubular, espaço intersticial, vasos sanguíneos e compartimento intertubular foi estimado com base na sua densidade volumétrica e no volume do testículo medido pelo método de Scherle. Para tanto foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Volume de Y} = (V_v[Y] / 100) \times \text{volume testicular} \quad (1)$$

a) Onde: Y é a estrutura analisada.

Como o volume testicular foi expresso em mL, o volume de cada uma das estruturas analisadas também foi expresso nesta mesma unidade [61].

2.9 Análise estatística

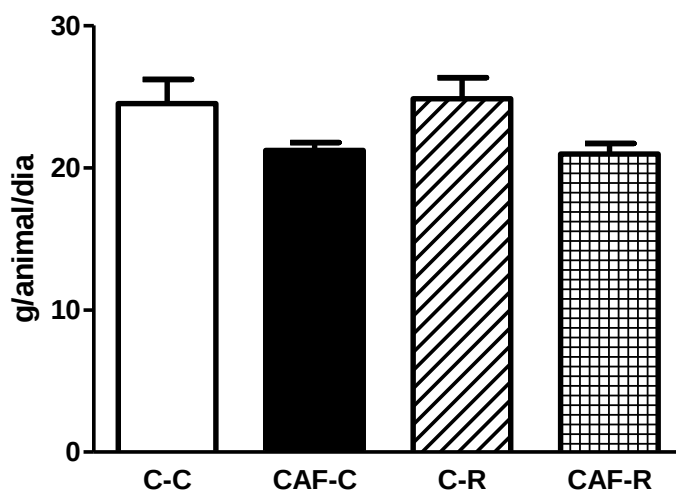
Os parâmetros biométricos foram testados para a curva de normalidade e homocedasticidade das variâncias. As diferenças entre os grupos foram analisadas com teste-t Student e análise de variância “one-way ANOVA” e pós-teste de Bonferroni. Os dados que não seguiram a curva de distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. Em todos os casos foi usado o índice de significância de 0,05 [71]. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa *GraphPad Prism*® versão 5.00 para *Windows* (*GraphPad Software, San Diego, California, USA*).

3 RESULTADOS

3.1 Ingestão alimentar e Ganho ponderal

Não houve diferença na ingestão alimentar entre os grupos estudados, tanto em gramatura C-C ($24,51 \pm 5,35$), CAF-C ($21,22 \pm 1,63$), C-R ($24,86 \pm 4,46$) e CAF-R ($20,96 \pm 2,35$) quanto em energia C-C ($771,99 \pm 169,10$), CAF-C ($965,57 \pm 259,29$), C-R ($783,00 \pm 140,52$) e CAF-R ($953,73 \pm 190,48$) (Figuras 9 e 10, respectivamente). Corroborando com este resultado, os animais não mostraram diferença no ganho ponderal ao longo do experimento C-C ($350,2 \pm 25,72$), CAF-C ($350,4 \pm 39,84$), C-R ($333,7 \pm 27,65$) e CAF-R ($318,9 \pm 49,64$) (Figura 11).

Figura 10 – Ingestão alimentar dos diferentes grupos experimentais aos 5 meses de idade

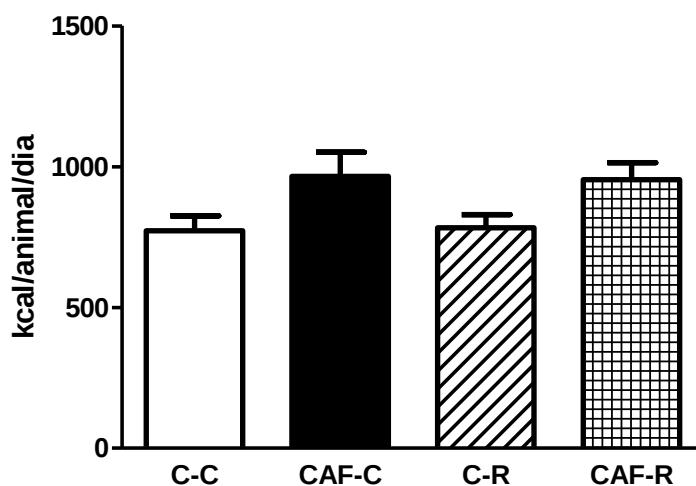


Legenda: C-C (dieta controle sem tratamento com resveratrol), CAF-C (dieta de cafeteria sem tratamento com resveratrol), C-R (dieta controle tratado com resveratrol) e CAF-R (dieta de cafeteria tratado com resveratrol).

Nota: Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças foram testadas por análise de variância (One-Way ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$. Não houve diferença entre os grupos.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 11 – Ingestão alimentar em energia (Kcal) dos diferentes grupos experimentais aos 5 meses de idade

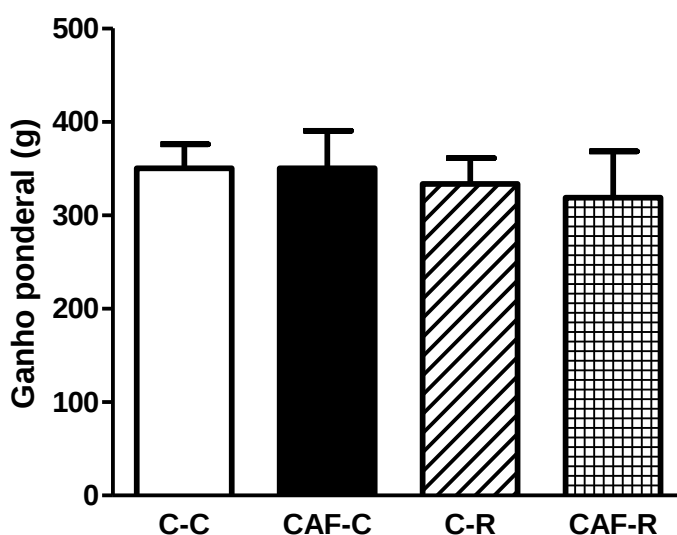


Legenda: C-C (dieta controle sem tratamento com resveratrol), CAF-C (dieta de cafeteria sem tratamento com resveratrol), C-R (dieta controle tratado com resveratrol) e CAF-R (dieta de cafeteria tratado com resveratrol).

Nota: Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças foram testadas por análise de variância (One-Way ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$. Não houve diferença entre os grupos.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 12 – Ganho ponderal dos animais dos diferentes grupos experimentais



Legenda: C-C (dieta controle sem tratamento com resveratrol), CAF-C (dieta de cafeteria sem tratamento com resveratrol), C-R (dieta controle tratado com resveratrol) e CAF-R (dieta de cafeteria tratado com resveratrol).

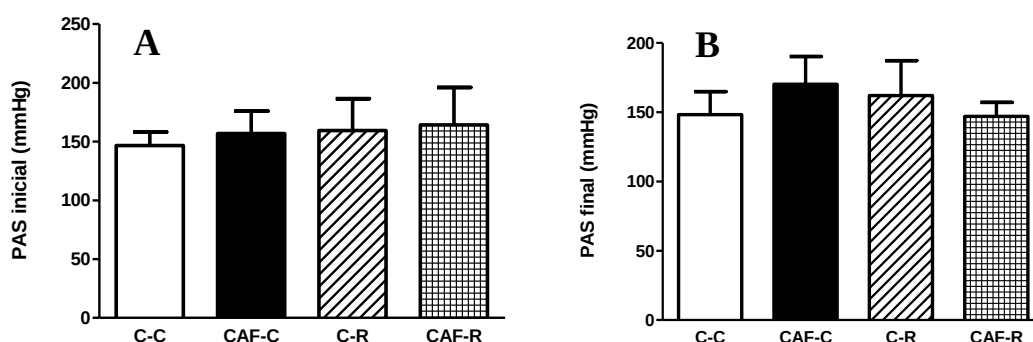
Nota: Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças foram testadas por teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. Não houve diferença entre os grupos.

Fonte: A autora, 2018.

3.2 Pressão arterial sistólica

A PAS, verificada dos 3 aos 5 meses de idade, foi similar entre os diferentes grupos experimentais, no início do experimento C-C ($146,60 \pm 11,66$), CAF-C ($156,80 \pm 19,16$), C-R ($159,50 \pm 27,00$) e CAF-R ($164,10 \pm 31,97$) e ao final do experimento C-C ($148,30 \pm 16,59$), CAF-C ($170,30 \pm 19,97$), C-R ($162,00 \pm 25,16$), CAF-R ($147,00 \pm 10,04$), figuras 12A e 12B.

Figura 13 – PAS antes do tratamento com resveratrol (gráfico A) e PAS ao final do experimento (gráfico B) nos diferentes grupos experimentais



Legenda: C-C (dieta controle sem tratamento com resveratrol), CAF-C (dieta de cafeteria sem tratamento com resveratrol), C-R (dieta controle tratado com resveratrol) e CAF-R (dieta de cafeteria tratado com resveratrol).

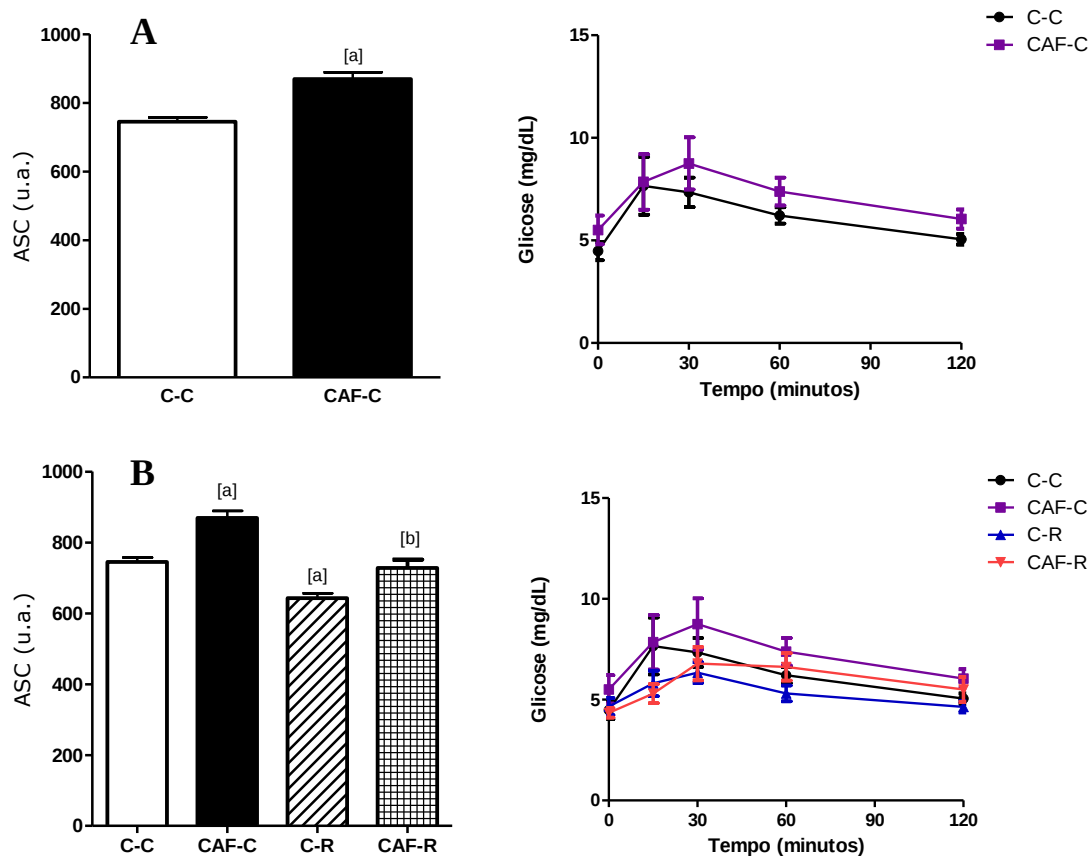
Nota: Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças foram testadas por análise de variância (One-Way ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$. Não houve diferença entre os grupos.

Fonte: A autora, 2018.

3.3 Teste oral de tolerância a glicose

A dieta de cafeteria promoveu intolerância à glicose aos 3 meses de idade (Figura 13A), antes do início do tratamento com resveratrol. O grupo CAF-C mostrou um aumento de 17% na área sob a curva de glicose quando comparado ao grupo C-C ($p < 0,0001$). Diferentemente deste padrão, o tratamento com resveratrol foi capaz de promover melhora da glicemia nos animais em relação aos grupos que não foram tratados. O grupo C-R mostrou redução de 14% na área sob a curva de glicose em relação ao grupo C-C, enquanto o grupo CAF-R reduziu este parâmetro em 16% quando comparado ao seu respectivo controle (CAF-C) ($p < 0,0001$) (Figura 13B).

Figura 14 – Área sob a curva de glicose aos 3 (gráfico A) e 5 meses de idade (gráfico B) dos diferentes grupos experimentais



Legenda: C-C (dieta controle sem tratamento com resveratrol), CAF-C (dieta de cafeteria sem tratamento com resveratrol), C-R (dieta controle tratado com resveratrol) e CAF-R (dieta de cafeteria tratado com resveratrol).
 Nota: Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças do gráfico A foram testadas por Teste t pareado e as do gráfico B por análise de variância (One-Way ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, ambos $p < 0,05$. [a] indica diferença estatística para o grupo C-C; [b] indica diferença estatística para o grupo CAF-C.
 Fonte: A autora, 2018.

3.4 Massa dos depósitos de gordura

Quanto aos depósitos de gordura corporal, a dieta estilo cafeteria promoveu aumento da gordura retroperitoneal ($9,42 \pm 3,27g$) em relação ao grupo C-C ($5,03 \pm 1,26g$, $p = 0,0042$). Não houve diferença nos depósitos de gordura subcutânea e epididimária entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2 – Compartimentos de gordura dos diferentes grupos experimentais aos 5 meses de idade

	C-C	CAF-C	C-R	CAF-R	Valor de p
Gordura retroperitoneal (g)	5,02±1,26	9,41±3,27 ^a	4,41±1,70	8,39±4,54	0,0042
Gordura subcutânea (g)	2,85±0,86	4,36±1,38	4,14±1,40	5,12±2,44 ^a	0,0322
Gordura epididimária (g)	5,43±1,15	7,41±1,77	5,91±1,74	6,35±3,05	0,2156

Legenda: C-C (dieta controle sem tratamento com resveratrol), CAF-C (dieta de cafeteria sem tratamento com resveratrol), C-R (dieta controle tratado com resveratrol) e CAF-R (dieta de cafeteria tratado com resveratrol).

Nota: Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão. As diferenças dos resultados de Gordura subcutânea e epididimária foram testadas por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni e as diferenças do resultado da gordura retroperitoneal foi testada por teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, ambos $p < 0,05$. [a] indica diferença estatística para o grupo C-C.

Fonte: A autora, 2018.

