



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

ALINE DE OLIVEIRA SANTOS

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE QUERCETINA E DA DIETA HIPERLIPÍDICA
NO ESTRESSE OXIDATIVO DE TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR**

Presidente Prudente – SP
2023



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

ALINE DE OLIVEIRA SANTOS

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE QUERCETINA E DA DIETA HIPERLIPÍDICA
NO ESTRESSE OXIDATIVO DE TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Ines Cristina Giometti

Presidente Prudente – SP
2023

636.089
S237e

Santos, Aline de Oliveira.

Efeito da suplementação de quercetina e da dieta hiperlipídica no estresse oxidativo de testículos de ratos Wistar / Aline de Oliveira Santos. – Presidente Prudente, 2023.

82f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal)
- Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2023.

Bibliografia.

Orientador: Ines Cristina Giometti.

1. Antioxidantes. 2. Catalase. 3. Espermatozoides.
4. Glutathione. I. Título.

ALINE DE OLIVEIRA SANTOS

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE QUERCETINA E DA DIETA HIPERLIPÍDICA
NO ESTRESSE OXIDATIVO DE TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR**

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

Pres Prudente, 26 de setembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ines Cristina Giometti
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste - Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Giovana Rampazzo Teixeira
Universidade Estadual Paulista – Unesp - Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Isabele Picada Emanuelli
Universidade UniCesumar - Maringá - PR

Prof. Dr. Hermann Bremer Neto
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste - Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Caliê Castilho
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste - Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

A Deus, que é a inteligência suprema, causa primária de todas as coisas.

A Jesus, meu mestre amado, que guia e ilumina meus caminhos.

A meu Anjo protetor, que me acompanha a cada dia dessa existência, me intuindo e orientando ao caminho do bem.

A minha mãe, que sempre esteve ao meu lado em tudo nessa existência.

A minha orientadora Ines, que desde antes do mestrado, esteve me ajudando, orientando, aconselhando e sendo uma grande amiga.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me manteve em pé, saudável, nesse período incerto, pandêmico que passamos, me fortalecendo, me dando esperanças nos pequenos detalhes da vida, me guiando nos momentos que eu mais precisei e renovando meus sonhos e minha fé.

A minha orientadora, Ines Cristina Giometti, que me orientou nesses 6 anos da pós graduação, meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos, pela disponibilidade em sempre dividir seu conhecimento, com dedicação, paciência e também obrigada pelo carinho e amizade.

A coordenação da pós graduação: Prof^o Anthony Castilho e a Prof^a Cecilia Laposy Santarém e ao colegiado, pelo excelente trabalho prestado ao programa de Pós Graduação em Ciência Animal.

A todos professores do programa Ciência Animal, em especial aqueles que dividiram conhecimento em aulas, nesses 4 anos do doutorado, aos queridos professores: Francis Pacagnelli, Vamilton Santarem, Rogerio Giuffrida, Caliê Silvestre, Marilice Astolphi e convidados.

Ao Prof^o Dr^o Luis Souza Lima de Souza Reis, por compartilhar e ceder os animais do seu experimento, para coletarmos o nosso material biológico e também por toda ajuda em dividir conhecimento acerca do assunto.

A querida amiga e técnica do Laboratório de Genética Molecular da Unoeste, Mayara Vidotto, que com sua ajuda, conseguimos realizar o experimento e várias técnicas laboratoriais do meu trabalho, sendo sempre dedicada, competente e carinhosa conosco.

A Prof^a Dr^a Glaura Scantamburlo Alves Fernandes, da UEL, pela ajuda em técnicas laboratoriais e por dividir seu conhecimento para auxiliar o meu experimento.

A Prof^a Dr^a Giovana Rampazzo Teixeira da Unesp e aos alunos da pós graduação, graduação e Iniciação Científica da Unesp, Alice Veras, Maria Eduarda Tavares, Rafael Correia e Vitor Garcia, pela ajuda em técnicas laboratoriais e também por compartilhar informações importantes, para o desenvolvimento do meu trabalho.

A todos os amigos que fiz na pós graduação, pois me proporcionaram ótimos momentos, os levarei em meu coração para sempre, aos queridos Luiz Gustavo Peron Martins e Regina Teixeira.

A minha amada Mãe Silvana Guarda, pela vida e pelo apoio e incentivo em toda minha fase estudantil e acadêmica, também a minha irmã Angela Ariane, pelo apoio, distração e risadas, e por recentemente ter me proporcionado uma das maiores alegrias que pude sentir, o nascimento do meu sobrinho lindo, amado e saudável Hilbert de Oliveira Martins e aos meus pets fofos, por me dar alegria e amor, todos os dias.

À Universidade do Oeste Paulista e ao Programa de Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal, por me proporcionar todo conhecimento adquirido em todos esses anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela bolsa de auxílio financeiro — Código de Financiamento 001.

“Ninguém é tão grande que não possa aprender,
nem tão pequeno que não possa ensinar.”

(Esopo)

RESUMO

Efeito da suplementação de quercetina e da dieta hiperlipídica no estresse oxidativo de testículos de ratos Wistar

A dieta hiperlipídica (HFD, "high-fat diet") em ratos provoca o surgimento de esteatose hepática e predispõe os animais à intolerância à glicose, dislipidemia e ao estresse oxidativo. Sabe-se que a HFD também afeta a fertilidade, causando estresse oxidativo testicular e prejudicando a produção espermática desses animais. A quercetina é um flavonoide que tem ação antioxidante, anti-inflamatória e lipolítica, sendo um potencial suplemento no combate ao estresse oxidativo provocado pela HFD e seus efeitos deletérios para a reprodução. O objetivo desse estudo foi avaliar a suplementação de quercetina em doses de 10 mg e 20 mg por dia nos pesos dos órgãos reprodutivos, na motilidade e morfologia espermáticos, na morfometria testicular, na expressão de genes inflamatórios e antioxidantes nos testículos e no perfil oxidativo testicular de modelos de ratos submetidos a uma dieta rica em gordura animal e frutose. O Capítulo I tem o objetivo de revisar os principais aspectos envolvendo a obesidade, a síndrome metabólica, as dietas ricas em lipídios e o estresse oxidativo na reprodução masculina, assim como abordar o que se sabe até o momento sobre a suplementação da quercetina como um agente antioxidante. Já o Capítulo II é um artigo nas normas da revista científica que será submetido e descreve um estudo experimental realizado com o objetivo de verificar o efeito da suplementação de quercetina no estresse oxidativo dos testículos de ratos submetidos a uma dieta rica em gorduras. Nesse experimento, 24 ratos Wistar foram divididos em 4 grupos experimentais (n=6): CT (ratos alimentados com dieta basal e suplementados com goma de 0 mg/dia de quercetina); HF (ratos alimentados com HFD, que consistia em adição de 30% de banha suína e 20% de frutose na ração comercial e suplementados com goma de 0 mg/dia de quercetina); HFQ10 (ratos alimentados com HFD e suplementados com goma de 10 mg/dia de quercetina); e HFQ20 (ratos alimentados com HFD e suplementados com goma de 20 mg/dia de quercetina). O experimento teve duração de 4 meses e a suplementação de goma de quercetina iniciou após dois meses de consumo de dieta basal ou HFD. Ao final do experimento, os testículos, epidídimos e ductos deferentes foram colhidos e pesados, os testículos foram

utilizados para expressão gênica, análise de perfil oxidativo e análises morfológicas. Os espermatozoides do ducto foram analisados para motilidade e morfologia espermáticas. Os grupos com HFD tiveram menor consumo da dieta e menores pesos corporal, de epidídimos e de ductos, independente da presença de quercetina. Não houve diferença entre os grupos no peso dos testículos, no diâmetro do epitélio germinativo, na motilidade e morfologia espermáticos e na expressão de genes inflamatórios testiculares ($P > 0,05$). Embora a expressão gênica de *Sod2* nos testículos tenha sido maior no grupo HF, houve redução do índice de estresse oxidativo e de glutathiona oxidada nos ratos do grupo HF20 quando comparado ao grupo HF. Conclui-se que a suplementação de quercetina diária reduz de forma dose- dependente o estresse oxidativo testicular em ratos submetidos à dieta hiperlipídica.

Palavras-Chave: antioxidantes; catalase; espermatozoides; glutathiona; MDA; TBARs.

ABSTRACT

Effect of quercetin supplementation and high-fat diet on oxidative stress in testicles of Wistar rats

A high-fat diet (HFD) in rats causes the appearance of hepatic steatosis and predisposes the animals to glucose intolerance, dyslipidemia and oxidative stress. It is known that a HFD also affects fertility, causing testicular oxidative stress and impairing sperm production in these animals. Quercetin is a flavonoid that has antioxidant, anti-inflammatory and lipolytic action, being a potential supplement in the fight against oxidative stress caused by a HFD and its deleterious effects on reproduction. The aim of this study was to evaluate quercetin supplementation at doses of 10 mg and 20 mg per day on reproductive organ weights, sperm motility and morphology, testicular morphometry, expression of inflammatory and antioxidant genes in the testes and testicular oxidative profile of rat models submitted to a diet rich in animal fat and fructose. Chapter I aims to review the main aspects involving obesity, the metabolic syndrome, diets rich in lipids and oxidative stress in male reproduction, as well as to address what is known so far about quercetin supplementation as an agent antioxidant. Chapter II is an article in the norms of the scientific journal that will be submitted and describes an experimental study carried out with the objective of verifying the effect of quercetin supplementation on the oxidative stress of the testicles of rats submitted to a diet rich in fats. In this experiment, 24 Wistar rats were divided into 4 experimental groups (n=6): CT (rats fed a basal diet and supplemented with 0 mg/day quercetin gum); HF (rats fed HFD, which consisted of adding 30% pork lard and 20% fructose to the commercial feed and supplemented with 0 mg/day of quercetin gum); HFQ10 (rats fed HFD and supplemented with quercetin gum 10 mg/day); and HFQ20 (rats fed HFD and supplemented with 20 mg/day quercetin gum). The experiment lasted 4 months and quercetin gum supplementation started after two months of consumption of basal diet or HFD. At the end of the experiment, the testes, epididymis and vas deferens were collected and weighed, the testes were used for gene expression, oxidative profile analysis and morphometric analysis. Duct spermatozoa were analyzed for sperm motility and morphology. The HFD groups had lower dietary intake and lower body, epididymal and ductal weights, regardless

of the presence of quercetin. There was no difference between groups in testes weight, germinal epithelium diameter, sperm motility and morphology, and expression of testicular inflammatory genes ($P>0.05$). Although Sod2 gene expression in the testes was higher in the HF group, there was a reduction in the oxidative stress index and oxidized glutathione in rats in the HF20 group when compared to the HF group. It is concluded that daily quercetin supplementation dose-dependently reduces testicular oxidative stress in rats fed a hiperlipidic diet.

Keywords: antioxidants; catalase; spermatozoa; glutathione; MDA; TBARs.