3.5 Bioquímica sérica

Não houve diferença nos níveis séricos de CT e HDL-c entre os grupos (Tabela 3). Em relação aos níveis de VLDL-c, o grupo C-R mostrou uma redução em relação ao grupo C-C de 64%, além disso houve um aumento de 188% do grupo CAF-R em relação ao grupo C-R ($p=0,0025$) (Tabela 3). Houve uma redução de 64% nos níveis de TAG do grupo C-R em relação ao C-C ($p=0,0003$) (Tabela 3). Quanto aos níveis séricos de glicose, o grupo CAF-C mostrou aumento de 55% em relação ao grupo C-C, enquanto o grupo CAF-R reduziu este parâmetro em 44% quando comparado ao CAF-C ($p=0,0023$) o que corrobora com nossos resultados obtidos no TOTG (Tabela 3). Além disso, o tratamento com o resveratrol diminuiu a insulinemia dos animais que receberam a dieta de cafeteria, onde o grupo CAF-R mostrou uma redução de 64% deste parâmetro em relação ao grupo não tratado ($p=0,0001$). Não observamos diferenças entre os outros grupos estudados. Também não houve diferença nos níveis séricos de testosterona entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3 – Bioquímica sérica dos diferentes grupos experimentais aos 5 meses de idade

	C-C	CAF-C	C-R	CAF-R	Valor de p
Colesterol total (mg/dl)	59,89±5,64	60,75±8,01	64,22±8,01	57,00±12,65	0,1810
Triacilglicerol (mg/dl)	85,60±29,51	103,80±38,69	30,44±12,89 ^a	66,38±41,76	0,0003
Glicose (mg/dl)	188,70±77,84	292,30±101,40 ^a	158,40±46,13	164,40±44,31 ^b	0,0023
HDL (mg/dl)	38,90±7,01	40,44±7,00	32,22±3,15	33,80±6,26	0,1382
VLDL (mg/dl)	17,10±5,97	20,78±8,02	6,11±2,80 ^a	17,60±11,82 ^c	0,0025
Insulina (ng/ml)	3,92±1,58	6,37±0,75	2,22±0,79	2,27±1,95 ^b	0,0001
Testosterona (ng/ml)	10,09±0,67	10,30±1,02	10,96±1,12	10,65±1,46	0,5202

Legenda: C-C (dieta controle sem tratamento com resveratrol), CAF-C (dieta de cafeteria sem tratamento com resveratrol), C-R (dieta controle tratado com resveratrol) e CAF-R (dieta de cafeteria tratado com resveratrol).

Nota: Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão. As diferenças dos resultados de Colesterol total e HDL foram testadas por teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. As diferenças de todos os outros resultados foram testadas por análise de variância (One-Way ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$. [a] indica diferença estatística para o grupo C-C; [b] indica diferença estatística para o grupo CAF-C; [c] indica diferença estatística com o grupo C-R.

Fonte: A autora, 2018.

3.6 Parâmetros espermáticos e testiculares

3.6.1 Peso e volume dos testículos

Conforme mencionado na tabela 4 o peso e o volume dos testículos direito e esquerdo não diferiram entre os diferentes grupos experimentais.

Tabela 4 – Peso e volume dos testículos dos animais dos diferentes grupos experimentais

<i>Peso e volume dos testículos</i>	C-C	CAF-C	C-R	CAF-R	Valor de p
Testículo direito peso (g)	1,86±0,16	1,88±0,11	2,03±0,21	1,95±0,15	0,1430
Testículo direito volume (ml)	1,79±0,12	1,85±0,12	1,95±0,16	1,91±0,13	0,0706
Testículo esquerdo peso (g)	1,84±0,17	1,89±0,12	2,03±0,17	1,98±0,15	0,0707
Testículo esquerdo volume (ml)	1,80±1,80	1,84±1,83	1,91±1,91	1,95±1,95	0,2940

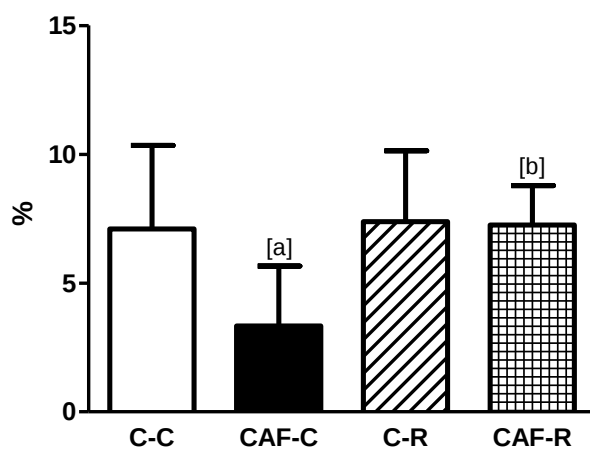
Legenda: C-C (dieta controle sem tratamento com resveratrol), CAF-C (dieta de cafeteria sem tratamento com resveratrol), C-R (dieta controle tratado com resveratrol) e CAF-R (dieta de cafeteria tratado com resveratrol).

Fonte: A autora, 2018.

3.6.2 Análise dos espermatozóides

Em relação à viabilidade dos espermatozóides observamos uma redução de 53% no grupo CAF-C em relação ao grupo C-C e o tratamento com resveratrol foi capaz de promover melhora, onde o grupo CAF-R obteve um aumento de 117% em relação ao seu par - CAF-C ($p=0,0052$) (Figura 15 e tabela 5). Similarmente, a motilidade dos espermatozóides foi reduzida no grupo CAF-C (78%) em relação ao grupo C-C e novamente o tratamento com resveratrol (CAF-R) foi eficaz nesse parâmetro, aumentando-a em 340% quando comparado ao grupo não tratado ($p<0,0001$) (Figura 16 e tabela 5). Quanto à concentração dos espermatozóides, não foram observadas diferenças entre os grupos estudados (Figura 17 e tabela 5).

Figura 15 – Viabilidade dos espermatozóides dos diferentes grupos experimentais

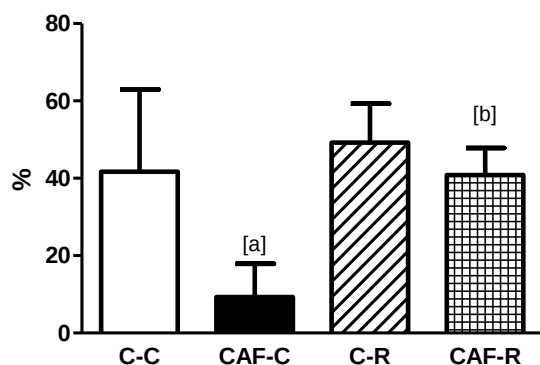


Legenda: C-C (dieta controle sem tratamento com resveratrol), CAF-C (dieta de cafeteria sem tratamento com resveratrol), C-R (dieta controle tratado com resveratrol) e CAF-R (dieta de cafeteria tratado com resveratrol).

Nota: Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças foram testadas por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, $p<0,05$. [a] indica diferença estatística para o grupo C-C; [b] indica diferença estatística para o grupo CAF-C.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 16 – Motilidade dos espermatozóides dos diferentes grupos experimentais

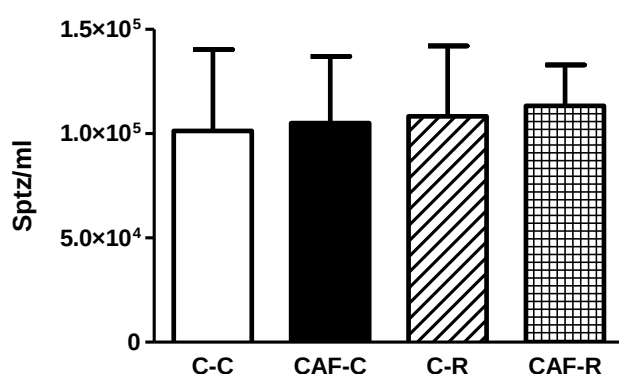


Legenda: C-C (dieta controle sem tratamento com resveratrol), CAF-C (dieta de cafeteria sem tratamento com resveratrol), C-R (dieta controle tratado com resveratrol) e CAF-R (dieta de cafeteria tratado com resveratrol).

Nota: Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças foram testadas por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$. [a] indica diferença estatística para o grupo C-C; [b] indica diferença estatística para o grupo CAF-C.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 17 – Concentração dos espermatozóides dos diferentes grupos



Legenda: Grupo C-C (dieta controle sem tratamento com resveratrol), CAF-C (dieta de cafeteria sem tratamento com resveratrol), C-R (dieta controle tratado com resveratrol) e CAF-R (dieta de cafeteria tratado com resveratrol).

Nota: Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças foram testadas por teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, $p < 0,05$.

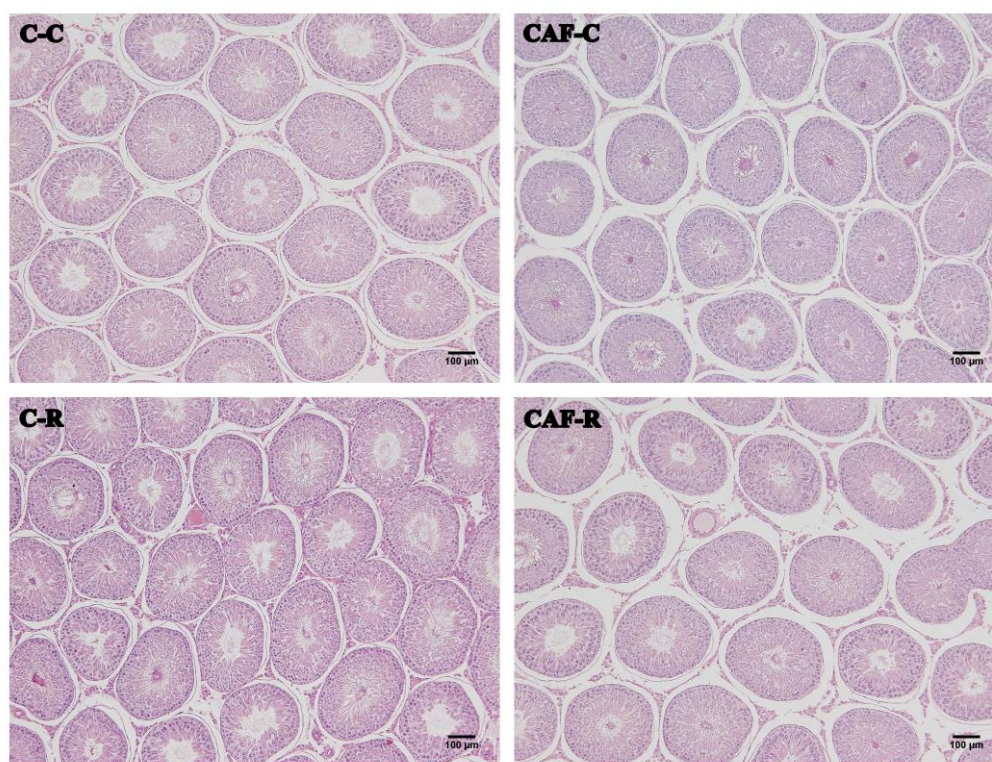
Fonte: A autora, 2018.

3.6.3 Morfometria e estereologia do testículo

3.6.3.1 Diâmetro e Altura do epitélio dos túbulos seminíferos

Não houve diferença no diâmetro dos túbulos seminíferos dos grupos experimentais (Figura 14 e tabela 5). Com relação à altura do epitélio dos túbulos seminíferos, verificou-se que o grupo que recebeu a dieta cafeteria (sem tratamento com resveratrol) mostrou redução de 34% neste parâmetro em relação ao grupo C-C ($p=0,0007$) (Figuras 15 e tabela 5).

Figura 18 – Diâmetro dos túbulos seminíferos dos diferentes grupos experimentais

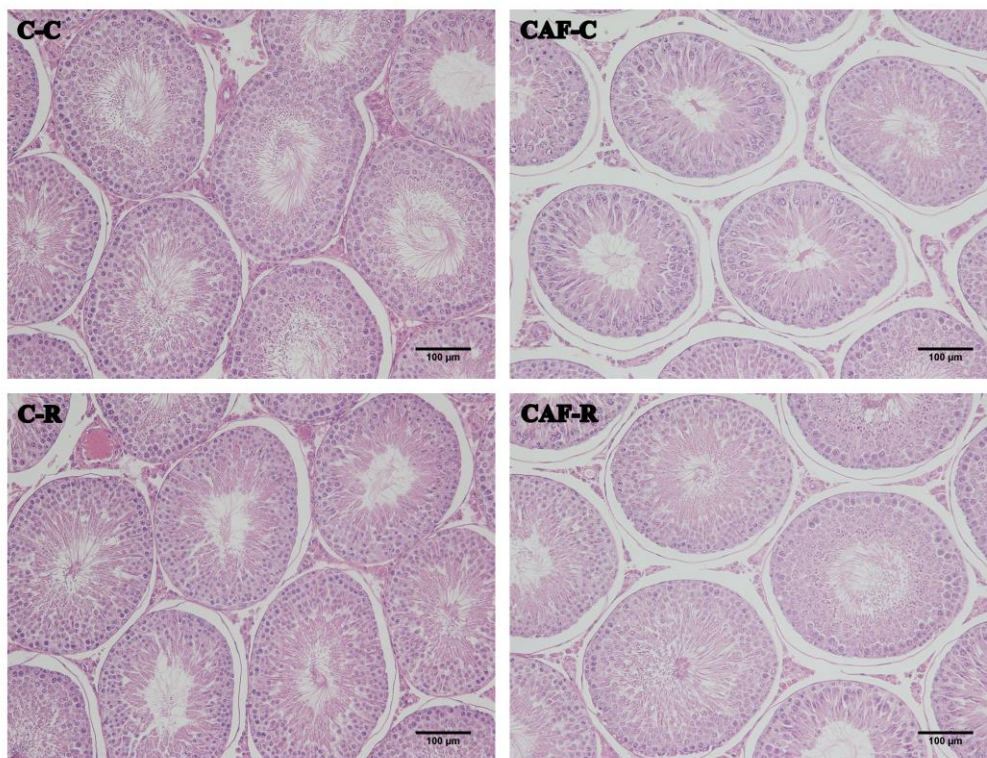


Legenda: Grupo C-C (dieta controle sem tratamento com resveratrol), CAF-C (dieta de cafeteria sem tratamento com resveratrol), C-R (dieta controle tratado com resveratrol) e CAF-R (dieta de cafeteria tratado com resveratrol).

Nota: HE 100x.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 19 – Altura do epitélio seminífero dos diferentes grupos experimentais



Legenda: Grupo C-C (dieta controle sem tratamento com resveratrol), CAF-C (dieta de cafeteria sem tratamento com resveratrol), C-R (dieta controle tratado com resveratrol) e CAF-R (dieta de cafeteria tratado com resveratrol).

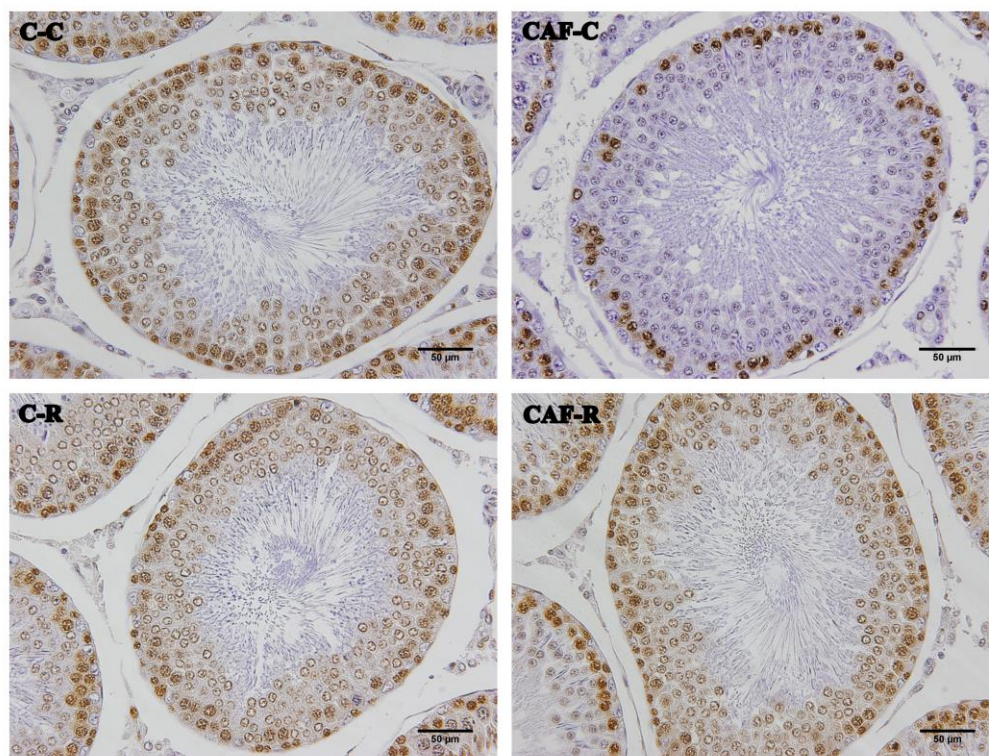
Nota: HE 200x.

Fonte: A autora, 2018.

3.6.3.2 Proliferação celular

A proliferação das células da linhagem espermatogênica foi reduzida em 34% no grupo CAF-C em relação ao grupo C-C e o tratamento com resveratrol, nesse mesmo grupo, foi capaz de reverter esse quadro, elevando em 88% a taxa de proliferação relação ao CAF-C (Figura 16 e tabela 5).

Figura 20 – Imunomarcação das células em proliferação celular nos túbulos seminíferos dos diferentes grupos experimentais



Legenda: Grupo C-C (dieta controle sem tratamento com resveratrol), CAF-C (dieta de cafeteria sem tratamento com resveratrol), C-R (dieta controle tratado com resveratrol) e CAF-R (dieta de cafeteria tratado com resveratrol).

Nota: Em marrom, as células imunomarcadas com o anticorpo anti-PCNA mostrando a proliferação celular nas células da linhagem espermatogênica. 400x.

Fonte: A autora, 2018.

3.6.3.3 Densidade volumétrica e volume absoluto das estruturas testiculares

A Vv do epitélio seminífero foi menor nos grupos CAF (26%), C-R (10%) e CAF-R (6%) em relação ao grupo C-C ($p < 0,0001$). Em oposição, o tratamento com resveratrol aumentou a Vv do lúmen tubular em 20% (C-R) e 11% (CAF-R) quando comparados ao C-C ($p < 0,0001$). O grupo CAF-R também teve aumento de 11% na Vv do lúmen tubular em comparação ao seu respectivo controle ($p < 0,0001$). Porém, ao compararmos a Vv do compartimento tubular como um todo, observou-se redução do grupo CAF-C em relação ao grupo C-C (4,5%), e o tratamento com resveratrol no grupo que recebeu dieta de cafeteria foi capaz de elevar esse parâmetro em 5%, em relação ao seu par ($p < 0,0001$). Não houve diferença na Vv da túnica própria, do compartimento intertubular (espaço intersticial), dos vasos sanguíneos e do estroma entre os grupos. O Va somente mostrou diferença no lúmen

tubular que foi aumentado em 22% no grupo C-R em relação ao grupo C-C (0,0074). Todos os outros parâmetros não mostraram diferença estatística (Tabela 5).

Tabela 5 – Análises dos espermatozoides, morfometria e estereologia do testículo dos animais dos diferentes grupos experimentais

<i>Análises dos espermatozoides</i>	C-C	CAF-C	C-R	CAF-R	Valor de p
Concentração (Sptz/ml)	1,0x10 ⁵ ±0,39x10 ⁴	1,0x10 ⁵ ±0,32x10 ⁴	1,0x10 ⁵ ±0,33x10 ⁴	1,1x10 ⁵ ±0,19x10 ⁴	0,7832
Motilidade (%)	47,82±19,17	9,28±8,63 ^a	49,25±10,06	40,86±6,96 ^b	<0,0001
Viabilidade (%)	7,10±3,24	3,33±2,33 ^a	7,38± 2,74	7,25±1,53 ^b	0,0052
<i>Morfometria e estereologia do testículo</i>					
Diâmetro dos tubulos seminíferos(µm)	281,10±6,90	280,30±10,95	285,80±16,32	269,40±13,63	0,0720
Epitélio seminífero					
Altura(µm)	56,33±3,44	37,27±8,39 ^a	58,23±2,82	53,25±8,14	0,0007
Vv(%)	45,24±2,20	40,03±1,86 ^a	40,63±1,14 ^a	42,43±1,66 ^a	<0,0001
Va(ml)	0,83±0,06	0,73±0,05	0,78±0,09	0,81±0,06	0,0609
Lúmen tubular					
Vv(%)	33,81±2,37	33,70±2,73	40,62±1,68 ^a	37,50±2,22 ^{a,b}	<0,0001
Va(ml)	0,61±0,09	0,62±0,06	0,74±0,11 ^a	0,72±0,072	0,0074
Túnica própria					
Vv(%)	5,99±1,34	6,51±1,25	5,03±0,78	5,92±0,88	0,0867
Va(ml)	0,10±0,02	0,12±0,03	0,09±0,02	0,11±0,01	0,1095
Compartimento tubular					
Vv(%)	85,04±1,72	81,22±2,43 ^a	87,22±1,23	85,38±2,40 ^b	<0,0001
Va(ml)	1,54±0,17	1,49±0,10	1,65±0,26	1,65±0,12	0,1979
Vasos sanguíneos					
Vv(%)	0,72±0,29	0,63±0,09	0,70±0,38	0,98±0,39	0,1395
Va(ml)	0,01±0,01	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,01	0,0643
Estroma					
Vv(%)	7,92±0,89	7,92±0,76	7,29±0,69	7,92±0,99	0,2372
Va(ml)	0,14±0,02	0,15±0,01	0,13±0,02	0,15±0,01	0,4936
Compartimento Intertubular					
Vv(%)	8,65±0,99	8,54±0,47	7,75±0,54	8,56±0,78	0,0755
Va(ml)	0,15±0,02	0,16±0,01	0,14±0,02	0,17±0,02	0,2188
Proliferação Celular (cels/mm ²)	2102±352,70	1386±177,30 ^a	1750±278,50	2605±1436,00 ^b	0,0024

Legenda: C-C (dieta controle sem tratamento com resveratrol), CAF-C (dieta de cafeteria sem tratamento com resveratrol), C-R (dieta controle tratado com resveratrol) e CAF-R (dieta de cafeteria tratado com resveratrol).

Nota: Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão. As diferenças dos resultados de Concentração dos espermatozoides, diâmetro dos túbulos seminíferos, altura do epitélio seminífero e proliferação celular foram testadas por teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. As diferenças dos demais resultados foram testadas por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, ambos p<0,05. [a] indica diferença estatística para o grupo C-C e [b] indica diferença estatística para o grupo CAF-C.

Fonte: A autora, 2018.

4 DISCUSSÃO

Em nosso trabalho, a dieta estilo cafeteria foi capaz de promover intolerância à glicose e alterações morfológicas importantes no testículo, independente do aumento da massa corporal. Além disso, verificamos redução da altura do epitélio seminífero e da proliferação celular das células da linhagem espermátogênica, com diminuição da viabilidade e da motilidade dos espermatozóides. Entretanto, o resveratrol atuou melhorando o metabolismo de carboidratos, os parâmetros espermáticos afetados, e a morfologia do testículo, podendo ser uma opção terapêutica de escolha na promoção da fertilidade normal.

A massa corporal dos animais foi semelhante entre os grupos experimentais. Similarmente, estudo feito por Higa e colaboradores (2014) não observaram diferença no ganho de peso entre animais que consumiram uma dieta de cafeteria e o grupo controle [13]. Por outro lado, South e colaboradores (2014) mostraram que o consumo da dieta de cafeteria alterou os padrões alimentares, de forma que o número de vezes que os animais buscavam alimentação foi reduzido. Porém quando os animais iam se alimentar, passaram a preferir alimentos de maior densidade energética, que consumiam em maior quantidade. Esse comportamento foi explicado pela variabilidade de alimentos densos em energia presentes na dieta, gerando o excesso de consumo, acarretando no aumento do ganho ponderal [72]. Diante disso, acreditamos que nossos animais não diferiram no ganho de peso porque apesar da dieta de cafeteria conter aporte energético superior à dieta controle, não houve diferença na ingestão alimentar em gramatura.

O consumo de dietas ricas em lipídios e carboidratos simples (dieta CAF) tem aumentado no mundo ocidental [73]. Embora nem sempre esteja associada à obesidade/sobrepeso [13], outras complicações metabólicas como hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e hiperglicemia podem emergir e agravar o estado de saúde do indivíduo [74]. Para tal, o uso de antioxidantes, em particular o resveratrol, tem sido uma ferramenta importante e útil no combate aos danos metabólicos advindos desse tipo de dieta [56,75-77]. O número de trabalhos experimentais relacionados ao tema é crescente, onde as doses utilizadas e os tempos de tratamento são cruciais para mostrar os efeitos benéficos desse antioxidante [56,77].

Em nosso caso, e corroborando com outros estudos [13,78], a dieta CAF não alterou a pressão arterial sistólica, as concentrações de CT, HDL-c, TAG e VLDL-c dos animais, enquanto que o tratamento com resveratrol reduziu apenas os níveis séricos de TAG e VLDL-

c nos animais submetidos a dietas normais, mostrando-se indiferente no grupo CAF-R. Sem dúvidas, o tempo de administração e a composição das dietas experimentais contribuíram para esses resultados.

Inversamente a este padrão, a dieta CAF promoveu intolerância à glicose aos 3 e 5 meses de idade. Contudo, aos 5 meses de idade o tratamento com resveratrol reduziu a glicemia e a insulina séricas. A inter-relação entre dieta de cafeteria e hiperglicemia é comum. Em longo prazo, o estado pré-diabético pode sobrecarregar o pâncreas e induzir o quadro de resistência à insulina, comprometendo ainda mais o metabolismo de carboidratos. [13,74]. Entretanto, o resveratrol vem sendo utilizado para minimizar esse dano metabólico [79,80]. O uso desse antioxidante em animais diabéticos potencializa a ação da insulina [81] e a utilização da glicose periférica [80,82], além de suprimir a produção hepática de glicose [83], o que justifica os resultados encontrados.

Os efeitos adversos vinculados à obesidade e à dieta High fat (HF) são vastos na literatura [84,85]. No que tange aos parâmetros reprodutivos, trabalhos que utilizam a dieta de cafeteria, embora em menor quantidade, apontam a relação entre o aumento do EO e a inflamação [86-88], fatores já bem descritos por influenciar negativamente a saúde testicular. Brunetti e colaboradores em 2010 evidenciaram que a administração de dieta de cafeteria em pacientes jovens promoveu o aumento dos níveis de Prostaglandina E₂ no parênquima testicular, o que pode induzir a proliferação desordenada das células germinativas testiculares (câncer) [89]. Embora não tenhamos dosado índices inflamatórios, nosso estudo foi o primeiro a mostrar que independente do aumento da massa corporal, o consumo da dieta de cafeteria reduziu a viabilidade e a motilidade dos espermatozóides, diminuiu a altura do epitélio seminífero e a proliferação das células da linhagem espermatogênica. Além disso, alterou parte da morfologia do testículo, com redução da densidade de área do epitélio seminífero e de todo o compartimento tubular. Surpreendentemente, os depósitos de gordura retroperitoneal foram maiores no grupo CAF, indicando redistribuição da massa de gordura. Em humanos, níveis de gordura aumentados podem levar ao EO [38,39]. Recentes avanços no campo da medicina reprodutiva mostram que as EROs podem ser consideradas um dos mediadores da disfunção espermática e infertilidade [42,90].

Embora não tenhamos avaliado o EO com dosagens de EROs no nível tecidual ou sistêmico, foi documentado que as EROs afetam a contagem, motilidade e morfologia de espermatozóides e causam a fragmentação do DNA espermático [90,91-93]. Já está bem estabelecido na literatura que a elevação dos níveis séricos de glicose induz o aumento do EO no sistema reprodutor masculino, o que causa apoptose e degeneração das células

germinativas, aumento da peroxidação lipídica da membrana espermática e redução da espermatogênese, contribuindo para a infertilidade masculina [94-100]. Sexton & Jawron, em um trabalho de revisão, indicaram que indivíduos diabéticos apresentaram redução na espermatogênese, na contagem de espermatozóides e na motilidade espermática [101]. A partir desses achados, acreditamos que a hiperglicemia observada em nossos animais que receberam a dieta da CAF pode ter desencadeado o aumento das EROs, causando assim, as alterações espermáticas. Por outro lado, o tratamento com resveratrol é capaz de aumentar a síntese e a atividade de algumas enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase [65,102-104], inibindo o EO nas células testiculares [98]. Além disso, outros estudos indicam que o resveratrol melhora a sensibilidade à insulina e aumenta a translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) no músculo esquelético, o que melhora a captação de moléculas de glicose [98,105], o que corrobora com nossos achados. Também, sugerimos que este antioxidante ativou a proliferação celular em células da linhagem espermatogênica, melhorando os parâmetros espermáticos acima mencionados.