LISTA DE SIGLAS

AMPK	– Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
CAT	– Catalase
CDNB	– 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
COBEA	– Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CT	– Grupo controle
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
DNAse	– Desoxiribonuclease
DTNB	– Ácido 5,5'-ditiobis 20-nitrobenzóico
EROs	– Espécies reativas de oxigênio
GAPDH	– Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPx	– Glutaciona peroxidase
GR	– Glutaciona redutase
GSS	– Glutaciona sintetase
GST	– Glutaciona S-transferase
HDL-c	– Lipoproteína de alta densidade
HF	– Grupo de ratos com dieta hiperlipídica
HFD	– Dieta hiperlipídica (“high-fat diet”)
HFQ10	– Grupo de ratos com dieta hiperlipídica + 10 mg de quercetina
HFQ20	– Grupo de ratos com dieta hiperlipídica + 20 mg de quercetina
HPRT1	– Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase 1
H2O2	– Peróxido de hidrogênio
IEO	– Índice de estresse oxidativo
IFN γ	– Interferon gama
IL	– Interleucina
IMC	– Índice de massa corporal
LDLc	– Lipoproteína de baixa densidade
LH	– Hormônio luteinizante
MDA	– Malondialdeído
NADPH	– Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B	– Fator nuclear kappa B
Nrf-2	– Fator nuclear eritróide 2

Ob-R	– Receptor de Leptina
qPCR	– Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA	– Ácido ribonucleico
RPS18	– Proteína ribossômica S18
RT	– Transcrição reversa
SOD	– Superóxido dismutase
TBA	– Ácido tiobarbitúrico
TBARS	– Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico
TCDD	– Tetraclorodibenzo-p-dioxina
TNF α	– Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

	CAPÍTULO I.....	15
1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
	<i>Obesidade e Síndrome metabólica</i>	17
	<i>Dietas hiperlipídicas (HFD)</i>	18
	<i>Obesidade e dieta hiperlipíca x reprodução masculina</i>	19
	<i>Quercetina</i>	23
	<i>Quercetina e reprodução masculina</i>	25
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
	REFERÊNCIAS.....	29
	CAPÍTULO II	
	ARTIGO CIENTÍFICO NAS NORMAS DA REVISTA AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY.....	41
	ANEXO A- PARECER FINAL.....	67
	ANEXO B- NORMAS DE PUBLICAÇÃO.....	68

CAPÍTULO I

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE QUERCETINA E DA DIETA HIPERLIPÍDICA NO ESTRESSE OXIDATIVO DE TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR

1 INTRODUÇÃO

A obesidade tem aumentado consideravelmente nos últimos anos e poderá ser considerada uma pandemia (CRAIG *et al.*, 2017). O estilo de vida sedentário e o excesso de consumo de dietas ricas energeticamente têm contribuído para o desenvolvimento da obesidade e suas desordens associadas, resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e esteatose hepática (JANSSENS *et al.*, 2015; TAN; NORHAIZAN, 2019). As dietas ricas em gordura e a obesidade induzem a um estado de inflamação pela geração de tecido adiposo que secreta fatores pró-inflamatórios (TAN; NORHAIZAN, 2019). Como consequência, as células imunes ativadas produzem altos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), primariamente mediadas pelo fator nuclear kappa B (NF-κB) e pelas citocinas pró-inflamatórias (TAN; NORHAIZAN, 2019).

A infertilidade humana é um sério problema de saúde e atinge em torno de 10 a 15% dos casais do mundo todo (BEYGI *et al.*, 2021). Existem evidências epidemiológicas e com experimentos animais que a dieta hiperlipídica (HFD, “high-fat diet”) é negativamente correlacionada com a qualidade espermática (ESMAEILI *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2020). Sabe-se que os animais alimentados com dieta rica em gordura têm específicas mudanças na espermatogênese, como baixa concentração espermática e morfologia espermática anormal (FUNES *et al.*, 2019) e reduzidos movimento progressivo e motilidade (GHANAYEM *et al.*, 2010). Além disso, a dieta rica em gorduras trans e ácidos graxos saturados afetam negativamente na qualidade do sêmen (COLLODEL *et al.*, 2020).

As EROs são apontadas como uma das causas de infertilidade masculina idiopática, uma vez que o espermatozoide é bastante suscetível ao estresse oxidativo devido à grande quantidade de ácidos graxos insaturados em sua membrana celular (BEYGI *et al.*, 2021). O aumento de EROs combinado com a redução das defesas antioxidantes levam a uma redução na motilidade, danos no

DNA, perda da integridade de membrana, peroxidação lipídica e apoptose nas células espermáticas (ALAHMAR, 2017; BEYGI *et al.*, 2021).

A quercetina tem potencial no combate à obesidade, diminui os adipócitos e previne a formação de novos adipócitos, pela diminuição da adipogênese e pelo aumento da apoptose (AGUIRRE *et al.*, 2011). Em ratos com diabetes induzida, a quercetina diminui a inflamação e o estresse oxidativo nos testículos, aumentando a expressão gênica e a atividade de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) nos espermatozoides, enquanto os níveis de produtos de peroxidação lipídica e NF- κ B foram diminuídos (YELUMALAI *et al.*, 2019).

Devido às suas diferentes atividades biológicas, lipolítica, antioxidante e anti- inflamatória, a quercetina pode ser um candidato para a proteção testicular dos efeitos deletérios da HFD. O objetivo do primeiro capítulo foi revisar a influência da obesidade e da dieta nos parâmetros reprodutivos de machos, bem como o potencial da quercetina como suplemento para reduzir obesidade, estresse oxidativo e proteger a fertilidade masculina. Já o objetivo do segundo capítulo foi avaliar a suplementação de quercetina em doses de 10 e 20 mg/dia em parâmetros reprodutivos e de estresse oxidativo testicular de modelos de ratos submetidos à dieta rica em gordura animal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Obesidade e síndrome metabólica

A obesidade, definida como uma condição com elevado índice de massa corporal (IMC) $> 30\text{kg/m}^2$, tem aumentado nos últimos anos, aproximando-se a uma pandemia, afetando mais de 650 milhões de adultos com mais de 18 anos em todo o mundo (ESTIVALETI *et al.*, 2022). No Brasil, a prevalência da obesidade em adultos é de 25,9%, com maior prevalência entre indivíduos de níveis de escolaridade e socioeconômicos mais baixos (ESTIVALETI *et al.*, 2022).

A obesidade é considerada um estágio pró-inflamatório com produção de adipocinas e citocinas por adipócitos que resultam em um aumento na inflamação sistêmica (TSATSANIS *et al.*, 2015). Além disso, a obesidade acarreta em desenvolvimento do estresse oxidativo e está associada com diabetes, doenças cardiovasculares, hipertensão, câncer, risco aumentado de mortalidade e também infertilidade (HAMMOUD *et al.*, 2008a; KAHN; BRANNIGAN, 2017).

Há um consenso que a pessoa com síndrome metabólica apresenta três ou mais dos seguintes fatores de risco: hipertensão, alta glicemia, circunferência abdominal elevada, aumento de triglicerídeos no sangue e reduzidos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL-c) séricos (ALKHULAIFI; DARKOH, 2022).

De acordo com dados de 2009-2012, mais de 100 milhões de adultos nos Estados Unidos da América tiveram níveis de colesterol iguais ou maiores que 200 mg/dL e mais de 31 milhões tiveram níveis iguais ou maiores que 240 mg/dL (KOPIN; LOWENSTEIN, 2017). A hiperlipidemia envolve a alteração na concentração de colesterol sérico, incluindo a lipoproteína de baixa densidade (LDLc) e a HDLc (KARR, 2017).

A dislipidemia é o maior fator de risco de doença cardiovascular aterosclerótica (KOPIN; LOWENSTEIN, 2017). Estudos observacionais têm demonstrado uma forte e gradual relação entre os níveis maiores de LDL-c e/ou triglicerídeos e/ou menores níveis de colesterol total e/ou HDL-c com o aumento do risco para doenças cardíacas coronarianas ateroscleróticas (SAHEBKAR, 2017). A LDLc e a HDLc regulam a concentração de colesterol sanguíneo, pois a LDLc provoca o acúmulo de placas de ateroma nas artérias, associado ao risco de doença cardiovascular aterosclerótica, como infarto do miocárdio e derrame;

enquanto a HDLc remove o colesterol do sangue e se sua concentração estiver acima de 60 mg/dL diminui o risco de doença cardiovascular (KARR, 2017). Segundo dados epidemiológicos, a dislipidemia deve também contribuir com o risco de acidente vascular cerebral isquêmico (NICHOLLS; LUNDMAN, 2004).

A hiperlipidemia e o estresse oxidativo são os maiores fatores de risco para a aterosclerose e, juntos, podem levar ao desenvolvimento de doenças cardíacas (FIDÈLE *et al.*, 2017). Indivíduos com hiperlipidemia têm duas vezes mais risco de desenvolver doenças cardiovasculares que aqueles com níveis fisiológicos de colesterol sanguíneo (MOZAFFARIAN *et al.*, 2015). Vários fatores ambientais estão associados com o risco aumentado de hiperlipidemia, como uma dieta rica em gorduras saturadas ou trans, sedentarismo, o fumo e a obesidade (MOZAFFARIAN *et al.*, 2015).

A dieta tem um importante papel na prevenção de síndrome metabólica, quanto mais saudável for a alimentação, menor o risco de desenvolvimento de obesidade, de dislipidemia, de doenças cardiovasculares e de diabetes (ALKHULAIFI; DARKOH, 2022). É um desafio descobrir quais elementos da dieta aumentam os riscos de desenvolvimento de síndrome metabólica (ALKHULAIFI; DARKOH, 2022). Porém, sabe-se que uma dieta rica em gordura, muito frequente na sociedade atual, pode induzir doenças metabólicas por agir na função mitocondrial e induzir ao estresse oxidativo (MIGLIACCIO *et al.*, 2019).

Dietas hiperlipídicas (HFD)

O consumo de dietas ricas em gorduras e carboidratos, comumente chamadas de “fast food” ou “dietas ocidentais”, são cada vez mais frequentes na sociedade atual, porém predispõe à obesidade e às suas complicações (BAYLIAK *et al.*, 2022). Foi demonstrado que o alto teor de gordura e de açúcar na dieta pode também levar à modificação da microbiota intestinal tanto em humanos (WU *et al.*, 2011) quanto em animais (ZHANG *et al.*, 2012), causando distúrbios metabólicos como obesidade, diabetes, câncer, doença inflamatória intestinal e redução da fertilidade (DING *et al.*, 2020; TANOUE *et al.*, 2019).

O fígado é o principal órgão em mamíferos que lida com componentes alimentares absorvidos pelo organismo através do intestino e entregue pela veia

porta. Como resultado, o fígado é particularmente sensível ao tipo de alimento consumido e tornando-se gorduroso (esteatose hepática) com a HFD, além de sofrer com as consequências associadas, como o estresse oxidativo (EL-KADER, 2015; RECENA AYDOS *et al.*, 2019).

As dietas com excessiva quantidade de frutose e gorduras também levam à uma maior ativação do ciclo de Krebs no organismo que, conseqüentemente, aumenta o consumo de oxigênio, levando a uma excessiva produção de EROs como subprodutos do metabolismo oxidativo e ao desenvolvimento do estresse oxidativo (BAYLIAK *et al.*, 2022; GARCÍA-BERUMEN *et al.*, 2019).

Devido ao aumento de EROs provocado pelas dietas ricas em gordura, ocorre disfunção mitocondrial, gerando alterações metabólicas que podem levar ao desenvolvimento de distúrbios em vários órgãos, incluindo os testículos (MIGLIACCIO *et al.*, 2019). Por isso que as drogas e produtos naturais com atividade anticolesterêmica também possuem atividade antioxidante (FIDÈLE *et al.*, 2017).

As EROs induzem o estresse oxidativo quando excedem a capacidade de eliminação pelo corpo ou quando há a diminuição das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT), glutathione sintetase (GSS) e glutathione S-transferase (GST) (MOORE, 2008).

A HFD e a obesidade são conhecidas por causar estresse oxidativo em vários tecidos e também nos testículos de roedores e humanos (BAKOS *et al.*, 2011; BAYLIAK *et al.*, 2022; HAO *et al.*, 2022; ZHAO *et al.*, 2014). A HFD pode afetar a reprodução masculina pelo aumento do estresse oxidativo, pela alteração nos ácidos graxos na membrana espermática ou ainda pela alteração da microbiota intestinal (DING *et al.*, 2020; ESMAEILI *et al.*, 2015; MIGLIACCIO *et al.*, 2019).