Aqui, a viabilidade espermática foi determinada à partir do teste hipo-osmótico, que avalia a integridade e a função da membrana plasmática desta célula. Os espermatozóides que apresentam o dobramento da cauda são considerados viáveis, pois essa alteração morfológica é observada apenas nos espermatozóides com membrana plasmática integrada e funcional, como consequência da entrada de líquido no meio intracelular [61,68]. Foi descrito anteriormente que a exposição à dieta HF pode aumentar o dano oxidativo no testículo, resultando em aumento da peroxidação lipídica da membrana espermática [99,100]. Portanto, nosso estudo sugere que uma dieta CAF atua de maneira semelhante, sendo a causa da redução da viabilidade encontrada. O que foi atenuado através do tratamento com resveratrol por meio dos mecanismos já descritos anteriormente.

A espermatogênese também pode ser estudada à partir da morfologia testicular [106]. Embora não tenhamos encontrado diferenças no peso e volume dos testículos, no diâmetro do túbulo seminífero, na densidade de área da túnica própria, do compartimento intertubular (espaço intersticial), dos vasos sanguíneos, do estroma e na concentração sérica de testosterona, vimos que a dieta CAF reduziu a altura do epitélio seminífero, sem efeito positivo do tratamento com resveratrol. Assim como a dieta HF, a dieta CAF que manipulamos no laboratório apresenta em sua composição o colesterol, molécula constitutiva das membranas celulares em animais. Nesse sentido, a ingestão aumentada desse tipo de gordura pode ter prejudicado as propriedades físico-químicas da membrana plasmática, e assim, comprometido a espermatogênese. É provável que a ausência do efeito positivo do

resveratrol esteja ligada ao tempo do experimento. Talvez, se tivéssemos aumentado o tempo de estudo, pudéssemos atenuar esta alteração morfológica do testículo.

Conforme mencionado anteriormente, a densidade de área do epitélio seminífero foi reduzida em todos os grupos experimentais, a exceção do grupo controle. Somando-se a isso, o tratamento com resveratrol promoveu um aumento da densidade de área do lúmen tubular, tanto no grupo controle quanto no grupo CAF. A interpretação desses dados separadamente é difícil, devido à escassez de trabalhos na literatura. Porém, quando avaliamos a densidade de área do compartimento tubular como um todo observamos que a dieta CAF causou redução nesse parâmetro em relação ao grupo alimentado com dieta controle; e mais uma vez o tratamento com resveratrol foi capaz de reverter esse quadro. O compartimento tubular é fundamental para a ocorrência da espermatogênese. Nele, encontram-se as células germinativas e as células de Sertoli, as principais responsáveis por regular a espermatogênese e desempenhar diversas funções na produção espermática [33,34]. Sabe-se que dietas hiperenergéticas podem causar danos aos espermatozóides [99]. Contudo, até o momento não sabíamos como a dieta de cafeteria afetaria a morfologia testicular e ocasionaria tais danos. Recentemente, efeitos sobre a reprodução e a dieta de cafeteria foram evidenciados por Bazzano e colaboradores em 2015, que mostraram que a administração de dieta de cafeteria do desmame à vida adulta foi capaz de reduzir a capacidade reprodutiva e alterar a função ovariana [78]. Igualmente, estudos de programação metabólica a partir da administração de dieta de cafeteria mostraram que a prole de fêmeas apresenta deficiência na função reprodutiva, com ou sem aumento de gordura abdominal, e alterações metabólicas associadas [107]. Por conseguinte, acreditamos que a injúria no compartimento tubular, evidenciada em nosso trabalho, seja uma das principais alterações morfológicas relacionadas ao comprometimento da espermatogênese e da função reprodutiva.

CONCLUSÃO

O consumo de dieta estilo cafeteria, embora não tenha modificado a massa corporal, promoveu hiperglicemia e comprometimento da espermatogênese, com alterações na morfologia testicular e nos parâmetros espermáticos. E o tratamento com resveratrol foi capaz de atenuar parcialmente esses danos. O que instiga a comunidade científica a promover mais estudos, afim de estabelecer o uso do resveratrol como terapia adjuvante na disfunção das células testiculares.

REFERÊNCIAS

- [1] Cissen M, Bensdorp A, Cohlen BJ, Repping S, de Bruin JP, van Wely M. Assisted reproductive technologies for male subfertility. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016 Feb; 2.
- [2] Drobnis EZ, Johnson M. The question of sperm DNA fragmentation testing in the male infertility work-up: A response to Professor Lewis' commentary. *Reproductive Biomedicine Online*. 2015 Aug;31(2):138-9.
- [3] Whitfield M, Pollet-Villard X, Levy R, Drevet JR, Saez F. Posttesticular sperm maturation, infertility, and hypercholesterolemia. *Asian Journal of Androlology*. 2015 Oct;17(5):742-8.
- [4] La J, Roberts NH, Yafi FA. Diet and Men's Sexual Health. *Sexual Medicine Reviews*. 2018 Jan;6(1):54-68.
- [5] Giahi L, Mohammadmoradi S, Javidan A, Sadeghi MR. Nutritional modifications in male infertility: a systematic review covering 2 decades. *Nutrition Reviews*. 2016 Feb;74(2):118-30.
- [6] Katib A: Mechanisms linking obesity to male infertility. *Central European Journal of Urology*. 2015;68(1):79-85.
- [7] Fung TT, Rimm EB, Spiegelman D, Spiegelman D, Rifai N, Tofler GH, Willett WC, Hu FB. Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2001 Jan;73:61-7.
- [8] Rodríguez-Monforte M, Sánchez E, Barrio F, Costa B, Flores-Mateo G. Metabolic syndrome and dietary patterns: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *European Journal of Nutrition*. 2017 Apr;56(3):925-47.
- [9] Drewnowski A, Mennella JA, Johnson SL, Bellisle F. Sweetness and food preference. *The Journal of Nutrition*. 2012 Jun;142(6):1142S-8S.
- [10] Raynor HA, Epstein JH. Dietary variety, energy regulation, and obesity, *Psychological Bulletin*. 2001 May;127(3):325-41.
- [11] Sørensen LB, Møller P, Flint A, Martens M, Raben A. Effect of sensory perception of foods on appetite and food intake: a review of studies on humans. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 2003 Oct;27(10):1152-66.
- [12] Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Nascimento CMO. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition* 2004 Feb;20:218-24.
- [13] Higa TS, Spinola AV, Fonseca-Alaniz MH, Evangelista FS. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. *International*

Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. 2014 Mar; 13; 6(1):47-54.

[14] Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, Corngnat A, Muggeo M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1989 Feb;68(2):374-8.

[15] Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011 Jun;121(6):2111-7.

[16] Sun S, Ji Y, Kersten S, Qi L. Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. *Annual Review of Nutrition*. 2012 Aug; 32:261-86.

[17] Fuentes E, Fuentes F, Vilahur G, Badimon L, Palomo I. Mechanisms of chronic state of inflammation as mediators that link obese adipose tissue and metabolic syndrome. *Mediators of Inflammation*. 2013 May; 2013:1365-84.

[18] Mammi C, Calanchini M, Antelmi A, Cinti F, Rosano GM, Lenzi A, Caprio M, Fabbri A. Androgens and adipose tissue in males: a complex and reciprocal interplay. *International Journal of Endocrinology*. 2012;2012:789653.

[19] Du Plessis SS, Cabler S, McAlister DA, Sabanegh E, Agarwal A. The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. *Nature Reviews Urology*. 2010 Mar;7(3): 153–61.

[20] Michalakis K, Mintziori G, Kaprara A, Tarlatzis BC, Goulis DG. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: A narrative review. *Metabolism*. 2013 Apr; 62(4):4574-8.

[21] Zitzmann M. Testosterone deficiency, insulin resistance and the metabolic syndrome. *Nature Reviews Endocrinology*. 2009 Dec;5(12):673-81.

[22] Ng SF, Lin RC, Laybutt DR, Barres R, Owens JA, Morris MJ. Chronic high-fat diet in fathers programs b-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature*. 2010 Oct;467:963–6.

[23] Mitchell M, Bakos HW, Lane M. Paternal diet-induced obesity impairs embryo development and implantation in the mouse. *Fertility and Sterility*. 2011 Mar;95(4):1349–53.

[24] Palmer NO, Bakos HW, Owens JA, Setchell BP, Lane M. Diet and exercise in an obese mouse fed a high-fat diet improve metabolic health and reverse perturbed sperm function. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2012 Apr;302(7):E768–E780.

[25] Morgan DH, Ghribi O, Hui L, Geiger JD, Chen X. Cholesterol-enriched diet disrupts the blood-testis barrier in rabbits. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2014 Dec;307(12):E1125–E1130.

[26] Rato L, Alves MG, Dias TR, Lopes G, Cavaco JE, Socorro S, Oliveira PF. High-energy diets may induce a pre-diabetic state altering testicular glycolytic metabolic profile and male reproductive parameters. *Andrology*. 2013 May;1(3):495–504.

- [27] Bakos HW, Henshaw RC, Mitchell M, Lane M. Paternal body mass index is associated with decreased blastocyst development and reduced live birth rates following assisted reproductive technology. *Fertility and Sterility*. 2011 Apr;95(5):1700–4.
- [28] Tunc O, Bakos HW, Tremellen K. Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrologia*. 2011 Apr;43(2):121–8.
- [29] Keltz J, Zapantis A, Jindal S, Lieman HJ, Santoro N, Polotsky AJ. Overweight men: clinical pregnancy after ART is decreased in IVF but not in ICSI cycles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2010 Sep;27(9-10):539–44.
- [30] Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, Roudebush WE.. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *Journal of Andrology*. 2006 May-Jun;27(3):450–2.
- [31] Rato L, Alves MG, Cavaco JE, Oliveira PF. High-energy diets: a threat for male fertility? *Obesity Reviews*. 2014 Dec;15(12):996–1007.
- [32] Junqueira LCU, José Carneiro, editor. *Histologia Básica*. 11 ed. Rio de Janeiro 2011.
- [33] França LR, Russell LD. The testis of domestic animals. In: Regadera, J.; Martinez-Garcia, F. (Ed.). *Male reproduction. A multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Livingstone. 1998, p.197-219.
- [34] Russel LER, Sinha A, Clegg E. editor. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Florida 1990.
- [3] Netter FH. *Atlas de Anatomia Humana*. 5 ed. Rio de Janeiro 2011.
- [36] Seeley RR, Stephens TD, Tate P. *Anatomia & Fisiologia*. 3 ed. Lisboa (Portugal) 1997.
- [37] Reece WO, editor. *Fisiologia dos animais domésticos* 2006.
- [38] Viguera-Villaseñor RM, Rojas-Castañeda JC, Chávez-Saldaña M, Gutiérrez-Pérez O, García-Cruz ME, Cuevas-Alpuche O, Reyes-Romero MM, Zambrano E. Alterations in the spermatogenic function generated by obesity in rats. *Acta Histochemica*. 2011 Feb;113(2):214-20.
- [39] Aitken RJ, Jones KT, Robertson SA. Reactive oxygen species and sperm function in sickness and in health. *Journal of Andrology*. 2012 Dec;33(6):1096-106.
- [40] Guthrie HD, Welch GR. Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*. 2012 Nov;78(8):1700-8.
- [41] Agarwal A, Allamaneni SS. Free radicals and male reproduction. *Journal of Indian Medical Association*. 2011 Mar;109(3): 184-7.
- [42] Chen H, Zhao HX, Huang XF, Chen GW, Yang ZX, Sun WJ, Tao MH, Yuan Y, Wu JQ, Sun F, Dai Q, Shi HJ. Does high load of oxidants in human semen contribute to male factor infertility? *Antioxidants e Redox Signaling*. 2012 Apr;16(8):754-9.

- [43] Della-Morte D, Dave KR, DeFazio RA, Bao YC, Raval AP, Perez-Pinzon MA. Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a sirtuin 1-uncoupling protein 2 pathway. *Neuroscience*. 2009 Mar;159(3):993-1002.
- [44] Lee JH, Guo Z, Myler LR, Zheng S, Paull TT. Direct activation of ATM by resveratrol under oxidizing conditions. *PLoS One*. 2014 Jun; 9(6):e97969.
- [45] Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002 May;50(11):3337–40.
- [46] Ross C, Morriss A, Khairy M, Khalaf Y, Braude P, Coomarasamy A, El-Toukhy T. A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reproductive Biomedicine Online*. 2010 Jun;20(6):711-23.
- [47] Gescher AJ, Steward WP. Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. *Cancer Epidemiology, Biomarkers e Prevention*. 2003 Oct;12(10):953–7.
- [48] Wu H, Wang Y, Wu C, Yang P, Li H, Li Z1. Resveratrol induces cancer cell apoptosis through mir-326/pkm2-mediated ER stress and mitochondrial fission. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016 Dec;64(49):9356–67.
- [49] Ramprasath VR, Jones PJ. Anti-atherogenic effects of resveratrol. *European journal of clinical nutrition*. 2010 Jul;64(7):660-8.
- [50] Szkudelska K, Szkudelski T. Resveratrol, obesity and diabetes. *European Journal of Pharmacology*. 2010 Jun;635(1-3):1-8.
- [51] Jeon BT, Jeong EA, Shin HJ, Lee Y, Lee DH, Kim HJ, Kang SS, Cho GJ, Choi WS, Roh GS. Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. *Diabetes*. 2012 Jun;61(6):1444-54.
- [52] Maresch CC, Stute DC, Ludlow H, Hammes HP, de Kretser DM, Hedger MP, Linn T. Hyperglycemia is associated with reduced testicular function and activin dysregulation in the Ins2Akita[±] mouse model of type 1 diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2017 May;446:91-101.
- [53] Vitaglione P, Ottanelli B, Milani S, Morisco F, Caporaso N, Fogliano V. Dietary trans-resveratrol bioavailability and effect on CCl₄-induced liver lipid peroxidation. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2009 Apr;24(4):618-22.
- [54] Li H, Xia N, Forstermann U. Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. *Nitric Oxide*. 2012 Feb;26(2):102-10.
- [55] Rauf A, Imran M, Suleria HAR, Ahmad B, Peters DG, Mubarak MS. A comprehensive review of the health perspectives of resveratrol. *Food & Function*. 2017 Dec;8(12):4284-305.
- [56] Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper RH, van de Weijer T, Goossens GH, Hoeks J, van der Krieken S, Ryu D, Kersten S, Moonen-Kornips E, Hesselink MK, Kunz I, Schrauwen-Hinderling VB, Blaak EE, Auwerx J, Schrauwen P. Calorie restriction-like effects

of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metabolism*. 2011 Nov;14(5):612-22.

[57] Nishimura Y, Sasagawa S, Ariyoshi M, Ichikawa S, Shimada Y, Kawaguchi K, Kawase R, Yamamoto R, Uehara T, Yanai T, Takata R, Tanaka T. Systems pharmacology of adiposity reveals inhibition of EP300 as a common therapeutic mechanism of caloric restriction and resveratrol for obesity. *Frontiers in Pharmacology*. 2015 Sep; 6:199.