Obesidade e dieta hiperlipíca x reprodução masculina

O aumento da obesidade no mundo tem sido paralelamente associado ao aumento da infertilidade e à pobre qualidade espermática (KATIB, 2015; SWAN; ELKIN; FENSTER, 2000). A comunidade científica busca evidências relacionando a obesidade com as alterações na espermatogênese (DESHPANDE *et al.*, 2019; FUNES *et al.*, 2019; PUSHPENDRA; JAIN, 2015). Sabe-se que a obesidade causa

redução na concentração espermática (HAMMOUD *et al.*, 2008a) e maior risco de oligozoospermia (CRAIG *et al.*, 2017; HAMMOUD *et al.*, 2008b). Em estudo avaliando 27 casais com problemas de fertilidade, a incidência de obesidade foi três vezes maior no grupo em que a causa da infertilidade eram os homens com motilidade e concentração espermáticas anormais (MAGNUSDOTTIR *et al.*, 2005).

Os mecanismos pelos quais a obesidade pode afetar a espermatogênese são multifatoriais e incluem aumento do calor testicular, perturbações hormonais como hiperestrogenismo e hipogonadismo hipogonatrófico, diabetes mellitus, disfunção sexual, perturbações na epigenética espermática, aumento do estresse oxidativo pelo aumento das EROs (CRAIG *et al.*, 2017; KAHN; BRANNIGAN, 2017), alteração na função da célula de Sertoli e, eventualmente, a saúde reprodutiva masculina (CRISÓSTOMO *et al.*, 2018).

Aproximadamente 79% dos homens que relatam sofrer de disfunção erétil são obesos (FELDMAN *et al.*, 2000). A relação entre obesidade e disfunção erétil é multifatorial, mas sofre a influência da diminuição dos níveis de testosterona e da elevação dos mediadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucina 6 (IL6) (ARAÑA ROSAÍNIZ *et al.*, 2011; CRAIG *et al.*, 2017).

Embora a suplementação de carboidratos e proteínas na dieta não afetem de forma significativa a reprodução masculina (ESLAMIAN *et al.*, 2012), estudos demonstraram que a dieta rica em gorduras trans e ácidos graxos saturados afetam negativamente na qualidade do sêmen de homens e animais (ALIZADEH *et al.*, 2014; CHAVARRO *et al.*, 2014; COLLODEL *et al.*, 2020; ESLAMIAN *et al.*, 2016). Os níveis de lipídeos no soro afetam os parâmetros espermáticos, demonstrando a importância da homeostase lipídica e do colesterol para a fecundidade masculina (FUNES *et al.*, 2021). Os defeitos espermatogênicos são preventivamente reduzidos com a redução de gordura na dieta e suplementação com óleo de oliva (SIMÓN *et al.*, 2017, 2018).

Sabe-se que os animais alimentados com HFD têm específicas mudanças na espermatogênese, como reduzidos movimento progressivo e motilidade (GHANAYEM *et al.*, 2010), baixa concentração espermática, morfologia espermática anormal (FUNES *et al.*, 2019), aumento das EROs e de dano ao DNA espermático (BAKOS *et al.*, 2011). Além disso, a HFD também induz alterações na microbiota intestinal e aumento de endotoxinas sanguíneas, como consequência, há diminuição da qualidade do sêmen e da motilidade, com aumento

das anormalidades espermáticas, inflamação do epidídimo e reduzida expressão de genes envolvidos na meiose e na função da mitocôndria em testículos (DING *et al.*, 2020).

O processo de espermatogênese consiste em uma sequência de fases (mitótica e meiótica) e diferenciação (espermiogênese), as gotículas lipídicas aumentam nas células espermáticas (OSUGA *et al.*, 2000) e ocorrem alterações lipídicas nas membranas das células de Sertoli ao longo da espermatogênese (SHI *et al.*, 2017). Os ácidos graxos acumulam-se nessas células espermáticas por difusão passiva através da bicamada lipídica e/ou por transporte facilitado pela glicoproteína CD36, que é amplamente expressa em células de Sertoli (RATO *et al.*, 2014). Além disso, os lipídios da membrana das células germinativas são compostos principalmente de colesterol, fosfolipídios e glicolipídios, que desempenham papéis críticos na adesão celular e sinalização durante a espermatogênese (COLLODEL *et al.*, 2020). Isso demonstra uma íntima associação entre alterações no metabolismo lipídico e fertilidade (COLLODEL *et al.*, 2020).

A obesidade interfere também no último estágio da espermatogênese (espermiogênese) (MA *et al.*, 2019; RUFUS; JAMES; MICHAEL, 2018; VERÓN *et al.*, 2018). As alterações no processo de espermiogênese levam a significativos defeitos de cabeça nos espermatozoides de mamíferos (FUNES *et al.*, 2019). O estresse oxidativo e a inflamação tem um papel no acúmulo de colesterol nos testículos que levam a uma desorganização do citoesqueleto durante a espermiogênese (FUNES *et al.*, 2019). As más-formações de cabeça têm sido descritas em coelhos e roedores alimentados com HFD (FAN *et al.*, 2015; PUSHPENDRA; JAIN, 2015; SAEZ LANCELOTTI *et al.*, 2010; SIMÓN *et al.*, 2017).

Como consequência das alterações na morfologia espermática, ao estresse oxidativo e também à inflamação, os ratos (FERNANDEZ *et al.*, 2011) e camundongos (GHANAYEM *et al.*, 2010) alimentados com HFD, e também os homens obesos (HAMMOUD *et al.*, 2008b) apresentam redução na motilidade espermática, com diminuição da porcentagem de espermatozoides com movimento progressivo.

Mesmo sem doença orgânica na unidade hipófise-hipotálamo, há uma prevalência de hipogonadismo secundário em homens obesos (HOFSTRA *et al.*,

2008; MAMMI *et al.*, 2012). Os homens obesos têm reduzida concentração de testosterona plasmática (HOFSTRA *et al.*, 2008) e a espermatogênese é fortemente correlacionada com a produção de andrógenos (ZHAO *et al.*, 2014). As alterações na concentração sérica de testosterona livre dependem do IMC, homens com moderada obesidade (IMC de 30 a 35) tem níveis fisiológicos de pulsatilidade de LH e testosterona livre, enquanto homens com obesidade severa (IMC \geq 40) tem diminuição dos níveis de LH, da amplitude de LH e da testosterona livre (GIAGULLI; KAUFMAN; VERMEULEN, 1994). A inibição do eixo hipotalâmico-hipófise-gonadal se dá por retroalimentação negativa causada pela elevação do estradiol, que por sua vez, está aumentado devido à aromatização da testosterona nos tecidos adiposos periféricos, o tecido adiposo produz proteínas ativas hormonalmente no metabolismo e saciedade (KLEY *et al.*, 1980; TSATSANIS *et al.*, 2015).

Os modelos animais têm sido usados com frequência para entender os problemas de infertilidade humana e desenvolver estratégias de tratamento (ZELENA, 2015). Alterações reprodutivas em murinos alimentados com dieta rica em lipídios também foram evidenciadas, como danos nas células de Leydig, com aumento de apoptose, diminuição na concentração de espermatozoides epididimários (ZHAO *et al.*, 2014), aumento das EROs intracelulares com maior dano no DNA do esperma (BAKOS *et al.*, 2011) e menores taxas de fertilização (BAKOS *et al.*, 2011). Durante o estresse oxidativo, as EROs levam a uma sobrecarga das defesas antioxidativas da célula levando a dano e morte celular em que os espermatozoides são particularmente vulneráveis (MAHFOUZ *et al.*, 2010).

Os ratos alimentados com HFD apresentaram aumento nos níveis de estradiol, além de redução na qualidade espermática e na porcentagem de espermatozoides com movimento progressivo (FERNANDEZ *et al.*, 2011). Este parâmetro de motilidade alterado foi seguido por uma tendência de redução do potencial de fertilidade após a inseminação artificial no útero (FERNANDEZ *et al.*, 2011).

O número de espermatozóides ligados a cada oócito foi significativamente menor em animais com HFD, resultando em taxas de fertilização significativamente mais baixas. Essas alterações podem ser resultado da peroxidação lipídica dos espermatozóides, evidenciando que a obesidade pode induzir ao estresse oxidativo e danos no DNA do esperma, bem como diminuição da capacidade de fertilização (BAKOS *et al.*, 2011).

Zhao *et al.* (2014) demonstraram uma diminuição de testosterona plasmática e aumento de leptina em camundongos alimentados com HFD. A leptina é um hormônio plasmático secretado por adipócitos que regula a ingestão alimentar, o gasto energético e o peso. A leptina é inversamente proporcional à testosterona, a leptina inibe a expressão de vários genes de enzimas esteroidogênicas (SF-1, StAR e P450scc), podendo inibir a produção de testosterona testicular, pois o gene do receptor de leptina (*Ob-R*) é expresso no testículo (TENA-SEMPERE *et al.*, 2001). Há a alteração na expressão de diversos genes importantes à reprodução em camundongos alimentados com dieta rica em lipídios, demonstrando que a expressão desses genes é igualmente impactada pela dieta (GHANAYEM *et al.*, 2010).

Há uma limitação no uso de drogas hipolipemiantes no quesito segurança, os principais agentes utilizados (estatinas e fibratos) podem causar efeitos adversos como miopatia e hepatotoxicidade (GOLOMB; EVANS, 2008; SCHWEITZER *et al.*, 2020; VRABLIK *et al.*, 2014). Por isso, a importância da busca por novos agentes hipolipemiantes (como agentes dietéticos naturais) que possam ser utilizados em indivíduos que não toleram altas doses nesses medicamentos.

Quercetina

Uma das maiores fontes de flavonoides da dieta é a quercetina (HOOPER *et al.*, 2008), que está presente em frutas, vegetais, vinhos e chás (DENIS *et al.*, 2013; SAHEBKAR, 2017). A quercetina é um antioxidante que age inibindo a peroxidação lipídica, eliminando radicais livres e quelando cátions bivalentes que tem função primordial na formação de radicais livres (AHERNE; O'BRIEN, 2000; JAHAN *et al.*, 2016; KOBORI, 2014). A quercetina exibe uma variedade de atividades biológicas, incluindo atividade antiviral, antibacteriana, anti-inflamatória, anticancerígena (AHERNE; O'BRIEN, 2000).

A quercetina é um flavonoide com potencial no combate à obesidade, devido aos seus efeitos na lipólise, similares aos da epinefrina e também diminui os adipócitos, pela diminuição da adipogênese e aumento da apoptose (AGUIRRE *et al.*, 2011). Presente em frutas e vegetais, como maçãs, frutas vermelhas, cebolas, alcaparras, couve e brócolis, é um polifenol comum da alimentação humana

(USDA, 2015), sua ingestão é de aproximadamente 10 mg/dia (KAWABATA; MUKAI; ISHISAKA, 2015).

A quercetina acelera o metabolismo ajudando a reduzir o número de células de gordura e prevenindo a formação de novas células. Também aumenta os níveis de adiponectina, um hormônio fundamental que estimula o metabolismo do açúcar no sangue e a atividade da enzima AMPK, encarregada de promover a queima de gordura de forma saudável (WEISBERG *et al.*, 2003).

A quercetina também tem propriedade antioxidante, pois age inibindo a peroxidação lipídica, eliminando radicais livres e quelando cátions bivalentes que tem função primordial na formação de radicais livres (AHERNE; O'BRIEN, 2000; JAHAN *et al.*, 2016; KOBORI, 2014). A quercetina em algumas condições patológicas tem o efeito de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes (LIU *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2014). Foi demonstrado que a quercetina inibe de forma potente a sulfatação hepática (inibição não competitiva) e duodenal do Resveratrol, aumentando sua biodisponibilidade no organismo (DE SANTI *et al.*, 2000).

Devido ao potencial antioxidante da quercetina, possui também efeitos benéficos em doenças cardiovasculares, câncer, infecções, processos inflamatórios, função do trato gastrointestinal, diabetes e desordens do sistema nervoso (COSTA *et al.*, 2016), apresentando uma variedade de atividades biológicas, incluindo atividade antiviral, antibacteriana, anti-inflamatória, anticancerígena (AHERNE; O'BRIEN, 2000).