[58] Shin S, Jeon JH, Park D, Jang MJ, Choi JH, Choi BH, Joo SS, Nahm SS, Kim JC, Kim YB. Transresveratrol relaxes the corpus cavernosum ex vivo and enhances testosterone levels and sperm quality in vivo. *Archives of Pharmacal Research*. 2008 Jan;31(1):83-7.

[59] Hooser SB, Demerell DG, Douds DA, Hoyer P, Sipes IG. Testicular germ cell toxicity caused by vinylcyclohexene diepoxide in mice. *Reproductive Toxicology*. 1995 Jul-Aug;9(4):359-67.

[60] Yulug E, Turedi S, Karaguzel E, Kutlu O, Mentese A, Alver A. The short term effects of resveratrol on ischemia-reperfusion injury in rat testis. *Journal of Pediatric Surgery*. 2014 Mar; 49(3):484-9.

[61] Ribeiro CT, Milhomem R, De Souza DB, Costa WS, Sampaio FJ, Pereira-Sampaio MA. Effect of antioxidants on outcome of testicular torsion in rats of different ages. *Journal of urology*. 2014 May;191(5 Suppl):1578-84.

[62] Mendes TB, Paccola CC, de Oliveira Neves FM, Simas JN, da Costa Vaz A, Cabral RE, Vendramini V, Miraglia SM. Resveratrol improves reproductive parameters of adult rats varicocelized in peripuberty. *Reproduction*. 2016 Jul;152(1):23-35.

[63] Simas JN, Mendes TB, Paccola CC, Vendramini V, Miraglia SM. Resveratrol attenuates reproductive alterations in type 1 diabetes-induced rats. *International Journal of Experimental Pathology*. 2017 Dec;98(6):312-28.

[64] Juan ME, Gonzalez-Pons E, Munuera T, Ballester J, Rodriguez-Gil JE, Planas JM. trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *Journal of Nutrition*. 2005 Apr;135(4):757-60.

[65] Wang HJ, Wang Q, Lv ZM, Wang CL, Li CP, Rong YL. Resveratrol appears to protect against oxidative stress and steroidogenesis collapse in mice fed high-calorie and high cholesterol diet. *Andrologia*. 2015 Feb;47(1):59-65.

[66] Collodel G, Federico MG, Geminiani M, Martini S, Bonechi C, Rossi C, Figura N, Moretti E. Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. *Reproductive Toxicology*. 2011 Feb;31(2):239-46.

[67] Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*. 1970 Jun;26(1):57-60.

[68] Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its

relationship to other semen characteristics. *Journal of reproduction and fertility*. 1984 Jan;70(1):219-28.

[69] Motrich RD, Ponce AA, Rivero VE. Effect of tamoxifen treatment on the semen quality and fertility of the male rat. *Fertility and Sterility*. 2007 Aug; 88(2):452-61.

[70] Silva RC, Costa GM, Andrade LM, Franca LR. Testis stereology, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Theriogenology*. 2010 Jan 15;73(2):157-67.

[71] Zar JH. *Biostatistical analysis*. 4 ed. Prentice-Hall; 1999.

[72] South T, Holmes NM, Martire SI, Westbrook RF, Morris MJ. Rats eat a cafeteria-style diet to excess but eat smaller amounts and less frequently when tested with chow. *PLoS One*. 2014 Apr 21;9(4):e93506

[73] Pranprawit A, Wolber FM, Heyes JA, Molan AL, Kruger MC. Short-term and long-term effects of excessive consumption of saturated fats and/or sucrose on metabolic variables in Sprague Dawley rats: a pilot study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013 Oct;93(13):3191-7.

[74] Gomez-Smith M, Karthikeyan S, Jeffers MS, Janik R, Thomason LA, Stefanovic B, Corbett D. A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. *Physiology & Behavior*. 2016 Dec; 167:382-91.

[75] Pons Z, Margalef M, Bravo FI, Arola-Arnal A, Muguerza B. Chronic administration of grape-seed polyphenols attenuates the development of hypertension and improves other cardiometabolic risk factors associated with the metabolic syndrome in cafeteria diet-fed rats. *British Journal of Nutrition*. 2017 Jan;117(2):200-8.

[76] Rivera L, Morón R, Zarzuelo A, Galisteo M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochemical Pharmacology*. 2009 Mar; 77(6):1053-63.

[77] Gomez-Zorita S, Fernandez-Quintela A, Macarulla MT, Aguirre L, Hijona E, Bujanda L, Milagro F, Martinez JA, Portillo MP. Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress. *British Journal of Nutrition*. 2012 Jan;107:202-10.

[78] Bazzano MV, Torelli C, Pustovrh MC, Paz DA, Elia EM. Obesity induced by cafeteria diet disrupts fertility in the rat by affecting multiple ovarian targets. *Reproductive BioMedicine Online*. 2015 Nov;31(5):655-67.

[79] Kai Liu, Rui Zhou, Bin Wang, and Man-Tian Mi. Effect of resveratrol on glucose control and insulin sensitivity: a meta-analysis of 11 randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2014 Jun;99(6):1510-9.

[80] Tan Z, Zhou LJ, Mu PW, Liu SP, Chen SJ, Fu XD, Wang TH. Caveolin-3 is involved in the protection of resveratrol against high-fat-diet-induced insulin resistance by promoting

GLUT4 translocation to the plasma membrane in skeletal muscle of ovariectomized rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2012 Dec;23(12):1716-24.

[81] Szkudelski T, Szkudelska K. Resveratrol and diabetes: from animal to human studies. *Biochimica Biophysica Acta*. 2015 Jun;1852(6):1145-54.

[82] Chen LL, Zhang HH, Zheng J, Hu X, Kong W, Hu D, Wang SX, Zhang P. Resveratrol attenuates high-fat diet-induced insulin resistance by influencing skeletal muscle lipid transport and subsarcolemmal mitochondrial β -oxidation. *Metabolism*. 2011 Nov;60(11):1598-609.

[83] Burgess TA, Robich MP, Chu LM, Bianchi C, Sellke FW. Improving glucose metabolism with resveratrol in a swine model of metabolic syndrome through alteration of signaling pathways in the liver and skeletal muscle. *Archives of Surgery* 2011 May;146(5):556-64.

[84] Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*. 2003 May;21(5):210-6.

[85] Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *International Journal of Andrology*. 2011 Oct;34(5):402-10.

[86] Carillon J, Romain C, Bardy G, Fouret G, Feillet-Coudray C, Gaillet S, Lacan D, Cristol JP, Rouanet JM. Cafeteria diet induces obesity and insulin resistance associated with oxidative stress but not with inflammation: improvement by dietary supplementation with a melon superoxide dismutase. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013 Dec;65:254-61.

[87] Johnson AR, Wilkerson MD, Sampey BP, Troester MA, Hayes DN, Makowski L. Cafeteria diet-induced obesity causes oxidative damage in white adipose. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016 473: 545-50.

[88] Gil-Cardoso K, Ginés I, Pinent M, Ardévol A, Terra X, Blay M. A cafeteria diet triggers intestinal inflammation and oxidative stress in obese rats. *British Journal of Nutrition*. 2017 Jan;117(2):218-29.

[89] Brunetti L, Leone S, Chiavaroli A, Orlando G, Recinella L, Ferrante C, Di Nisio C, Verratti V, Vacca M. Cafeteria diet increases prostaglandin E2 levels in rat prostate, kidney and testis. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2010 Oct-Dec;23(4):1073-8.

[90] Agarwal A, Mulgund A, Sharma R, Sabanegh E. Mechanisms of oligozoospermia: An oxidative stress perspective. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 2014, Aug 60(4), 206–16.

[91] Benedetti S, Tagliamonte MC, Catalani S, Primiterra M, Canestrari F, De Stefani S, Bulletti C. Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. *Reproductive BioMedicine Online*. 2012; 25(3), 300–6.

- [92] Haghighian HK, Haidari F, Mohammadi-Asl J, Dadfar M. A randomized, triple-blind, placebo-controlled clinical trial examining the effects of alpha-lipoic acid supplement on the spermatogram and seminal oxidative stress in infertile men. *Fertility and Sterility*. 2015; 104(2),318–24.
- [93] Wright C, Milne S, Leeson H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reproductive Biomedicine Online*. 2014 Jun;28(6):684-703.
- [94] Shrilatha B, Muralidhara. Occurrence of oxidative impairments, response of antioxidant defences and associated biochemical perturbations in male reproductive milieu in the Streptozotocin-diabetic rat. *International Journal of Andrology*. 2007 Dec;30(6):508–18.
- [95] Shrilatha B, Muralidhara. Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: its progression and genotoxic consequences. *Reproductive Toxicology*. 2007 Jun;23(4):578-87.
- [96] Mallidis C, Agbaje I, Rogers D, Glenn J, McCullough S, Atkinson AB, Steger K, Stitt A, McClure N. Distribution of the receptor for advanced glycation end products in the human male reproductive tract: prevalence in men with diabetes mellitus. *Human Reproduction*. 2007 Aug; 22(8):2169-77.
- [97] Agbaje IM, McVicar CM, Schock BC, McClure N, Atkinson Ab, Rogers D, Lewis SE. Increased concentrations of the oxidative DNA adduct 7,8-dihydro-8-oxo-2-deoxyguanosine in the germ-line of men with type 1 diabetes. *Reproductive BioMedicine Online*. 2008 Mar;16(3):401-9.
- [98] Abdelali A, Al-Bader M, Kilarkaje N. Effects of Trans-Resveratrol on hyperglycemia-induced abnormal spermatogenesis, DNA damage and alterations in poly (ADP-ribose) polymerase signaling in rat testis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2016; 311: 61-73.
- [99] Fullston T, Palmer nO, Owens JA, Mitchell M, Bakos HW, Lane M. Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice. *Human Reproduction* 2012. 27(5): 1391-400.
- [100] Fullston T, McPherson nO, Owens JA, Kang WX, Sandeman LY, Lane M. Paternal obesity induces metabolic and sperm disturbances in male offspring that are exacerbated by their exposure to an “obesogenic” diet. *Physiological Reports*. 2015 Mar;3(3). pii: e12336.
- [101] Sexton WJ, Jarow JP. Effect of diabetes mellitus upon male reproductive function. *Urology* 1997; 49: 508–13.
- [102] Ourique GM, Finamor IA, Saccol EM, Riffel AP, Pes TS, Gutierrez K, Gonçalves PB, Baldisserotto B, Pavanato MA, Barreto KP. Resveratrol improves sperm motility, prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defences in the testes of hyperthyroid rats. *Reproductive Toxicology*. 2013 Jun;37:31-9.
- [103] Faïd I, Al-Hussaini H, Kilarkaje N. Resveratrol alleviates diabetes-induced testicular dysfunction by inhibiting oxidative stress and c-Jun N-terminal kinase signaling in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2015;3:482-94.

- [104] Javkhedkar AA, Quiroz Y, Rodoriguez-Iturbe B, Vaziri ND, Lokhandwala MF, Banday AA. Resveratrol Restored Nrf2 Function, Reduced Renal Inflammation and Mitigated Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 2015 May;308(10):R840-6.
- [105] Bagul PK, Banerjee SK. Application of resveratrol in diabetes: rationale, strategies and challenges. *Current Molecular Medicine*. 2015;15:312–30.
- [106] Curtis SK, Amann RP. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. *Journal of Animal Science*. 1981 Dec;53(6):1645-57.
- [107] Jacobs S, Teixeira DS, Guilherme C, da Rocha CF, Aranda BC, Reis AR, de Souza MA, Franci CR, Sanvitto GL. The impact of maternal consumption of cafeteria diet on reproductive function in the offspring. *Physiology & Behavior*. 2014 Apr;22:129:280-6.

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



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do tratamento com resveratrol no sistema urogenital de ratos Wistar alimentados com dieta estilo cafeteria", registrada com o nº 49/2016, sob a responsabilidade de **Bianca Martins Gregório** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 29/11/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	29/11/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	20
Peso/Idade	45g / 21 dias
Sexo	Macho
Origem	Bioterio setorial

Rio de Janeiro, 29 de Novembro de 2016.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ

ANEXO B – Artigo elaborado da dissertação aceito pelo Asian Journal of Andrology

Fwd: Asian Journal of Andrology- Decision on Manuscript ID AJA-6464.R3 (Wenxiu)

From: **Asian Journal of Andrology** <onbehalf@manuscriptcentral.com>
 Date: 2018-07-03 23:55 GMT-03:00
 Subject: Asian Journal of Andrology- Decision on Manuscript ID AJA-6464.R3 (Wenxiu)
 To: bmgregorio.uerj@gmail.com

03-Jul-2018

Dear Dr Gregório:

Manuscript ID: AJA-6464.R3

Title: Resveratrol attenuates metabolic, sperm and testicular changes in adult Wistar rats fed a cafeteria dietary

It is our pleasure to accept your above manuscript for publication in Asian Journal of Andrology. We shall keep you well posted of the next publication process.

Before the next process, I would like to inform you of charges that will occur for the publication of your article.

1 Article Process Charge (APC).

4900 CNY 3 or fewer published pages;

9800 CNY 4-8 published pages;

1000 CNY Per page 8 + published pages.

If the first-order author in a certain article is the member of "AJA Club", a 10% discount for the APC can be offered. [This discount is not applied to charges for color page, figure modification and other extra charges]

2 Colour Charge. Colour art online only is free to authors. But it is necessary that the author's institution or funding agency defray the cost of color printing. The cost for colour photographs is 2500 CNY per page.

Please invite the corresponding author to fill in the Copyright License Form attached and return the scanned form to us by email in 48 hours.

Thank you for your fine contribution. We look forward to you and your colleagues' continued contributions to the Journal.

Best regards!

Sincerely,

(Document not available)

Science Editor, Asian Journal of Andrology

Editorial Office, Asian Journal of Andrology

Room 302, Building 16, 294 Tai-yuan Rd, Shanghai 200031, China

E-mail: aja@sibs.ac.cn Phone: 86-21-5492 2824

URL: <http://www.AsiaAndro.com>

Latest SCI impact factor: 2.996

1/5(Andrology);

22/76 (Urology & Nephrology)

Resveratrol attenuates metabolic, sperm and testicular changes in adult Wistar rats fed a diet rich in lipids and simple carbohydrate

Fabiana A. de Oliveira, Waldemar S. Costa, Francisco J. B. Sampaio, Bianca M. Gregorio*

Urogenital Research Unit, Biomedical Center, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 20551-030, Brazil

FAO carried out the conception and wrote the manuscript. WSC participated in the statistical analysis and interpretation. FJBS participated in its coordination. BMG conceived of the study and revised the manuscript.