A suplementação com quercetina pode aumentar significativamente a concentração, pois sua meia vida é de 11 a 28 horas (COSTA *et al.*, 2016). A sua suplementação em camundongos levou a uma redução dos marcadores de inflamação, interferon gama (IFN γ), TNF α , IL1 e IL4, depois de oito semanas de tratamento (STEWART *et al.*, 2008). Além disso, a suplementação com quercetina em ratos Wistar suprimiu a expressão de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, incluindo fator nuclear kappa B (NF- κ B), o nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf-2) e heme oxigenase (PANCHAL; POUDYAL; BROWN, 2012). Em outro estudo, a quercetina foi testada em duas doses (2 ou 10 mg/kg de peso corporal) em ratos Zucker obesos (um modelo genético de rato obeso), ambas as doses diminuíram a dislipidemia, a hipertensão e a hiperinsulenemia, porém só a maior dose melhorou o status do tecido adiposo visceral pela supressão da expressão do TNF α e aprimorou os níveis de adiponectina, o que indica

recuperação das funções do tecido adiposo (RIVERA *et al.*, 2008).

A quercetina é distribuída para vários tecidos, particularmente pulmão, rim, cólon, fígado e testículo, com níveis mais baixos no cérebro (DE BOER *et al.*, 2005). A diferença entre a concentração de quercetina nos testículos e no cérebro é intrigante, ambos têm barreiras específicas, mas o testículo está entre os órgãos com maiores níveis de quercetina (DE BOER *et al.*, 2005).

Quercetina e reprodução masculina

A quercetina protege contra o estresse oxidativo induzido por uma variedade de substâncias químicas tóxicas para o sistema reprodutor masculino, como atrazina (ABARIKWU; PANT; FAROMBI, 2013), cádmio (FAROMBI *et al.*, 2012a), docetaxel (ALTINTAS *et al.*, 2015), bifenil policlorado (LOVATO *et al.*, 2016), sulfasalazina (OSAWA; FAROMBI, 2018), bisfenol A (SAMOVA; DOCTOR; VERMA, 2018), 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), um composto utilizado em agrotóxicos (CIFTCI *et al.*, 2012), por sulfasalazina, um antiinflamatório que causa estresse oxidativo como efeito colateral (OSAWA; FAROMBI, 2018) e antineoplásico letrozole (SELIM; ALEISA; DAGHESTANI, 2013) em ratos como modelo experimental.

O tratamento com quercetina (100 mg/Kg) na água dos animais foi capaz de prevenir a deposição de arsênico ingerido nos testículos de ratos e impedir o dano no DNA dos espermatozoides provocado pelo arsênico, aumentando a produção diária de espermatozoides (JAHAN *et al.*, 2016), também foi efetiva na prevenção do dano testicular, do estresse oxidativo e da redução de testosterona provocados pelo arsênico e aumentou as enzimas antioxidativas (JAHAN *et al.*, 2015).

Tem sido demonstrado que a quercetina aumenta a quantidade e a motilidade de espermatozoides, estimula órgãos reprodutivos e aumento a sobrevivência de espermatozoides criopreservados (AL-ROUJAYEE, 2017; ARDESHIRNIA; ZANDI; SANJABI, 2017; MORETTI *et al.*, 2012; SEIFI-JAMADI *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018; TAEPONGSORAT *et al.*, 2008; YOSHIMOTO; TAKEO; NAKAGATA, 2017).

Entretanto, tem sido reportado também que a quercetina tem efeito negativo no número de filhotes da ninhada de camundongos (BEAZLEY;

NURMINSKAYA, 2016).

Em ratos com diabetes induzida, que receberam quercetina oralmente nas doses de 25 e 50 mg/Kg, houve um aumento da concentração, motilidade e viabilidade dos espermatozoides e preservação da membrana espermática, além disso, a morfologia espermática anormal foi diminuída (YELUMALAI *et al.*, 2019). As caudas enroladas nos ratos diabéticos sugerem que a diabetes causou danos na integridade de membrana espermática que foram reduzidos pela quercetina (YELUMALAI *et al.*, 2019).

Além disso, a quercetina ainda mostrou-se eficaz em reduzir o estresse oxidativo (KANTER; AKTAS; ERBOGA, 2012) e a inflamação nos testículos de ratos com diabetes induzida, pois a quercetina aumentou a expressão gênica e a atividade de SOD, CAT e glutathione peroxidase (GPx) nos espermatozoides, enquanto os níveis de produtos de peroxidação lipídica, NF-κB foram diminuídos (YELUMALAI *et al.*, 2019). Os espermatozoides de diabéticos são altamente suscetíveis ao dano causado pelas EROS, já que a membrana do espermatozoide contém altas quantidades de ácidos graxos poli-insaturados (LA VIGNERA *et al.*, 2012; RAMALHO-SANTOS; AMARAL; OLIVEIRA, 2008). Adicionalmente, a alta concentração de produtos glicolíticos pode interagir com lipídeos e proteínas específicas de membrana, que podem aumentar a produção de EROS (AITKEN; DE IULIIS; MCLACHLAN, 2009; DELFINO *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo tem um papel central na infertilidade masculina (AGARWAL; MAKKER; SHARMA, 2008). Redução na espermatogênese pode ser devido ao acúmulo de EROS que causam danos na integridade do epitélio seminífero e nos constituintes da camada germinativa, resultando em baixa contagem espermática (JAHAN *et al.*, 2015). O estresse oxidativo danifica a flexibilidade da membrana plasmática e também afeta o DNA nuclear dos espermatozoides (FAROMBI *et al.*, 2012b).

A quercetina adicionada *in vitro* no meio de cultivo dos espermatozoides de ratos tem um papel na prevenção dos efeitos adversos produzidos por peróxido de hidrogênio e aumenta as defesas antioxidantes, aumentando a atividade das enzimas oxidantes e diminuindo a peroxidação lipídica (BEN ABDALLAH; ZRIBI; AMMAR- KESKES, 2011). Além disso, melhorou a viabilidade e a motilidade espermáticas (BEN ABDALLAH; ZRIBI; AMMAR-KESKES, 2011).

Quando a quercetina foi adicionada no meio de criopreservação do

espermatozoide humanos melhorou a motilidade espermática, a viabilidade e diminuiu o dano no DNA (ZRIBI *et al.*, 2012). Também se mostrou efetiva em inibir dano oxidativo na criopreservação de espermatozoides de outras espécies, como carneiro (TAYLOR *et al.*, 2009), cavalos (GIBB *et al.*, 2013) e coelhos (JOHINKE; DE GRAAF; BATHGATE, 2014).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A quercetina é um flavonoide com ação antioxidante e anti-inflamatória que pode ser considerada como opção de suplemento para prevenir danos celulares por estresse oxidativo decorrente da ingestão de HFD. É importante a avaliação do quão prejudicial é a HFD para os testículos e espermatogênese e se a suplementação de doses diferentes de quercetina pode prevenir os efeitos deletérios dessa dieta. Por isso, o capítulo II é um experimento pré-clínico em ratos para avaliar os efeitos da HFD e da suplementação de quercetina.

REFERÊNCIAS

- ABARIKWU, S. O.; PANT, Aditya B.; FAROMBI, Ebenezer O. Quercetin decreases steroidogenic enzyme activity, NF- κ B expression, and oxidative stress in cultured Leydig cells exposed to atrazine. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [S. l.], v. 373, n. 1–2, p. 19–28, 2013. DOI: 10.1007/s11010-012-1471-z.
- AGARWAL, A.; MAKKER, K.; SHARMA, R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. **American journal of reproductive immunology**, [S. l.], v. 59, p. 2–11, 2008. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2007.00559.x.
- AGUIRRE, L.; ARIAS, N.; MACARULLA, M. T.; GRACIA, A.; PORTILLO, M. P. Beneficial effects of quercetin on obesity and diabetes. **The Open Nutraceuticals Journal**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 189–198, 2011. DOI: 10.2174/1876396001104010189.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 29, n. 6, p. 507–514, 2000. DOI: 10.1016/S0891-5849(00)00360-9.
- AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; MCLACHLAN, R. I. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. **International Journal of Andrology**, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2008.00943.x.
- AL-ROUJAYEE, A. Improvement of sexual behavior, sperm quantity and quality by Quercetin in streptozotocin-induced diabetic erectile dysfunction. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, 2017. DOI: 10.12980/apjr.6.20170102.
- ALAHMAR, A. T. Effect of vitamin C, vitamin E, Zinc, Selenium, and Coenzyme Q10 in infertile men with idiopathic oligoasthenozoospermia. **International Journal of Infertility & Fetal Medicine**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 45–49, 2017. DOI: 10.5005/jp-journals-10016-1147.
- ALIZADEH, A.; ESMAEILI, V.; SHAHVERDI, A.; RASHIDI, L. Dietary fish oil can change sperm parameters and fatty acid profiles of ram sperm during oil consumption period and after removal of oil source. **Cell journal**, [S. l.], v.16, n.3, p.289–98, 2014. DOI: 24611147.
- ALKHULAIFI, F.; DARKOH, C. Meal timing, meal frequency and metabolic syndrome. **Nutrients**, [S. l.], v. 14, n. 9, p. 1719, 2022. DOI: 10.3390/nu14091719.
- ALTINTAS, R.; CIFTCI, O.; AYDIN, M.; AKPOLAT, N.; OGUZ, F.; BEYTUR, A. Quercetin prevents docetaxel-induced testicular damage in rats. **Andrologia**, [S. l.], v. 47, n. 3, p. 248–256, 2015. DOI: 10.1111/and.12253.
- ARAÑA ROSAÍNIZ, M. J. et al. Imbalanced Low-Grade Inflammation and Endothelial Activation in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Erectile Dysfunction. **The Journal of Sexual Medicine**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 2017–2030, 2011. DOI: 10.1111/j.1743-6109.2011.02277.x.

- ARDESHIRNIA, R.; ZANDI, M.; SANJABI, M. R. The effect of quercetin on fertility of frozen-thawed ram epididymal spermatozoa. **South African Journal of Animal Science**, [S. l.], 2017. DOI: 10.4314/sajas.v47i2.16.
- BAKOS, H. W.; MITCHELL, M.; SETCHELL, B. P.; LANE, M. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. **International Journal of Andrology**, [S. l.], v. 34, n. 5pt1, p. 402–410, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2010.01092.x.
- BAYLIAK, M. M. et al. High fat high fructose diet induces mild oxidative stress and reorganizes intermediary metabolism in male mouse liver: Alpha-ketoglutarate effects. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [S. l.], v. 1866, n. 12, p. 130226, 2022. DOI: 10.1016/j.bbagen.2022.130226.
- BEAZLEY, K. E.; NURMINSKAYA, M. Effects of dietary quercetin on female fertility in mice: implication of transglutaminase 2. **Reproduction, Fertility and Development**, [S. l.], v. 28, n. 7, p. 974, 2016. DOI: 10.1071/RD14155.
- BEN ABDALLAH, F.; ZRIBI, N.; AMMAR-KESKES, L. Antioxidative potential of Quercetin against hydrogen peroxide induced oxidative stress in spermatozoa in vitro. **Andrologia**, [S.l.], v. 43, n. 4, p. 261–265, 2011. DOI:10.1111/j.1439-0272.2010.01063.x.
- BEYGI, Z.; FOROUHARI, S.; MAHMOUDI, E.; HAYAT, S. M. G.; NOURIMAND, Firoozeh. Role of oxidative stress and antioxidant supplementation in male fertility. **Current Molecular Medicine**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 265–282, 2021. DOI: 10.2174/1566524020999200831123553.
- CHAE, M. R.; KANG, S. J.; LEE, K. P.; CHOI, B. R.; KIM, H. K.; PARK, J. K.; KIM, C. Y.; LEE, S. W. Onion (*Allium cepa* L.) peel extract (OPE) regulates human sperm motility via protein kinase C-mediated activation of the human voltage-gated proton channel. **Andrology**, [S. l.], v. 5, n. 5, p. 979–989, 2017. DOI: 10.1111/andr.12406.
- CHAVARRO, J. E.; MINGUEZ-ALARCON, L.; MENDIOLA, J.; CUTILLAS-TOLIN, A.; LOPEZ-ESPIN, J. J.; TORRES-CANTERO, A. M. Trans fatty acid intake is inversely related to total sperm count in young healthy men. **Human Reproduction**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 429–440, 2014. DOI: 10.1093/humrep/det464.
- CIFTCI, O.; AYDIN, M.; OZDEMIR, İ.; VARDI, N. Quercetin prevents 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced testicular damage in rats. **Andrologia**, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 164–173, 2012. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2010.01126.x.
- COLLODEL, G.; CASTELLINI, C.; LEE, J. C.-Y.; SIGNORINI, C. Relevance of fatty acids to sperm maturation and quality. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2020, p. 1–14, 2020. DOI: 10.1155/2020/7038124.
- COSTA, L. G.; GARRICK, J. M.; ROQUÈ, P. J.; PELLACANI, C. Mechanisms of neuroprotection by quercetin: counteracting oxidative stress and more. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2016, p. 1–10, 2016. DOI:

10.1155/2016/2986796.