Short title: Resveratrol improves testis parameters

* *Corresponding author: Bianca M. Gregorio, Unidade de Pesquisa Urogenital, Centro Biomédico, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Av. 28 de Setembro 87 (fds) 20551-030 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Phone: (+55 21) 2868-8021. E-mail: biancamgregorio.uerj@gmail.com; URL: www.urogenitalresearch.org*

Abstract

High fat diet affects the male reproduction and sexual function. So, we evaluated the effects of prolonged resveratrol administration on the metabolic, sperm and testicular parameters of rats fed a cafeteria diet. Male Wistar rats were divided at weaning into the control (C; n = 20) and cafeteria (CAF, n = 16) groups. At 3 months, half of them were given daily supplementations of resveratrol (C-R, n = 10; CAF-R, n = 8) at a dosage of 30 mg / kg body mass for 2 months. Animals were killed at 5 months of age, blood, spermatozoa and testes were collected for further analysis. Data were analyzed by one-way ANOVA, and $p < 0.05$ was considered significant. The CAF diet promoted hyperglycemia ($p < 0.0001$) and treatment with resveratrol reversed this condition ($p < 0.0001$). The CAF diet reduced sperm viability and motility, while resveratrol improved these parameters ($p < 0.05$). Regarding testicular morphology, the height of the seminiferous epithelium was reduced in the CAF group compared that C group ($p = 0.0007$). Spermatogenic cell proliferation was also reduced in the CAF group compared that C group. However, the CAF-R showed an increase in the cell proliferation rate compared that untreated CAF group ($p = 0.0024$). Although it did not modify body mass, the consumption of a CAF diet promoted hyperglycemia, adverse testicular morphology remodeling and abnormal sperm, which were attenuated by treatment with resveratrol that suggest a protective effect of this antioxidant on spermatogenesis.

Keywords: Cafeteria diet, Morphology, Resveratrol, Spermatozoa, Testicle.

Introduction

In recent years, the consumption of a hyperenergetic, highly palatable cafeteria-style diet (CAF diet) has been increasing in Western countries. This dietary pattern is associated with sedentarism and may be related to an increase in weight gain¹ and the appearance of some diseases, such as hyperinsulinemia, hyperglycemia and glucose intolerance.² The obesogenic and inflammatory effect of the CAF diet is likely produced by several mechanisms.³ The mechanism most discussed in the literature is that high-fat / refined

carbohydrate intake triggers an increase in the expression of some proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- α ⁴ and prostaglandin E2,⁵ in addition to increasing the production of reactive oxygen species (ROS).⁶

The association between the CAF diet, oxidative stress and the deterioration of male reproductive function is quite common.⁷⁻⁹ Oxidative stress from adiposity¹⁰ or from the CAF diet alone¹ exerts negative effects on sperm function.⁹ It has been reported that ROS and nitrogen species negatively interfere with testicular immunity, spermatogenesis and sperm motility.^{8, 11, 12} Therefore, it is necessary to create a balance between the production and metabolism of free radicals in order to improve the function of testicular cells. To achieve this balance, antioxidants can neutralize free radicals and attenuate damage to the testicles.⁹

Resveratrol is a polyphenol that is present in many food sources, has a potent inhibitory activity against ROS and increases the bioavailability of nitric oxide.¹³ Although many studies show that satisfactory results are achieved with the use of this antioxidant^{14, 15} no quantitative evaluation of the testicular parenchyma or sperm parameters has been performed in the proposed experimental model. It is important to study the sperm parameters in this same model. Therefore, this work aimed to evaluate the testicular morphology and the metabolic and sperm parameters of rats fed a CAF diet and treated with resveratrol.

Materials and methods

Experimental protocol

Thirty-six male Wistar rats (21 days old) were housed in polypropylene boxes in climatized colony rooms ($21 \pm 2^\circ\text{C}$; 60% humidity) on a 12/12 h light/dark cycle with an air exhaustion cycle (15 minutes / hour). All procedures were approved by the local Ethics Committee for the Care and Use of Animals (CEUA, IBRAG / 049/16). The animals were randomly divided into two experimental groups: the control diet (C, n = 20) (commercial diet Nuvilab®; 6 g lipid / 100 g diet, 1800 kJ) and the CAF diet (CAF, n = 16) (rat chow was manipulated in the laboratory by mixing the following: commercial diet Nuvilab® 60g / 100g, condensed milk (Nestle®) 25g / 100g and hydrogenated vegetable fat (Primor®) 15g / 100g; totaling 30 g lipid / 100 g diet, 2300 kJ). It is important to mention that this hydrogenated vegetable fat is rich in saturated fatty acids (3.5g/15g) and trans fatty acids (3.0g/15g). Rats from each group received their respective diet until they were 3 months old. At 3 months of age, the groups were re-divided, and treatment with resveratrol (Terraternal®, 99% purity, Santa Clara, CA, USA) was initiated, resulting in two additional experimental groups: the control diet supplemented with resveratrol (C-R; n = 10) and the CAF diet supplemented with resveratrol (CAF-R; n = 8). Resveratrol was administered daily through orogastric gavage at a dose of 30 mg / kg body mass¹⁶ for 2 months. The non-supplemented groups received water by orogastric gavage. All diets were given ad libitum. Food intake was recorded daily, and body mass (BM) was monitored weekly until the end of the experiment (5 months old).

Blood pressure and oral glucose tolerance test

At 3 months of age, systolic blood pressure (SBP) was measured weekly at night. The animals were heated in an acrylic chamber at a temperature of 37°C for 10 minutes to dilate the caudal artery. Next, the rats were packed in acrylic pads, and SBP was measured from the caudal artery using a tail plethysmograph version 2.11 (Insight®, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil). Three measurements were performed, and the final SBP value was obtained from the mean of the 3 measurements.

The oral glucose tolerance test (OGTT) was performed before (3 months old) and after resveratrol administration (5 months old). For this, the animals were fasted for 12 hours and subsequently a hypertonic glycosated solution (2 g glucose / kg BM to glucose 50%. This

percentage refers to the concentration of glucose in the solution) was administered by orogastric gavage. The blood was collected directly from the caudal vein before glucose administration (time 0) and 15, 30, 60 and 120 minutes after glucose overload, and the dose was verified by means of an appropriate glucometer (Accu-Chek, Roche, São Paulo, Brazil). To assess glucose tolerance, the area under the curve was analyzed.

Death of animals

At five months of age, the rats were killed by intraperitoneal administration of Thiopental at the dosage of 100 mg / kg. Immediately after death, blood was collected by cardiac puncture for subsequent biochemical analysis, and the tail of the epididymis was dissected and cleaved three times to remove the spermatozoa. Then, it immersed in 5 ml of phosphate-buffered saline with 0.5% bovine serum albumin (0.5% PBS-BSA) (A9647, Albumin from bovine serum, Sigma, Frederick, USA) at 37 ° C. Subsequently, the solution containing the tail of the epididymis was carefully shaken for dissemination of the spermatozoa from the organ to the liquid medium. The resulting solution, called the sperm suspension, was then used for all analyses of spermatozoa (concentration and motility in a Neubauer chamber; and sperm viability).¹⁶⁻¹⁸ All material used in the analyses was maintained at 37°C for the conservation of spermatozoa. We used 100 µl of the sperm solution, previously diluted (between 1 to 5 times) according to its turbidity, in order to facilitate the counting of the spermatozoa. This dilution was recorded and used in the final calculation to determine the concentration of spermatozoa. Then, 10 µL were collected from this solution and deposited on a Neubauer chamber, covered by cover slip. This sample was visualized in phase contrast and recorded by a Basler camera (Vision Technologie™®, Ahrensburg, Germany) coupled to an H550S microscope (Nikon, Tokyo, Japan) under magnification of 100x. From the videos, the sperm concentration was determined, counting the number of spermatozoa on 5 quadrants of the Neubauer chamber (recorded separately in 2 videos), making a total volume of 2×10^{-5} mL. Sperm viability was determined by the hypo-osmotic test, and 200 spermatozoa were evaluated per animal.¹⁹

Next, the testes were dissected and weighed, and their volume were determined by the Scherle method.²⁰ Then, the organs were fixed and included in paraffin.

Biochemistry and hormone levels

The concentrations of triacylglycerol (TAG), very-low-density lipoprotein (VLDL-c), high-density lipoprotein (HDL-c) and total cholesterol (TC) were determined by spectrophotometry with a commercially available kit (BioSystems®, cat. 11506, Barcelona, Spain). Serum insulin and testosterone levels were analyzed by the ELISA method with commercially available kits from Millipore® (cat. EZRMI-13K) in St. Charles, Missouri, USA and Cloud-Clone Corp.® (cat. CEA458Ge) in Wuhan, China, respectively. The samples were analyzed in duplicate and had a coefficient of variation of 1.4%.

Histomorphometry and Immunohistochemistry

After the tissues were processed, 5-µm-thick sections were cut. Morphometric analyses were performed of slides stained with hematoxylin and eosin and photographed with an Olympus BX51 light microscope with a coupled DP70 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan). The diameter of the seminiferous tubules and the height of the seminiferous epithelium were measured with ImageJ (image processing and analysis in Java) software. The diameter of 125 seminiferous tubules / animal (10x objective) was measured in each testicle with a perpendicular line that passed through the center of the tubule, excluding the less circular tubules. The height of the seminiferous epithelium was measured by constructing 3

equidistant lines from each transverse section of the seminiferous tubules. A total of 125 tubules / animal were evaluated with a 20x objective.

The volume density (Vv) of the tubular (tunica propria, seminiferous epithelium and tubular lumen) and intertubular (blood vessels and other interstitial space structures) compartments were measured by a point counting method. A grid of 100 points was superimposed on the photomicrographs, and all the testicular structures that touched the points were quantified, resulting in the density being determined as a percentage of the field analyzed.¹⁶ We evaluated 25 fields / animal with a 40x objective. The absolute volume (Av) was calculated from each structure mentioned above by dividing the testicular volume by the Vv of the structure; the result was expressed in mL.²¹ To determine the cell proliferation rate, all cell nuclei the spermatogenic lineage were immunolabelled with an anti-PCNA (proliferating cell nuclear antigen) antibody (PC10, Ref: 180110, Invitrogen, Camarillo, USA). The measurement was performed with a cell counter, and the quantification area was delimited to the free hand selection tool (ImageJ Software). For these analyses, 25 fields were evaluated for each testicle from photomicrographs obtained with a 40x objective. PCNA is essential for cellular DNA synthesis. Therefore it marks the nuclei of proliferating cells and it is not associated with any specific seminiferous stage. Through the immunohistochemical technique employed, all the proliferating spermatogenic lineage nuclei in the seminiferous tubules were immunolabelled and revealed by 3,3'-diaminobenzidine (DAB), which gave a brown color.

Data analysis

Data were reported as the mean $\pm$ standard deviation, and were analyzed by Student's t-test and one-way ANOVA, followed Bonferroni post-hoc test. Data that did not follow the normal distribution curve were analyzed by the Kruskal-Wallis test followed Dunn post-hoc test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Food intake and body mass

There were no differences in either BM or energy intake among the groups. Corroborating these results, the animals showed no differences in weight gain throughout the experiment.

The CAF diet promoted an increase in retroperitoneal fat (9.42 ± 3.27 g) compared that C group (5.03 ± 1.26 g, $p = 0.0042$). There were no differences in subcutaneous and epididymal fat deposits among the groups (Table 1).

Systolic blood pressure, carbohydrate metabolism and blood biochemistry

Table 2 shows the results from blood biochemistry and carbohydrate metabolism. SBP did not differ among the experimental groups. For OGTT, the CAF diet promoted glucose intolerance at three months of age, before the initiation of resveratrol treatment. The CAF group showed an increase of 17.5% in the area under the glucose curve compared that C group ($p < 0.0001$). In contrast, treatment with resveratrol was able to improve glycemic control compared that groups that did not receive resveratrol. The C-R group showed a reduction of 13.7% in the area under the glucose curve compared that the counterpart, while the CAF-R group had a 16.3% reduction in this parameter compared that their respective control (the CAF group) ($p < 0.0001$). Corroborating these results, the CAF group showed a 54.9% increase in serum glucose values compared those C group, while the CAF-R group reduced this parameter by 43.8% compared that CAF group ($p = 0.0023$). In addition, treatment with resveratrol decreased the insulinemia of the animals receiving the CAF diet.

The CAF-R group showed a 64.4% reduction of this parameter compared that untreated group ($p = 0.0001$). We did not observe any differences among the other groups studied.

Regarding the serum levels of TC, HDL-c and testosterone, there were no differences among the groups. However, the TAG and VLDL-c values were decreased 64.4% and 64.3% in the C-R group compared those values of the C group ($p = 0.0003$ and $p = 0.0025$, respectively). The CAF-R group presented an increase (188.0%) in the serum values of this lipoprotein (VLDL-c) compared C-R group ($p = 0.0025$), as illustrated in Table 2.

Sperm analysis and morphometry of the testicles

The group fed with cafeteria diet showed a reduction in the sperm viability (53.0%) and motility (80.6%) compared the C group ($p = 0.0052$ and $p < 0.0001$, respectively). However treatment with resveratrol was able to improve these parameters. The CAF-R group showed an increase of the sperm viability (117.7%) and the motility (340.3%) compared these levels in the CAF group ($p = 0.0052$; $p < 0.0001$, respectively). The concentration of spermatozoa was the same among the groups studied (Figure 1 and Table 3).

There were no differences in testes (weight and volume) among the animals from different experimental groups (Table 1). Similarly, the diameter of the seminiferous tubules was equal among the groups. Regarding the height of the epithelium of the seminiferous tubules, the group that received the cafeteria diet (without resveratrol treatment) showed a 33.8% reduction compared that C group ($p = 0.0007$) (Figure 2). In addition, the Vv of the seminiferous epithelium was lower in the CAF (11.5%), C-R (10.2%) and CAF-R (6.2%) groups than C group ($p < 0.0001$).

In contrast, treatment with resveratrol increased the Vv of the tubular lumen 20.1% (C-R) and 11.3% (CAF-R) compared that control group ($p < 0.0001$). However, after comparing the Vv of the tubular compartment as a whole, a reduction only in the CAF group was observed in relation to C group (4.5%), and treating with resveratrol raised this parameter 5.1%, in relation to their counterpart ($p < 0.0001$). There was no difference in the Vv of the tunica propria, the intertubular compartment (interstitial space), the blood vessels or the stroma among the groups. The Av of the tubular lumen was higher in the C-R group (21.3%) than in the C group ($p = 0.0074$). The other parameters were not different. For spermatogenic cell proliferation, the cafeteria diet reduced the number of cells (34.1%) compared that C group, and resveratrol treatment in the same group increased the rate of cell proliferation 87.9% (Figure 2). Table 3 details all morphometric and stereological data.

Discussion

Our work showed that the CAF diet was able to promote glucose intolerance and important morphological changes in the reproductive system, independent of an increase in BM. However, resveratrol improved carbohydrate metabolism, sperm parameters, such as motility and viability, and testicular morphology and may be a therapeutic option for promoting normal fertility.

The consumption of diets rich in lipids and simple carbohydrates (CAF diet) has increased in the Western world.²² Although not always associated with obesity / overweight,^{23,24} metabolic complications such as hypertension, dyslipidemia and hyperglycemia may result from the intake of these foods and aggravate the health status.²⁵ For these complications, the use of antioxidants, in particular resveratrol, has been identified as an important and useful tool against the metabolic damage incurred by this type of diet.²⁶⁻²⁹ Animals studies related that the doses used and the treatment time are crucial to show the beneficial effects of this antioxidant.^{28, 29} In our case, and corroborating other studies,^{23, 30} the CAF diet did not alter blood pressure, TC, HDL-c, TAG or VLDL-c concentration of the animals, and treatment with resveratrol reduced only the serum levels of TAG and VLDL-c in

animals receiving normal diets. Differences were not found in the CAF-R group undoubtedly, the time of administration and the composition of the experimental diets contributed to these results.

In contrast, the CAF diet promoted glucose intolerance at three and five months of age. However, at five months of age, treatment with resveratrol reduced serum glucose and insulin levels. The relationship between the CAF diet and hyperglycemia is well established. Over time, the prediabetic state overloads the pancreas and induces insulin resistance, further compromising carbohydrate metabolism.^{23, 25} However, resveratrol has been used to minimize this metabolic damage.^{31, 32} The use of this antioxidant in diabetic animals potentiates the action of insulin³³ and the uptake of peripheral glucose,^{32, 34} in addition to suppressing hepatic glucose production,³⁵ which justifies our findings.

Regarding reproductive parameters, the adverse effects associated with obesity and a high fat (HF) diet are extensively documented in the literature.^{36, 37} Studies involving cafeteria diet, although in a smaller quantity, show a relationship between increased oxidative stress and inflammation,^{1, 10, 38} and their role in negatively influencing testicular health has already been well described. Brunetti et al. demonstrated that the administration of the CAF diet in young patients promoted an increase in prostaglandin E2 levels of the testicular parenchyma, which may induce the disordered proliferation of testicular germ cells (cancer).⁵

Although we did not measure inflammatory indexes, our study is the first to show that, regardless of an increase in BM, CAF diet consumption reduced the viability and motility of spermatozoa and decreased both the height of the seminiferous epithelium and the proliferation of spermatogenic lineage cells. In addition, the morphology of the testis was altered, as showed by a reduction in the Vv of the seminiferous epithelium and of the whole tubular compartment. The deposits of retroperitoneal fat were higher in the CAF group, indicating a redistribution of fat mass. In humans, increased fat accumulation can lead to oxidative stress.^{39, 40} Recent advances in the field of reproductive medicine show that ROS contributes to sperm dysfunction and infertility.^{41, 42}

Although we did not evaluate oxidative stress at the tissue or systemic level, it has been documented that ROS affect sperm count, motility and morphology and cause sperm DNA fragmentation.^{41, 43-45} It has already been well established in the literature that the elevation of serum glucose levels induces increased oxidative stress in the male reproductive system, which causes apoptosis and degeneration of the germ cells, increased of lipid peroxidation of the sperm membrane and a reduction in spermatogenesis, contributing to male infertility.⁴⁶⁻⁵² Sexton & Jawron, in a review, indicate that diabetic individuals showed a reduction in spermatogenesis, sperm count and sperm motility.⁵³ From these findings, we believe that the hyperglycemia observed in our animals that received the CAF diet may have triggered in the increasing of ROS, and thus caused the sperm alterations. On the other hand, treatment with resveratrol is able to increase the synthesis and the activity of some antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase,^{14, 54-56} thus inhibiting oxidative stress in testicular cells.⁵⁰ In addition, other studies indicate that resveratrol improves insulin sensitivity and increases the translocation of the type 4 glucose transporter (GLUT4) in the skeletal muscle, which improves the uptake of glucose molecules^{50, 57} which corroborates our findings. In addition, we suggest that this antioxidant activated activating cell proliferation in spermatogenic lineage cells, which positively influenced and improved the aforementioned sperm parameters.

Sperm viability was determined from the hypo-osmotic test, which evaluates the integrity and function of the plasma membrane of this cell. Normally, spermatozoa that present tail folding are considered viable as a consequence of the entry of fluid into the intracellular environment.^{16, 19} The exposure to the HF diet promotes oxidative damage in the testis,

resulting in lipid peroxidation of the sperm membrane.^{51,52} Therefore, once again the CAF diet interfered negatively this sperm parameter, which was attenuated with resveratrol treatment.

Spermatogenesis can also be studied by testicular morphology.⁵⁸ Although we did not find differences in testicles weight or volume, seminiferous tubule diameter, Vv of the tunica propria, intertubular compartment (interstitial space), blood vessels, stroma or in serum testosterone concentrations, we did find that the CAF diet reduced the height of the seminiferous epithelium and was not affected by treatment with resveratrol. As in a HF diet, the CAF diet that we made in the laboratory is partially composed of cholesterol, a constitutive molecule of cellular membranes in animals. The increased intake of this type of the fat may have impaired the physical and chemical properties of the plasma membrane and thus compromised spermatogenesis. It is likely that the lack of a positive effect from resveratrol is linked to the time of the experiment. Perhaps, if we had increased the study time, this morphological alteration of the testicle might have been attenuated.

As mentioned previously, the Vv of the seminiferous epithelium was reduced in all experimental groups except for the control group. In addition, treatment with resveratrol promoted an increase in the Vv of the tubular lumen in both the control and CAF group. Interpreting these data separately is difficult, given the scarcity of works in the literature. However, when we evaluated the Vv of the tubular compartment as a whole, we observed that the CAF diet caused a reduction in this parameter compared that group fed a control diet; once again, treatment with resveratrol reversed this condition. The tubular compartment is fundamental for the occurrence of spermatogenesis. Germ and Sertoli cells are found in this compartment, and are responsible for regulating spermatogenesis and performing various functions in sperm production.^{59, 60} It is known that hyperenergetic diets can cause sperm damage.⁵¹ However, we did not know how the CAF diet affects testicular morphology or causes this damage. Recently evidence for a relation between reproduction and the CAF diet was presented by Bazzano et al., who showed that the consumption of a CAF diet from weaning to adulthood reduced reproductive capacity and altered ovarian function.³⁰ Likewise, fetal programming studies have shown that female offspring from animals fed a CAF diet have a deficient reproductive system, with or without increased abdominal fat, and have associated metabolic changes.⁶¹ Thus, we believe that the injury to the tubular compartment in our work is one of the main morphological alterations related to the impairment of spermatogenesis and reproductive function.

The consumption of a cafeteria-style diet, although it did not modify BM, promoted hyperglycemia and compromised spermatogenesis as demonstrated by alterations in testicular morphology and sperm parameters. Treatment with resveratrol was able to mitigate these damages, encouraging the scientific community to use it as adjunctive therapy in testicular cell dysfunction.

Authors' Contributions

FAO carried out the conception and wrote the manuscript. WSC participated in the statistical analysis and interpretation. FJBS participated in its coordination. BMG conceived of the study and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript, and agree with the order of presentation of the authors.

Competing Interests

None of the authors declare competing financial interests.

Acknowledgments

This research was supported by Brazilian agencies FAPERJ (E-26/010.002569/2014). We would like to thank Priscila Fernandes dos Santos for her technical assistance.

References

- 1 Gil-Cardoso K, Ginés I, Pinent M, Ardévol A, Terra X et al. A cafeteria diet triggers intestinal inflammation and oxidative stress in obese rats. *Br J Nutr* 2017; 117: 218-29.
- 2 Sampey PB, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemerman AJ, Muehlbauer et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 2011; 19: 1109-17.
- 3 Savastano MD, Covasa M. Adaptation to a high-fat diet leads to hyperphagia and diminished sensitivity to cholecystokinin in rats. *J Nutr* 2005; 135: 1953-59.
- 4 de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartman AL, Rutledge JC et al. Propensity to highfat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 299: 440-8.
- 5 Brunetti L, Leone S, Chiavaroli A, Orlando G, Recinella L et al. Cafeteria diet increases prostaglandin E2 levels in rat prostate, kidney and testis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010; 23: 1073-78.
- 6 Halliwell B, Zhao K, Whiteman M. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? *Free Radic Res* 2000; 33: 819-30.
- 7 Hosseinzadeh CA, Karimi F, Jorsaraei SG. Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels in astheno- and oligoasheno- teratospermic men. *Iran Red Crescent Med J* 2013; 15: 780-5.
- 8 Arafa M, Agarwal A, Al Said S, Majzoub A, Sharma R et al. Semen quality and infertility status can be identified through measures of oxidation-reduction potential. *Andrologia* 2017; in press .
- 9 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 Diagn Res* 2017; 11: IE01-IE05.
- 10 Carillon J, Romain C, Bardy G, Fouret G, Feillet-Coudray C et al. Cafeteria diet induces obesity and insulin resistance associated with oxidative stress but not with inflammation: improvement by dietary supplementation with a melon superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* 2013; 65: 254-61.
- 11 Doshi SB, Khullar K, Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive nitrogen species in male infertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2012; 10: 109.
- 12 Ko EY, Sabanegh ESJr, Agarwal A. Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertil Steril* 2014; 102: 1518-27.
- 13 Vitaglione P, Ottanelli B, Milani S, Morisco F, Caporaso N et al. Dietary trans-resveratrol bioavailability and effect on CCl4-induced liver lipid peroxidation. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 618-22.
- 14 Wang HJ, Wang Q, Lv ZM, Wang CL, Li CP et al. Resveratrol appears to protect against oxidative stress and steroidogenesis collapse in mice fed high-calorie and high cholesterol diet. *Andrologia* 2015; 47: 59-65.
- 15 Ramprasath VR, Jones PJ. Anti-atherogenic effects of resveratrol. *Eur J Clin Nutr* 2010; 64: 660-8.
- 16 Ribeiro CT, Milhomem R, de Souza DB, Costa WS, Sampaio FJ et al. Effect of antioxidants on outcome of testicular torsion in rats of different ages. *J Urol* 2014; 191: 1578-84.
- 17 Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *ILSI Risk*

- Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation. *Reprod Toxicol* 1996; 10: 237-44.
- 18 Motrich RDPA, Rivero VE. Effect of tamoxifen treatment on the semen quality and fertility of the male rat. *Fertil Steril* 2007; 88: 452-61.
- 19 Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; 70: 219-28.
- 20 Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* 1970; 26: 57-60.
- 21 Ariyaratne HB, Chamindrani Mendis-Handagama S. Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. *Biol Reprod* 2000; 62: 680-90.
- 22 Pranprawit A, Wolber FM, Heyes JA, Molan AL, Kruger MC. Short-term and long-term effects of excessive consumption of saturated fats and/or sucrose on metabolic variables in Sprague Dawley rats: a pilot study. *J Sci Food Agric* 2013; 93: 3191-97.
- 23 Higa TS, Spinola AV, Fonseca-Alaniz MH, Evangelista FS. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2014; 6: 47-54.
- 24 Castro H, Pomar CA, Sánchez J, Palou A. Cafeteria diet overfeeding in young male rats impairs the adaptive response to fed/fasted conditions and increases adiposity independent of body weight. *Int J Obes* 2015; 39: 430-7.
- 25 Gomez-Smith M, Karthikeyan S, Jeffers MS, Janik R, Thomason LA et al. A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. *Physiol Behav* 2016; 167: 382-91.
- 26 Pons Z, Margalef M, Bravo FI, Arola-Arnal A, Muguerza B. Chronic administration of grape-seed polyphenols attenuates the development of hypertension and improves other cardiometabolic risk factors associated with the metabolic syndrome in cafeteria diet-fed rats. *Br J Nutr* 2017; 117: 200-8.
- 27 Rivera L, Morón R, Zarzuelo A, Galisteo M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol* 2009; 77: 1053-63.
- 28 Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper RH, van de Weijer T et al. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab* 2011; 14: 612-22.
- 29 Gomez-Zorita S, Fernandez-Quintela A, Macarulla MT, Aguirre L, Hijona E et al. Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress. *Br J Nutr* 2012; 107: 202-10.
- 30 Bazzano MV, Torelli C, Pustovrh MC, Paz DA, Elia EM. Obesity induced by cafeteria diet disrupts fertility in the rat by affecting multiple ovarian targets. *Reprod BioMed Online* 2015; 31: 655-67.
- 31 Liu K, Zhou R, Wang B, Mi MT. Effect of resveratrol on glucose control and insulin sensitivity: a meta-analysis of 11 randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2014; 99: 1510-9.
- 32 Tan Z, Zhou LJ, Mu PW, Liu SP, Chen SJ et al. Caveolin-3 is involved in the protection of resveratrol against high-fat-diet-induced insulin resistance by promoting GLUT4 translocation to the plasma membrane in skeletal muscle of ovariectomized rats. *J Nutr Biochem* 2012; 23: 1716-24.
- 33 Szkudelski T, Szkudelska K. Resveratrol and diabetes: from animal to human studies. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852: 1145-54.