CRAIG, J. R.; JENKINS, T. G.; CARRELL, D. T.; HOTALING, J. M. Obesity, male infertility, and the sperm epigenome. **Fertility and Sterility**, [S. l.], v. 107, n. 4, p. 848–859, 2017. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.02.115.

CRISÓSTOMO, L.; ALVES, M. G.; GORGA, A.; SOUSA, M.; RIERA, M. F.; GALARDO, M. N.; MERONI, S. B.; OLIVEIRA, P. F. Molecular mechanisms and signaling pathways involved in the nutritional support of spermatogenesis by sertoli cells. *In*: [s.l.: s.n.]. p. 129–155. DOI: 10.1007/978-1-4939-7698-0_11.

DE SANTI, C.; PIETRABISSA, A.; SPISNI, R.; MOSCA, F.; PACIFICI, G. M. Sulphation of resveratrol, a natural product present in grapes and wine, in the human liver and duodenum. **Xenobiotica**, [S. l.], v. 30, n. 6, p. 609–617, 2000. DOI: 10.1080/004982500406435.

DELFINO, M.; IMBROGNO, N.; ELIA, J.; CAPOGRECO, F.; MAZZILLI, F. Prevalence of diabetes mellitus in male partners of infertile couples. **Minerva urologica e nefrologica = The Italian journal of urology and nephrology**, [S. l.], v. 59, n. 2, p. 131–5, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17571048>.

DENIS, M. C.; FURTOS, A.; DUDONNÉ, S.; MONTAUDIS, A.; GAROFALO, C.; DESJARDINS, Y.; DELVIN, E.; LEVY, E. Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. e53725, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0053725.

DESHPANDE, S. S.; NEMANI, H.; POTHANI, S.; KHAMBATA, K.; KUMAR, A.; KALLAMADI, P. R.; BALASINOR, N. H. Genetically inherited obesity and high-fat diet-induced obesity differentially alter spermatogenesis in adult male Rats. **Endocrinology**, [S. l.], v. 160, n. 1, p. 220–234, 2019. DOI:10.1210/en.2018-00569.

DING, N. *et al.* Impairment of spermatogenesis and sperm motility by the high-fat diet-induced dysbiosis of gut microbes. **Gut**, [S. l.], v. 69, n. 9, p. 1608–1619, 2020. <https://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2019-319127>.

EL-KADER, S. M. Abd. Non-alcoholic fatty liver disease: The diagnosis and management. **World Journal of Hepatology**, [S. l.], v. 7, n. 6, p. 846, 2015. DOI: 10.4254/wjh.v7.i6.846.

ESLAMIAN, G.; AMIRJANNATI, N.; RASHIDKHANI, B.; SADEGHI, M. R.; HEKMATDOOST, A. Intake of food groups and idiopathic asthenozoospermia: a case- control study. **Human Reproduction**, [S. l.], v. 27, n. 11, p. 3328–3336, 2012. DOI:10.1093/humrep/des311.

ESLAMIAN, G.; AMIRJANNATI, N.; RASHIDKHANI, B.; SADEGHI, M.-R.; BAGHESTANI, A.-R.; HEKMATDOOST, A.. Adherence to the western pattern is potentially an unfavorable indicator of asthenozoospermia risk: a case-control study. **Journal of the American College of Nutrition**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 50–58, 2016. DOI: 10.1080/07315724.2014.936983.
ESMAEILI, V.; SHAHVERDI, A. H.; MOGHADASIAN, M. H.; ALIZADEH, A. R.

Dietary fatty acids affect semen quality: a review andrology. 2015. DOI: 10.1111/andr.12024.

ESTIVALETI, J. M.; GUZMAN-HABINGER, J.; LOBOS, J.; AZEREDO, C. M.; CLARO, R.; FERRARI, G.; ADAMI, F.; REZENDE, L. F. M. Time trends and projected obesity epidemic in Brazilian adults between 2006 and 2030. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 12699, 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-16934-5.

FAN, Y.; LIU, Y.; XUE, K.; GU, G.; FAN, W.; XU, Y.; DING, Z. Diet-induced obesity in male C57BL/6 mice decreases fertility as a consequence of disrupted blood-testis barrier. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. e0120775, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0120775.

FAROMBI, E.O.; ADEDARA, I.A.; AKINRINDE, S.A.; OJO, O.O.; EBOH, A.S. Protective effects of kolaviron and quercetin on cadmium-induced testicular damage and endocrine pathology in rats. **Andrologia**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 273–284, 2012a. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2012.01279.x.

FAROMBI, E.O.; EKOR, M.; ADEDARA, I.A.; TONWE, K.E.; OJUJOH, T.O.; OYEYEMI, M.O. Quercetin protects against testicular toxicity induced by chronic administration of therapeutic dose of quinine sulfate in rats. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, [S. l.], 2012b. DOI: 10.1515/jbcpp-2011-0029.

FELDMAN, H.A.; JOHANNES, C.B.; DERBY, C.A.; KLEINMAN, K.P.; MOHR, B.A.; ARAUJO, A.B.; MCKINLAY, J.B. Erectile Dysfunction and Coronary Risk Factors: Prospective results from the massachusetts male aging study. **Preventive Medicine**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 328–338, 2000. DOI: 10.1006/pmed.2000.0643.

FERNANDEZ, C.D.B.; BELLENTANI, F.F.; FERNANDES, G.S.A.; PEROBELLI, J.E.; FAVARETO, A.P.A.; NASCIMENTO, A.F.; CICOGNA, A.C.; KEMPINAS, W.D.G. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 32, 2011. DOI: 10.1186/1477-7827-9-32.

FIDÈLE, N.; JOSEPH, B.; EMMANUEL, T.; THÉOPHILE, D. Hypolipidemic, antioxidant and anti-atherosclerogenic effect of aqueous extract leaves of *Cassia occidentalis* Linn (Caesalpiniaceae) in diet-induced hypercholesterolemic rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 76, 2017. DOI: 10.1186/s12906-017-1566-x.

FUNES, A.; SAEZ LANCELLOTTI, T. E.; SANTILLAN, L. D.; DELLA VEDOVA, M. C.; MONCLUS, M. A.; CABRILLANA, M. E.; GOMEZ MEJIBA, S. E.; RAMIREZ, D. C.; FORNES, M. W. A chronic high-fat diet causes sperm head alterations in C57BL/6J mice. **Heliyon**, [S. l.], v. 5, n. 11, p. e02868, 2019. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e02868.

FUNES, A.K. *et al.* Impact of high fat diet on the sterol regulatory element-binding protein 2 cholesterol pathway in the testicle. **Molecular Human Reproduction**, [S. l.], v.27, n.5, 2021. DOI: 10.1093/molehr/gaab023.

GARCÍA-BERUMEN, C.I.; ORTIZ-AVILA, O.; VARGAS-VARGAS, M.A.; DEL ROSARIO-TAMAYO, B.A.; GUAJARDO-LÓPEZ, C.; SAAVEDRA-MOLINA, A.; RODRÍGUEZ-OROZCO, A.R.; CORTÉS-ROJO, C. The severity of rat liver injury by fructose and high fat depends on the degree of respiratory dysfunction and oxidative stress induced in mitochondria. **Lipids in Health and Disease**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 78, 2019. DOI: 10.1186/s12944-019-1024-5.

GHANAYEM, B.I.; BAI, R.; KISSLING, G.E.; TRAVLOS, G.; HOFFLER, U. Diet-Induced obesity in male mice is associated with reduced fertility and potentiation of acrylamide-induced reproductive toxicity¹. **Biology of Reproduction**, [S.l.], v.82, n.1, p. 96–104, 2010. DOI: 10.1095/biolreprod.109.078915.

GIAGULLI, V.A.; KAUFMAN, J.M.; VERMEULEN, A.. Pathogenesis of the decreased androgen levels in obese men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 79, n. 4, p. 997–1000, 1994. DOI: 10.1210/jcem.79.4.7962311.

GIBB, Z.; BUTLER, T.J.; MORRIS, L.H.A.; MAXWELL, W.M.C.; GRUPEN, C.G. Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. **Theriogenology**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2012.06.032.

GOLOMB, B.A.; EVANS, M.A. Statin adverse effects: a review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, 2008. DOI: 10.2165/0129784-200808060-00004.

HAMMOUD, A.O.; GIBSON, M.; PETERSON, C.M.; MEIKLE, A.W.; CARRELL, D.T. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. **Fertility and Sterility**, 2008a. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.08.026.

HAMMOUD, A.O.; WILDE, N.; GIBSON, M.; PARKS, A.; CARRELL, D.T.; MEIKLE, A.W. Male obesity and alteration in sperm parameters. **Fertility and Sterility**, [S. l.], 2008b. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.10.011.

HAO, Y. *et al.* Gut microbiota-testis axis: fmt mitigates high-fat diet-diminished male fertility via improving systemic and testicular metabolome. **Microbiology Spectrum**, [S. l.], v. 10, n. 3, 2022. DOI: 10.1128/spectrum.00028-22.

HOFSTRA, J.; LOVES, S.; VAN WAGENINGEN, B.; RUINEMANS-KOERTS, J.; JANSEN, I.; DE BOER, H. High prevalence of hypogonadotropic hypogonadism in men referred for obesity treatment. **The Netherlands journal of medicine**, [S. l.], v. 66, n.3, p.103–9, 2008.

HOOPER, L.; KROON, P.A.; RIMM, E.B.; COHN, J.S.; HARVEY, I.; LE CORNU, K.A.; RYDER, J.J.; HALL, W.L.; CASSIDY, A. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [S. l.], v. 88, n. 1, p. 38–50, 2008. DOI: 10.1093/ajcn/88.1.38.

JAHAN, S.; IFTIKHAR, N.; ULLAH, H.; RUKH, G.; HUSSAIN, I. Alleviative effect of quercetin on rat testis against arsenic: a histological and biochemical study.

Systems Biology in Reproductive Medicine, [S. l.], 2015. DOI: 10.3109/19396368.2014.998350.

JAHAN, S.; REHMAN, S.; ULLAH, H.; MUNAWAR, A.; AIN, Q.U.; IQBAL, T. Ameliorative effect of quercetin against arsenic-induced sperm DNA damage and daily sperm production in adult male rats. **Drug and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 290–296, 2016. DOI: 10.3109/01480545.2015.1101772.

JANSSENS, S.; HEEMSKERK, M.M.; VAN DEN BERG, S.A.; VAN RIEL, N.A.; NICOLAY, K.; WILLEMS VAN DIJK, K; PROMPERS, J.J. Effects of low-stearate palm oil and high-stearate lard high-fat diets on rat liver lipid metabolism and glucose tolerance. **Nutrition & Metabolism**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 57, 2015. DOI: 10.1186/s12986-015-0053-y.

JOHINKE, D.; DE GRAAF, S.P.; BATHGATE, R. Quercetin reduces the in vitro production of H₂O₂ during chilled storage of rabbit spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, [S. l.], v. 151, n. 3–4, p. 208–219, 2014. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2014.10.017.

KAHN, Barbara E.; BRANNIGAN, Robert E. Obesity and male infertility. **Current Opinion in Urology**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 441–445, 2017. DOI: 10.1097/MOU.0000000000000417.

KANTER, M.; AKTAS, C.; ERBOGA, M. Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 50, n. 3–4, p. 719–725, 2012. DOI: 10.1016/j.fct.2011.11.051.

KARR, S. Epidemiology and management of hyperlipidemia. **The American journal of managed care**, [S. l.], v. 23, n. 9 Suppl, p. S139–S148, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28978219>.

KATIB, A. Mechanisms linking obesity with male infertility. **Central European Journal of Urology**, [S. l.], v. 68, 2015. DOI: 10.5173/ceju.2015.01.435. Disponível em: <http://ceju.online/journal/2015/obesity-bmi-ed-male-infertility-spermatogenesis-hypogonadism-435.php>.

KAWABATA, K.; MUKAI, R.; ISHISAKA, A. Quercetin and related polyphenols: new insights and implications for their bioactivity and bioavailability. **Food & Function**, [S. l.], v. 6, n. 5, p. 1399–1417, 2015. DOI: 10.1039/C4FO01178C.

KLEY, H.K.; DESELAERS, T.; PEERENBOOM, H.; KRÜSKEMPER, H.L. Enhanced conversion of androstenedione to estrogens in obese males. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 51, n.5, p.1128–1132, 1980. DOI:10.1210/jcem-51-5-1128.

KOBORI, M. Dietary quercetin and other polyphenols. *In: Polyphenols in Human Health and Disease*. [s.l.] : Elsevier, 2014. p. 163–175. DOI: 10.1016/B978-0-12-

398456-2.00014-1.

KOPIN, L.; LOWENSTEIN, C.J. Dyslipidemia. **Annals of Internal Medicine**, [S. l.], v.167, n.11, p.ITC81, 2017. DOI: 10.7326/AITC201712050.

LA VIGNERA, S.; CONDORELLI, R.; VICARI, E.; D'AGATA, R.; CALOGERO, A.E. Diabetes mellitus and minireview sperm parameters. **Journal of Andrology**, 2012. DOI: 10.2164/jandrol.111.013193.

LIU, H.; GUO, X.; CHU, Y.; LU, S. Heart protective effects and mechanism of quercetin preconditioning on anti-myocardial ischemia reperfusion (IR) injuries in rats. **Gene**, [S. l.], v. 545, n. 1, p. 149–155, 2014. DOI: 10.1016/j.gene.2014.04.043.

LOVATO, F.L. *et al.* Quercetin ameliorates polychlorinated biphenyls-induced testicular DNA damage in rats. **Andrologia**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 51–58, 2016. DOI: 10.1111/and.12417.

LUO, D.; ZHANG, M.; SU, X.; LIU, L.; ZHOU, X.; ZHANG, X.; ZHENG, D.; YU, C.; GUAN, Q. High fat diet impairs spermatogenesis by regulating glucose and lipid metabolism in Sertoli cells. **Life Sciences**, [S. l.], v. 257, p. 118028, 2020. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118028.

MA, J.; WU, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, H.; XIONG, C.; PENG, Z.; BAO, W.; MENG, T.; LIU, Y. Association between BMI and semen quality: an observational study of 3966 sperm donors. **Human Reproduction**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 155–162, 2019. DOI: 10.1093/humrep/dey328.

MAGNUSDOTTIR, E.V.; THORSTEINSSON, T.; THORSTEINSDOTTIR, S.; HEIMISDOTTIR, M.; OLAFSDOTTIR, K. Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. **Human Reproduction**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 208–215, 2005. DOI: 10.1093/humrep/deh569.

MAHFOUZ, R.Z.; DU PLESSIS, S.S.; AZIZ, N.; SHARMA, R.; SABANEKH, E.; AGARWAL, A. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. **Fertility and Sterility**, [S. l.], v. 93, n. 3, p. 814–821, 2010. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.10.068.

MAMMI, C.; CALANCHINI, M.; ANTELMINI, A.; CINTI, F.; ROSANO, G.M.C.; LENZI, A.; CAPRIO, M.; FABBRI, A. Androgens and adipose tissue in males: a complex and reciprocal interplay. **International Journal of Endocrinology**, [S. l.], v. 2012, p. 1–8, 2012. DOI: 10.1155/2012/789653.

MIGLIACCIO; GREGORIO; PUTTI; LIONETTI. Mitochondrial Involvement in the Adaptive Response to Chronic Exposure to Environmental Pollutants and High-Fat Feeding in a Rat Liver and Testis. **Cells**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 834, 2019. DOI: 10.3390/cells8080834.

MOORE, G.E. Biochemical and cellular mechanisms of aging and degenerative

disease: Excessive, poor-quality caloric intake may deplete essential nutrients and interfere with cellular processes to produce degenerative damage. **Medical Hypotheses**, [S. I.], v. 70, n. 4, p. 768–775, 2008. DOI: 10.1016/j.mehy.2007.08.011.

MORETTI, E.; MAZZI, L.; TERZUOLI, G.; BONECHI, C.; IACOPONI, F.; MARTINI, S.; ROSSI, C.; COLLODEL, G. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. **Reproductive Toxicology**, [S. I.], v. 34, n. 4, p. 651–657, 2012. DOI: 10.1016/j.reprotox.2012.10.002.

MOZAFFARIAN, D. *et al.* Heart disease and stroke statistics - 2015 Update. **Circulation**, [S.I.], v.131, n.4, p.e29–e322, 2015. DOI: 10.1161/CIR.000000000000152.

MUSAVI, H.; TABNAK, M.; ALAEI SHEINI, F.; HASANZADEH BEZVAN, M.; AMIDI, F.; ABBASI, M. Effect of garlic (*Allium sativum*) on male fertility: a systematic review. **Journal of Herbmед Pharmacology**, [S. I.], v.7, n.4, p.306–312, 2018. DOI: 10.15171/jhp.2018.46

NICHOLLS, S.; LUNDMAN, P. The emerging role of lipoproteins in atherogenesis: beyond LDL cholesterol. **Seminars in vascular medicine**, [S. I.], v.4, n.2, p.187–95, 2004. DOI: 10.1055/s-2004-835377.

OSAWA, S.O.; FAROMBI, E.O. Quercetin and rutin ameliorates sulphasalazine-induced spermotoxicity, alterations in reproductive hormones and steroidogenic enzyme imbalance in rats. **Andrologia**, [S. I.], v. 50, n. 5, p. e12981, 2018. DOI: 10.1111/and.12981.

OSUGA, J-I. *et al.* Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. I.], v. 97, n. 2, p. 787–792, 2000. DOI: 10.1073/pnas.97.2.787.

PANCHAL, Sunil K.; POUDYAL, Hemant; BROWN, Lindsay. Quercetin Ameliorates Cardiovascular, Hepatic, and Metabolic Changes in Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats. **The Journal of Nutrition**, [S. I.], 2012. DOI: 10.3945/jn.111.157263.

PUSHPENDRA, Agarwal; JAIN, G. C. Hyper-Lipidemia and Male Fertility: A Critical Review of Literature. **Andrology-Open Access**, [S. I.], v. 04, n. 02, 2015. DOI: 10.4172/2167-0250.1000141.

RAMALHO-SANTOS, J.; AMARAL, S.; OLIVEIRA, P. Diabetes and the impairment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species. **Current Diabetes Reviews**, [S. I.], v. 4, n. 1, p. 46–54, 2008. DOI: 10.2174/157339908783502398.

RATO, L.; ALVES, M.G.; CAVACO, J.E.; OLIVEIRA, P.F. High-energy diets: a threat for male fertility? **Obesity Reviews**, [S. I.], v. 15, n. 12, p. 996–1007, 2014. DOI:

10.1111/obr.12226.

RECENA AYDOS, L.; AMARAL, L.A.; SOUZA, R.S.; JACOBOWSKI, A.C.; SANTOS, E.F.; MACEDO, M.L.R. Nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in C57bl/6 models. **Nutrients**, [S. l.], v. 11, n. 12, p. 3067, 2019. DOI: 10.3390/nu11123067.

RIVERA, L.; MORÓN, R.; SÁNCHEZ, M.; ZARZUELO, A.; GALISTEO, M. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. **Obesity**, [S. l.], 2008. DOI: 10.1038/oby.2008.315.

RUFUS, Obose; JAMES, Osaikhuwuomwan; MICHAEL, Aziken. Male obesity and semen quality: Any association? **International journal of reproductive biomedicine**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 285–290, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29942937>.

SAEZ LANCELLOTTI, T.E. *et al.* Hypercholesterolemia Impaired Sperm Functionality in Rabbits. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 5, n. 10, p. e13457, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0013457.

SAHEBKAR, A. Effects of quercetin supplementation on lipid profile: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 57, n. 4, p. 666–676, 2017. DOI: 10.1080/10408398.2014.948609.

SAMOVA, S.; DOCTOR, H.; VERMA, R.V. Protective effect of quercetin on bisphenol A - Induced enzymatic changes in testis of mice. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 1256–1262, 2018. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.9(3).1256-62.

SCHWEITZER, A.M.; GINGRICH, M.A.; HAWKE, T.J.; REBALKA, I.A. The impact of statins on physical activity and exercise capacity: an overview of the evidence, mechanisms, and recommendations. **European journal of applied physiology**, [S. l.], v. 120, n. 6, p. 1205–1225, 2020. DOI: 10.1007/s00421-020-04360-2.

SEIFI-JAMADI, A.; KOHRAM, H.; ZARE SHAHNEH, A.; ANSARI, M; MACÍAS-GARCÍA, B. Quercetin ameliorate motility in frozen-thawed turkmen stallions sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1016/j.jevs.2016.06.078.

SELIM, M.E.; ALEISA, N.A.; DAGHESTANI, M.H. Evaluation of the possible protective role of quercetin on letrozole-induced testicular injury in male albino rats. **Ultrastructural pathology**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 204–17, 2013. DOI: 10.3109/01913123.2013.772269.

SHI, J-F; LI, Y.-K.; REN, K.; XIE, Y.-J.; YIN, W.-D.; MO, Z.-C. Characterization of cholesterol metabolism in Sertoli cells and spermatogenesis (Review). **Molecular Medicine Reports**, [S. l.], v. 17, p. 705–713, 2017. DOI: 10.3892/mmr.2017.8000.

SILVA, L.F.M.C. *et al.* Quercetin Promotes Increase in the Fertility Rate of Frozen

Semen of Stallions Considered Sensitive to Freezing. **Journal of Equine Veterinary Science**, [S. I.], 2018. DOI: 10.1016/j.jevs.2018.05.049.

SIMÓN, L.; FUNES, A.K.; MONCLÚS, M.A.; COLOMBO, R.; CABRILLANA, M.E.; SAEZ LANCELOTTI, T.E.; FORNÉS, M.W. Manchette-acrosome disorders and testicular efficiency decline observed in hypercholesterolemic rabbits are recovered with olive oil enriched diet. **PLOS ONE**, [S. I.], v. 13, n. 8, p. e0202748, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0202748.

SIMÓN, L.; FUNES, A.K.; YAPUR, M.A.; CABRILLANA, M.E.; MONCLUS, M.A.; BOARELLI, P.V.; VINCENTI, A.E.; SAEZ LANCELOTTI, T.E.; FORNÉS, M.W. Manchette-acrosome disorders during spermiogenesis and low efficiency of seminiferous tubules in hypercholesterolemic rabbit model. **PLOS ONE**, [S. I.], v.12, n.2, p.e0172994, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0172994.