- 34 Chen LL, Zhang HH, Zheng J, Hu X, Kong W et al. Resveratrol attenuates high-fat diet-induced insulin resistance by influencing skeletal muscle lipid transport and subsarcolemmal mitochondrial β -oxidation. *Metabolism* 2011; 60: 1598-1609.
- 35 Burgess TA, Robich MP, Chu LM, Bianchi C, Sellke FW. Improving glucose metabolism with resveratrol in a swine model of metabolic syndrome through alteration of signaling pathways in the liver and skeletal muscle. *Arch Surg* 2011; 146: 556-64.
- 36 Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol* 2003; 21: 210-6.
- 37 Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int J Androl* 2011; 34: 402-10.
- 38 Johnson AR, Wilkerson MD, Sampey BP, Troester MA, Hayes DN et al. Cafeteria diet-induced obesity causes oxidative damage in white adipose. *Bioch Biophys Res Commun* 2016; 473: 545-50.
- 39 Vigueras-Villaseñor RM, Rojas-Castañeda JC, Chávez-Saldaña M, Gutiérrez-Pérez O, García-Cruz ME et al. Alterations in the spermatic function generated by obesity in rats. *Acta Histochem* 2011; 113: 214-20.
- 40 Aitken RJ, Jones KT, Robertson SA. Reactive oxygen species and sperm function in sickness and in health. *J Androl* 2012; 33: 1096-106.
- 41 Agarwal A, Mulgund A, Sharma R, Sabanegh E. Mechanisms of oligozoospermia: An oxidative stress perspective. *Sys Biol Reprod Med* 2014; 60: 206-16.
- 42 Chen H, Zhao HX, Huang XF, Chen GW, Yang ZX et al. Does high load of oxidants in human semen contribute to male factor infertility? *Antioxid Redox Signaling* 2012; 16: 754-9.
- 43 Benedetti S, Tagliamonte MC, Catalani S, Primiterra M, Canestrari F et al. Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. *Reprod BioMed Online* 2012; 25: 300-6.
- 44 Haghighian HK, Haidari F, Mohammadi-Asl J, Dadfar M. A randomized, triple-blind, placebo-controlled clinical trial examining the effects of alpha-lipoic acid supplement on the spermatogram and seminal oxidative stress in infertile men. *Fertil Steril* 2015; 104: 318-24.
- 45 Wright C, Milne S, Leeson H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reprod Biomed Online* 2014; 28: 684-703.
- 46 Shrilatha B, Muralidhara. Occurrence of oxidative impairments, response of antioxidant defences and associated biochemical perturbations in male reproductive milieu in the Streptozotocin-diabetic rat. *Int J Androl* 2007; 30: 508-18.
- 47 Shrilatha B, Muralidhara. Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: its progression and genotoxic consequences. *Reprod Toxicol* 2007; 23: 578-87.
- 48 Mallidis C, Agbaje I, Rogers D, Glenn J, McCullough S et al. Distribution of the receptor for advanced glycation end products in the human male reproductive tract: prevalence in men with diabetes mellitus. *Hum Reprod* 2007; 22: 2169-77.
- 49 Agbaje IM, McVicar CM, Schock BC, McClure N, Atkinson Ab et al. Increased concentrations of the oxidative DNA adduct 7,8-dihydro-8-oxo-2-deoxyguanosine in the germ-line of men with type 1 diabetes. *Reprod BioMed Online* 2008; 16: 401-9.
- 50 Abdelali A, Al-Bader M, Kilarkaje N. Effects of Trans-Resveratrol on hyperglycemia-induced abnormal spermatogenesis, DNA damage and alterations in poly (ADP-ribose) polymerase signaling in rat testis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2016; 311: 61-73.
- 51 Fullston T, Palmer NO, Owens JA, Mitchell M, Bakos HW et al. Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice. *Hum Reprod* 2012; 27: 1391-400.

- 52 Fullston T, McPherson NO, Owens JA, Kang WX, Sandeman LY et al. Paternal obesity induces metabolic and sperm disturbances in male offspring that are exacerbated by their exposure to an “obesogenic” diet. *Physiol Rep* 2015; 3: e12336.
- 53 Sexton WJ, Jarow JP. Effect of diabetes mellitus upon male reproductive function. *Urology* 1997; 49: 508–13.
- 54 Ourique GM, Finamor IA, Saccol EM, Riffel AP, Pes TS et al. Resveratrol improves sperm motility, prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defences in the testes of hyperthyroid rats. *Reprod Toxicol* 2013; 37: 31-9.
- 55 Faid I, Al-Hussaini H, Kilarkaje N. Resveratrol alleviates diabetes-induced testicular dysfunction by inhibiting oxidative stress and c-Jun N-terminal kinase signaling in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015; 3: 482-94.
- 56 Javkhedkar AA, Quiroz Y, Roderiguez-Iturbe B, Vaziri ND, Lokhandwala MF et al. Resveratrol Restored Nrf2 Function, Reduced Renal Inflammation and Mitigated Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2015; 10: R840-6.
- 57 Bagul PK, Banerjee SK. Application of resveratrol in diabetes: rationale, strategies and challenges. *Curr Mol Med* 2015; 15: 312–30.
- 58 Curtis SK, Amann RP. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. *J Anim Sci* 1981; 6: 1645-57.
- 59 França LR, Russell LD. The testis of domestic mammals. Male reproduction: a multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Communications Europe España; 1998.
- 60 Russell LD, Ettlin RA, Sinha AP, Clegg ED. Mammalian spermatogenesis. Histological and histopathological evaluation of the testis. Bolesta: Cache River Press; 1990.
- 61 Jacobs S, Teixeira DS, Guilherme C, da Rocha CF, Aranda BC et al. The impact of maternal consumption of cafeteria diet on reproductive function in the offspring. *Physiol Behav* 2014; 129: 280-6.

Table 1: Data of experimental groups at five months of age

<i>Fat deposits and Testicle</i>	C	CAF	C-R	CAF-R	p value
Retroperitoneal fat (g)	5.02±1.26	9.41±3.27 ^a	4.41±1.70	8.39±4.54	0.0042
Subcutaneous fat (g)	2.85±0.86	4.36±1.38	4.14±1.40	5.12±2.44 ^a	0.0322
Epididymal fat (g)	5.43±1.15	7.41±1.77	5.91± 1.74	6.35±3.05	0.2156
Right testicle weight(g)	1.859±0.16	1.882±0.11	2.026±0.21	1.954±0.15	0.1430
Right testicle volume(mL)	1.788±0.12	1.851±0.12	1.953±0.16	1.911±0.13	0.0706
Left testicle weight(g)	1.841±0.17	1.886±0.12	2.034±0.17	1.984±0.15	0.0707
Left testicle volume(mL)	1.803±1.80	1.836±1.83	1.914±1.91	1.955±1.95	0.2940

Legend: Data are presented as mean ± standard deviation. Differences were tested by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni post-test. p <0.05. [a] different from C group.

Table 2: Blood biochemistry

<i>Biochemical parameters</i>	C	CAF	C-R	CAF-R	p value
OGTT Before-resveratrol (u.a.)	746.00±44.80	876.40±65.90 ^a	-	-	<0.0001
OGTT After-resveratrol (u.a.)	745.00±42.84	869.50±67.21 ^a	643.10±33.12 ^a	728.00±58.09 ^b	<0.0001
Cholesterol total (mg/dL)	59.89±5.64	60.75±8.01	64.22±8.01	57.00±12.65	0.1810
Triacylglycerol (mg/dL)	85.60±29.51	103.80±38.69	30.44±12.89 ^a	66.38±41.76	0.0003
Glucose (mmol/L)	10.47±4.32	16.22±5.62 ^a	8.79± 2.56	9.12±2.45 ^b	0.0023
HDL (mg/dL)	38.90±7.01	40.44±7.00	35.44±6.44	33.80±6.26	0.1382
VLDL (mg/dL)	17.10±6.97	20.78±8.02	6.11±2.80 ^a	17.60±11.82 ^c	0.0025
Insulin (ng/mL)	3.92±1.58	6.37±0.75	2.22±0.79	2.27±1.95 ^b	0.0001
Testosterone (ng/mL)	10091.00±674.10	10298.00±1028.00	10962.00±1125.00	10655.00±1469.00	0.5202

Legend: Data are presented as mean ± standard deviation. The differences were tested by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni post-test. $p < 0.05$. [a] different from C group. [b] different from CAF group and [c] different from C-R group.

Table 3: Spermatozoa and testicles parameters

<i>Spermatozoa analyses</i>	C	CAF	C-R	CAF-R	p value
Concentration (x10 ⁴ Sptz/mL)	10.00±0.39	10.00±0.32	10.00±0.33	11.00±0.19	0.7832
Motility (%)	47.82±19.17	9.28±8.63 ^a	49.25±10.06	40.86±6.96 ^b	<0.0001
Viability (%)	7.10±3.24	3.33±2.33 ^a	7.38± 2.74	7.25±1.53 ^b	0.0052
<i>Morphometry and Stereology</i>					
Diameter of the seminiferous tubules(µm)	281.10±6.90	280.30±10.95	285.80±16.32	269.40±13.63	0.0720
Seminiferous epithelium Height(µm)	56.33±3.44	37.27±8.39 ^a	58.23±2.82	53.25±8.14	0.0007
Vv(%)	45.24±2.20	40.03±1.86 ^a	40.63±1.14 ^a	42.43±1.66 ^a	<0.0001
Av(mL)	0.83±0.06	0.73±0.05	0.78±0.09	0.81±0.06	0.0609
Tubular lumen					
Vv(%)	33.81±2.37	33.70±2.73	40.62±1.68 ^a	37.50±2.22 ^{a,b}	<0.0001
Av(mL)	0.61±0.09	0.62±0.06	0.74±0.11 ^a	0.72±0.072	0.0074
Tunica propria					
Vv(%)	5.99±1.34	6.51±1.25	5.03±0.78	5.92±0.88	0.0867
Av(mL)	0.10±0.02	0.12±0.03	0.09±0.02	0.11±0.01	0.1095
Tubular compartment					
Vv(%)	85.04±1.72	81.22±2.43 ^a	87.22±1.23	85.38±2.40 ^b	<0.0001
Av(mL)	1.54±0.17	1.49±0.10	1.65±0.26	1.65±0.12	0.1979
Blood vessels					
Vv(%)	0.72±0.29	0.63±0.09	0.70±0.38	0.98±0.39	0.1395
Av(mL)	0.01±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.01	0.0643
Stroma					
Vv(%)	7.92±0.89	7.92±0.76	7.29±0.69	7.92±0.99	0.2372
Av(mL)	0.14±0.02	0.15±0.01	0.13±0.02	0.15±0.01	0.4936
Intertubular compartment					
Vv(%)	8.65±0.99	8.54±0.47	7.75±0.54	8.56±0.78	0.0755
Av(mL)	0.15±0.02	0.16±0.01	0.14±0.02	0.17±0.02	0.2188
Cell proliferation (cels/mm ²)	102.00±352.70	1386.00±177.30 ^a	1750.00±278.50	2605.00±1436.00 ^b	0.0024

Legend: Data are presented as mean ± standard deviation. Differences were tested by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni post-test. p <0.05. Sptz indicate spermatozoa. [a] different from C group and [b] different from CAF group.

Figure 1

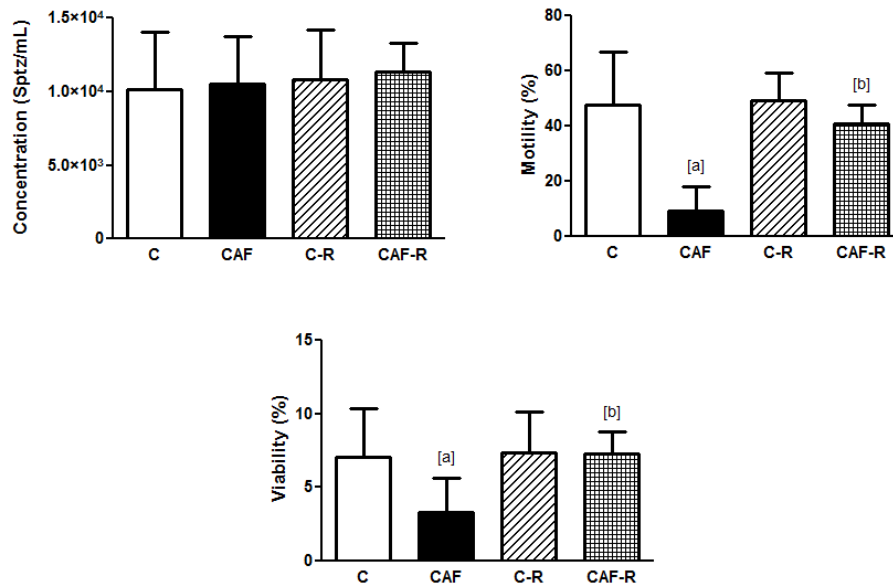


Figure 1: Sperm analysis. The image shows the concentration, the motility and the viability analysis of the spermatozoa in animals at five months of age, respectively. C (Control diet), CAF (Cafeteria diet), C-R (Control diet treated with Resveratrol) and CAF-R (Cafeteria diet treated with Resveratrol). Data were presented as mean $\pm$ standard deviation. The differences were tested by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni post-test. $p < 0.05$. [a] indicates statistical difference for the C group and [b] indicates statistical difference for the CAF group.

Figure 2

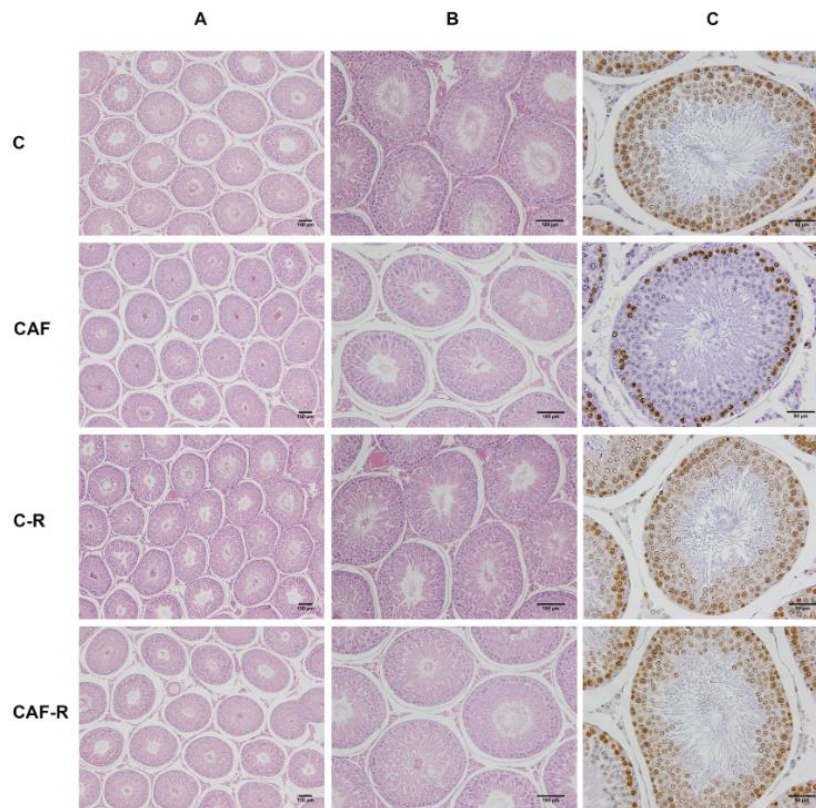


Figure 2: Photomicrographs showing the seminiferous tubule diameter (A; 100x), the seminiferous epithelium height (B; 200x) and the proliferation of a spermatogenic cell line (C; 400x) in animals at five months of age. C (Control diet), CAF (Cafeteria diet), C-R (Control diet treated with Resveratrol) and CAF-R (Cafeteria diet treated with Resveratrol). The seminiferous tubule diameter was similar among the groups. However, CAF diet reduced the height of the seminiferous epithelium and the proliferation of a spermatogenic cell line in relation to C, which may affect sperm production. The treatment of resveratrol attenuated this damage in proliferative cells, as observed in the anti-PCNA antibody-immunolabelled image.