STEWART, L.K.; SOILEAU, J.L.; RIBNICKY, D.; WANG, Z.Q.; RASKIN, I.; POULEV, A.; MAJEWSKI, M.; CEFALU, W.T.; GETTYS, T.W. Quercetin transiently increases energy expenditure but persistently decreases circulating markers of inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Metabolism**, [S.I.], v.57, p.S39–S46, 2008. DOI: 10.1016/j.metabol.2008.03.003.

SWAN, S.H.; ELKIN, E.P.; FENSTER, L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. **Environmental Health Perspectives**, [S. I.], v. 108, n. 10, p. 961–966, 2000. DOI: 10.1289/ehp.00108961.

TAEPONGSORAT, L.; TANGPRAPRUTGUL, P.; KITANA, N.W.; WOLFFRAM, S.; ALINK, G.M.; RIETJENS, I.M.C.M.; KEIJER, J.; HOLLMAN, P.C.H. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. **The Journal of Nutrition**, [S.I.], v.135, n.7, p.1718–1725, 2005. DOI: 10.1093/jn/135.7.1718.

TAN, B.L.; NORHAIZAN, M.E. Effect of high-fat diets on oxidative stress, cellular inflammatory response and cognitive function. **Nutrients**, [S. I.], v. 11, n.11, p.2579, 2019. DOI:10.3390/nu11112579.

TANOUE, T. *et al.* A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. **Nature**, [S. I.], v. 565, n. 7741, p. 600–605, 2019. DOI: 10.1038/s41586-019-0878-z.

TAYLOR, K.; ROBERTS, P.; SANDERS, K.; BURTON, P. Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. **Reproductive BioMedicine Online**, [S. I.], v. 18, n. 2, p. 184–189, 2009. DOI: 10.1016/S1472-6483(10)60254-4

TENA-SEMPERE, M.; MANNA, P.R.; ZHANG, F.P.; PINILLA, L.; GONZALEZ, L.C.; DIEGUEZ, C.; HUHTANIEMI, I.; AGUILAR, E. Molecular mechanisms of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptin-induced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression. **Journal of Endocrinology**, [S. I.], v. 170, n. 2, p. 413–423, 2001. DOI: 10.1677/joe.0.1700413.

TSATSANIS, C.; DERMITZAKI, E.; AVGOUSTINAKI, P.; MALLIARAKI, N.; MYTARAS, V.; MARGIORIS, A.N. The impact of adipose tissue- derived factors on the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. **Hormones**, 2015. DOI: 10.14310/horm.2002.1649.

USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. Release 3.2 (November 2015). **Ag Data Commons**. [s.d.]. Disponível em: <https://data.nal.usda.gov/dataset/usda-database-flavonoid-content-selected-foods-release-32-november-2015>. Acesso em: 7 maio. 2021.

VERÓN, G.L.; TISSERA, A.D.; BELLO, R.; BELTRAMONE, F.; ESTOFAN, G.; MOLINA, R.I.; VAZQUEZ-LEVIN, M.H. Impact of age, clinical conditions, and lifestyle on routine semen parameters and sperm kinematics. **Fertility and Sterility**, [S. l.], v. 110, n. 1, p. 68- 75.e4, 2018. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.03.016.

VRABLIK, M.; ZLATOHLAVEK, L.; STULC, T.; ADAMKOVA, V.; PRUSIKOVA, M.; SCHWARZOVA, L.; HUBACEK, J. A.; CESKA, R. Statin-associated myopathy: from genetic predisposition to clinical management. **Physiological research**, [S. l.], v. 63, n. Suppl 3, p. S327-34, 2014. DOI: 10.33549/physiolres.932865.

WANG, J.; QIAN, X.; GAO, Q.; LV, C.; XU, J.; JIN, H.; ZHU, H. Quercetin increases the antioxidant capacity of the ovary in menopausal rats and in ovarian granulosa cell culture in vitro. **Journal of Ovarian Research**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 51, 2018. DOI: 10.1186/s13048-018-0421-0

WEISBERG, S.P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R.L.; FERRANTE, A.W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], 2003. DOI: 10.1172/JCI200319246.

WIJERATHNE, T.D.; KIM, J.H.; KIM, M.J.; KIM, C.Y.; CHAE, M.R.; LEE, S.W; LEE, K.P. Onion peel extract and its constituent, quercetin inhibits human Slo3 in a pH and calcium dependent manner. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 381, 2019. DOI: 10.4196/kjpp.2019.23.5.381.

WU, G.D. *et al.* Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science**, [S. l.], v. 334, n. 6052, p. 105–108, 2011. DOI: 10.1126/science.1208344.

YANG, T.; KONG, B.; GU, J.-W.; KUANG, Y.-Q.; CHENG, L.; YANG, W.-T.; XIA, X.; SHU, H.-F. Anti-apoptotic and anti-oxidative roles of quercetin after traumatic brain injury. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [S. l.], v. 34, n. 6, p. 797–804, 2014. DOI: 10.1007/s10571-014-0070-9

YELUMALAI, S.; GIRIBABU, N.; KARIM, K.; OMAR, S.Z.; SALLEH, N.B. In vivo administration of quercetin ameliorates sperm oxidative stress, inflammation, preserves sperm morphology and functions in streptozotocin- nicotinamide induced adult male diabetic rats. **Archives of Medical Science**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 240–249, 2019. DOI: 10.5114/aoms.2018.81038.

YOSHIMOTO, H.; TAKEO, T.; NAKAGATA, N. Dimethyl sulfoxide and quercetin

prolong the survival, motility, and fertility of cold-stored mouse sperm for 10 days. **Biology of Reproduction**, [S. l.], 2017. DOI: 10.1093/biolre/iox144.

ZELENA, D. The janus face of stress on reproduction: From health to disease. **International Journal of Endocrinology**, p.458129, 2015. DOI: 10.1155/2015/458129.

ZHANG, C.; ZHANG, M.; PANG, X.; ZHAO, Y.; WANG, L.; ZHAO, L. Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. **The ISME Journal**, [S. l.], v. 6, n. 10, p. 1848–1857, 2012. DOI: 10.1038/ismej.2012.27.

ZHAO, J.; ZHAI, L.; LIU, Z.; WU, S.; XU, L. Leptin level and oxidative stress contribute to obesity-induced low testosterone in murine testicular tissue. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2014, p. 1–14, 2014. DOI: 10.1155/2014/190945.

ZRIBI, N.; CHAKROUN, N.F.; BEN ABDALLAH, F.; ELLEUCH, H.; SELLAMI, A.; GARGOURI, J.; REBAI, T.; FAKHFAKH, F.; KESKES, L.A. Effect of freezing–thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. **Cryobiology**, [S. l.], v. 65, n. 3, p. 326–331, 2012. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2012.09.003.

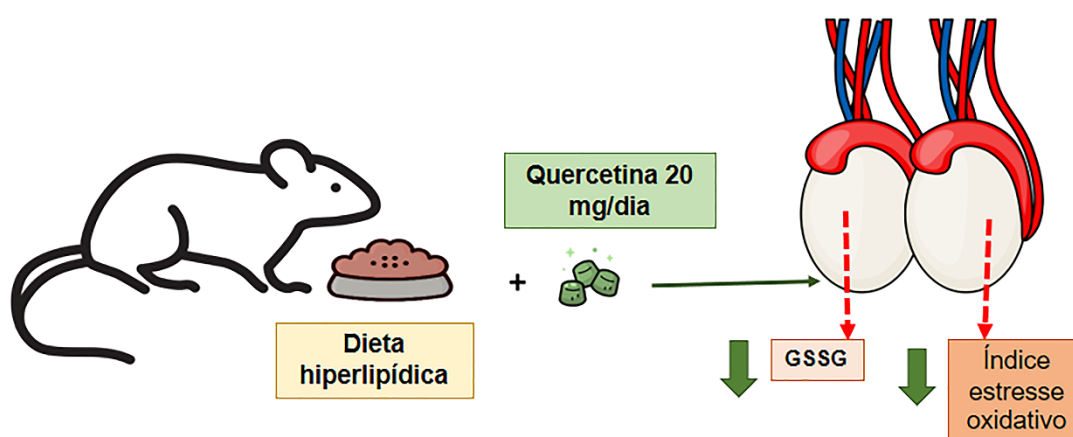
CAPÍTULO II

ARTIGO CIENTÍFICO NAS NORMAS DA REVISTA AMERICAN JOURNAL OF
REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY

FATOR DE IMPACTO 3,777

QUERCETINA REDUZ ESTRESSE OXIDATIVO EM TESTÍCULOS DE RATOS
ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA: MODELO DE ESTEATOSE
HEPÁTICA

Resumo gráfico:

**Destaques:**

Dieta rica em banha de porco diminui peso de epidídimos e ductos deferentes

Quercetina reduz glutathiona oxidada nos testículos de ratos com dieta hiperlipídica

Quercetina e dieta hiperlipídica não alteram a peroxidação lipídica testicular

Quercetina reduz estresse oxidativo em testículos de ratos alimentados com dieta hiperlipídica: modelo de esteatose hepática

Quercetin reduces oxidative stress in testes of rats fed a high-fat diet: a model of hepatic steatosis

Aline de Oliveira Santos¹, Luis de Souza Lima de Souza Reis³, Marcela de Andrade Bernal Fagiani¹, Glaura Scantamburlo Alves Fernandes³, Lauren Chrys Soato Marin Schaffer¹, Maria Eduarda Almeida Tavares², Giovana Rampazzo Teixeira², Caliê Castilho¹, Mayara de Oliveira Vidotto Figueiredo¹, Ines Cristina Giometti¹

1 Laboratório de Genética Molecular e Experimentação em Reprodução Animal, Universidade do Oeste Paulista - Unoeste, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil.

2. Laboratório Experimental de Biologia do Exercício - LEBioEX., Universidade Estadual Paulista – UNESP, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil.

3. Laboratório de Toxicologia e Distúrbios Metabólicos da Reprodução, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Brazil.

Autor de correspondência: Profa Ines Cristina Giometti, e-mail: inesgiometti@yahoo.com.br

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista - Unoeste, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

Conflito de interesse: Os autores declaram que não há qualquer conflito de interesse.

RESUMO

A dieta hiperlipídica por dois meses em ratos provoca o surgimento de esteatose hepática e predispõe os animais à intolerância à glicose, dislipidemia e ao estresse oxidativo. Sabe-se que uma dieta rica em gordura animal também afeta a fertilidade, causando estresse oxidativo testicular e prejudicando a produção espermática desses animais. A quercetina é um flavonoide que tem ação antioxidante, anti-inflamatória e lipolítica, sendo um potencial suplemento no combate à esteatose hepática e seus efeitos deletérios para a reprodução. O objetivo desse estudo experimental foi avaliar a suplementação de quercetina em doses de 10 mg e 20 mg por dia em parâmetros reprodutivos e de estresse oxidativo testicular em modelos de ratos com esteatose hepática provocada pela dieta rica em gordura animal. Os animais receberam, ração comercial (dieta padrão) com ou sem a banha de porco (dieta hiperlipídica - HF) e após 2 meses, receberam também uma suplementação diária de 0, 10 ou 20 mg de quercetina por mais dois meses. A HF diminui o consumo de ração e o peso dos animais, diminuiu o peso de epidídimos e ductos, independente da presença de quercetina. Não houve alteração no peso dos testículos, nem no epitélio germinativo, nem na motilidade e morfologia espermáticos, nem na expressão de genes inflamatórios testiculares ($P > 0,05$). Embora a expressão gênica de *Sod2* nos testículos tenha sido maior no grupo HF sem quercetina, houve redução do índice de estresse oxidativo e de glutathiona oxidada nos ratos que receberam dieta HF e 20 mg de quercetina, comparado ao grupo HF sem quercetina. Conclui-se que a suplementação de 20 mg de quercetina diária reduz o estresse oxidativo testicular em ratos com esteatose hepática provocada por dieta hiperlipídica.

Palavras-Chave: antioxidantes, catalase, espermatozoides, glutathiona, MDA, TBARs

1. INTRODUÇÃO

O estilo de vida sedentário e o excesso de consumo de dietas ricas energeticamente contribuem para o desenvolvimento de obesidade e suas desordens associadas, como a resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão, doenças cardiovasculares e esteatose hepática (1). A esteatose hepática não alcoólica é o acúmulo de gordura no fígado sem o excessivo consumo de álcool, ocorre quando a síntese de ácidos graxos no fígado excede a sua oxidação (2). Como a obesidade tem aumentado em todo o mundo, se aproximando a uma pandemia (3), a prevalência de esteatose hepática também tem aumentado, sendo de 30 a 40% dos adultos nos países desenvolvidos (4).

Estudos em ratos têm demonstrado que a esteatose hepática provocada pela dieta hiperlipídica causa redução na testosterona, redução no peso do testículo, no peso do epidídimo e na contagem de espermatozoides e aumento na apoptose das células germinativas (4,5). Sabe-se que os animais alimentados com dieta rica em gordura têm específicas mudanças na espermatogênese, como baixa concentração espermática, morfologia espermática anormal (6) e reduzidos movimento progressivo e motilidade (7). Além disso, a dieta rica em gorduras trans e ácidos graxos saturados afetam negativamente na qualidade do sêmen (8).

A quercetina tem potencial no combate à obesidade, diminui os adipócitos e previne a formação de novos adipócitos, pela diminuição da adipogênese e pelo aumento da apoptose (9). Em ratos com diabetes induzida, a quercetina diminui a inflamação e o estresse oxidativo nos testículos, aumentando a expressão gênica e a atividade de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) nos espermatozoides, enquanto os níveis de produtos de peroxidação lipídica e fator nuclear kappa B (NF- κ B) foram diminuídos (10).

Devido às suas diferentes atividades biológicas, lipolítica, antioxidante e anti-inflamatória, a quercetina pode ser um candidato para a proteção testicular dos efeitos deletérios da dieta hiperlipídica e esteatose hepática. Por isso, o objetivo desse estudo experimental foi avaliar a suplementação de quercetina em doses de 10 mg/dia e 20 mg/dia em parâmetros reprodutivos e de estresse oxidativo testicular modelos de ratos com esteatose hepática provocada pela dieta rica em gordura animal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os protocolos experimentais que foram utilizados estavam em conformidade com os princípios de cuidados com animais de laboratório formulado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicado pelo *National Research Council*. Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente (SP), número de protocolo 6151.

2.1. Animais e delineamento experimental

No presente estudo foram utilizados 24 *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos, com peso de $256,03 \pm 3,70$ g. Estes animais foram divididos em 4 grupos experimentais (n=6) e mantidos em 2 ratos/gaiola com temperatura ambiente na faixa de 22 ± 1 °C e ciclo claro/escuro de 12 horas, durante todo o experimento. Os grupos foram divididos em: CT (animais controle que receberam a ração balanceada comercial, água *ad libitum* e receberam goma sem quercetina); HF (animais com dieta hiperlipídica e água *ad libitum* e receberam goma sem quercetina); HFQ10 (animais com dieta hiperlipídica e água *ad libitum* e receberam suplementação com 10 mg/dia de goma de quercetina); HFQ20 (animais que receberam ração hiperlipídica e água *ad libitum* e receberam suplementação com 20 mg/dia de goma de quercetina). O experimento teve duração de 4 meses, a goma começou a ser suplementada para os animais após a oitava semana e foi até o final do experimento (Figura 1).

A ração balanceada comercial (Supralab[®] produzido por Alisul, Rio Grande do Sul, Brasil), foi utilizada como dieta controle normolipídica e atende todas exigências nutricionais desses animais, sua composição foi de (níveis de garantia/Kg de ração): 22,0% de proteína bruta; 2,5% de extrato etéreo; 6,0% de matéria fibrosa; 10% de matéria mineral; 1,2% de cálcio; 0,7% de fósforo; 3.000 mg de metionina; 7.000 UI de vitamina A; 50 mg de vitamina C; 2.000 UI de vitamina D3; 15 UI de vitamina E; 1,0 mg de vitamina K3; 2,0 mg de vitamina B1; 6,0 mg de vitamina B2; 3,0 mg de vitamina B6; 9,0 mg de vitamina B12; 1,0 mg de ácido fólico; 12,0 mg de

ácido pantotênico; 0,5 mg de biotina; 500,0 mg de colina; 20,0 mg de niacina; 9,0 mg de cobre; 40,0 mg de ferro; 0,7 mg de iodo; 90,0 mg de manganês; 0,4 mg de selênio; 50,0 mg de zinco.

A dieta hiperlipídica era composta por 50% de ração balanceada comercial modificada com adição de gordura de origem animal (banha suína Sadia[®]), para se atingir a concentração de 30% (g/g) de lipídios e 20% (g/g) de frutose (11–13). A banha suína aquecida e a frutose foram adicionadas à ração comercial que foi repeletizada para alimentar os animais.

A goma que foi administrada aos ratos era composta por 3,4 g de ágar, 7,5 g de gelatina de morango e 100 mL de água. Os ingredientes eram misturados previamente, depois aquecidos e acondicionados em formas que assumiam o formato de pequenas gomas. As doses de 10 e 20 mg de quercetina purificada eram adicionadas nas gomas, durante o resfriamento. As gomas eram sempre oferecidas no mesmo horário, no período da manhã.

O consumo da ração pelos ratos *Wistar* de todos os grupos experimentais foram determinados diariamente durante todo o experimento. Para isto, a ração foi pesada antes de ser colocada no comedouro dos ratos e, após 24 horas, foi pesado a sobra da ração no comedouro. Subtraindo-se o segundo peso do primeiro peso, foram o consumo médio diário de ração de cada grupo experimental de ratos *Wistar*, que foram divididos pelo número de ratos de cada grupo experimental, e assim, foi determinado o consumo diário médio de ração por rato de cada grupo experimental.

Ao final do experimento, os ratos foram anestesiados e mortos por exsanguinação. O peso dos testículos, epidídimos e ductos deferentes foram verificados. Os testículos direitos foram removidos e fixados em Methacarn, para confecção das lâminas histológicas e os testículos esquerdos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e depois armazenados em freezer a -80°C. Os espermatozoides foram obtidos no momento da eutanásia dos ductos deferentes para análise da motilidade e morfologia espermática.

2.2. Motilidade espermática

Os espermatozoides foram liberados do ducto deferente esquerdo logo após a morte dos animais com ajuda de uma seringa, no meio PBS a 34°C. Esta solução espermática foi utilizada para a análise da motilidade dos espermatozoides feita em

câmara de Neubauer, por estimativa visual (100 espermatozoides por animal) em microscópio de luz (Leica DMLS) em aumento de 400X. Os espermatozoides foram classificados como: móveis com trajetória progressiva; móveis sem progressão e imóveis.

2.3. Morfologia espermática

Para a análise da morfologia espermática, os espermatozoides foram liberados com ajuda de uma seringa e fixados em formol-salina a 10% e refrigerados. Foram realizados esfregaços com os espermatozoides em lâminas histológicas, que foram observados em microscópio (aumento de 400X) (14). Foram analisados 200 espermatozoides por animal e as anormalidades morfológicas encontradas classificadas em duas categorias: a) anormalidades da cabeça (sem curvatura característica, em forma de alfinete, sem curvatura ou isolada); e b) anormalidades da cauda (enrolada, quebrada, dobrada e isolada) (15).

2.4. Morfometria testicular

Os testículos foram inclusos em Paraplast e realizados cortes de 3µm de espessura e as lâminas foram confeccionadas utilizando micrótomo. Então as lâminas foram submetidas à coloração de hematoxilina-eosina. As lâminas foram fotografadas por uma câmera acoplada ao microscópio óptico em objetiva de 4x. As lâminas foram então fotografadas e avaliadas utilizando o software MOTIC Image plus 2.0®.

A área do lúmen seminífero, do epitélio germinativo e do túbulo seminífero foram avaliadas. A média das áreas foram verificadas em 10 cortes por animal contando 10 medidas por corte.

2.5 Expressão gênica relativa

Para a análise da RT-qPCR, os testículos congelados no freezer a -80°C foram triturados em homogeneizador de tecidos e submetidos ao protocolo de extração do TRIzol® (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific Inc., Carlsbad, California, EUA). A concentração do RNA total recuperado foi mensurada por

espectrofotometria por NanoDrop™ Lite (Fischer Scientific™, ThermoFisher Scientific Inc., Wilmington, Delaware, EUA). Todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas à transcrição reversa (RT) seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), conforme as instruções do protocolo DNase I Amplification Grade (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific, Foster City, Califórnia, EUA).

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

A qPCR foi realizada no termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems®, Foster City, California, EUA) para a análise quantitativa da expressão gênica relativa. Como controle interno das reações de qPCR foram utilizados 3 genes referência, a fim de normalizar os resultados obtidos para o gene-alvo. Os oligonucleotídeos iniciadores foram obtidos a partir de ensaios FAM-MGB TaqMan® (Applied Biosystems®, Foster City, Califórnia, EUA), já padronizados conforme descrição a seguir, para os gene-alvos: fator de necrose tumoral alfa (*Tnfa*): Rn01525859_g1, produto: 92 pb; interleucina 6 (*Il6*): Rn99999011_m1, produto: 90 pb; catalase (*Cat*): Rn00560930_m1, produto: 107 pb; superóxido dismutase 2 (*Sod2*): Rn00690588_g1, produto: 64pb; e glutationa sintetase (*Gss*): Rn00564188_m1, produto: 67 pb.

Como controle interno das reações de qPCR foram testados 3 genes referência para os seguintes ensaios TaqMan®: proteína ribossomal S18 (*Rps18*): Rn01428913_gH, Produto: 62 pb; gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*): Rn017775763_g1, produto: 174 pb; e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1(*Hprt1*): Rn01527840_m1, produto: 64 pb. O gene referência escolhido foi o mais estável utilizando o programa NormFinder™ Software (<https://moma.dk/normfinder-software>, MOMA, Dinamarca).

As reações de PCRs foram conduzidas em duplicatas para cada amostra e a expressão gênica foi determinada pela quantificação em relação ao gene referência. O cálculo das eficiências para os genes alvo e controle foi realizado por meio da curva padrão relativa com diluições seriadas. Para quantificação relativa das amplificações foi empregado o método de Pfaffl (2001), considerando a média aritmética do ΔCt do grupo controle como calibrador de reação.

2.6. Análise do perfil oxidativo

Os testículos congelados também foram utilizados para a análise do perfil oxidativo pelos níveis de malondialdeído (MDA) e atividade das enzimas envolvidas no estresse oxidativo. Para tanto, a concentração de substratos reativos de ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi avaliada para determinar a peroxidação lipídica dos testículos, desde que a decomposição dos peróxidos lipídicos resulta na formação de TBARS. Os níveis de MDA, um produto intermediário da peroxidação lipídica, foram determinados por espectrofotometria pela diferença entre a absorbância em 535 e 572 nm (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, USA). Os resultados são expressos em nmol de MDA por miligrama de proteína (17).

A avaliação da atividade da SOD foi realizada de acordo com o método descrito por Senthilkumar et al. (2021). A reação consiste em quantificar o complexo formado entre os ânions superóxido pela adição de NBT e $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ com coloração amarela e a redução de NBT, formando uma leitura de cor azul em 560 nm. As amostras foram lidas a cada 15 segundos por 2 minutos.

A atividade enzimática da CAT foi determinada pela degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Após a determinação da concentração de proteínas (normalizadas 1,0 mg/ml em PBS), 297 μl de meio de reação foi colocado em microplaca de UVvis e a leitura feita a 240nm por 15 segundos durante 1 minuto (19). A atividade da Glutathione-S-transferase (GST) foi avaliada por espectrofotometria com CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), com base na respectiva conjugação com a glutathione (20). A concentração de GSH foi determinada de acordo com o método proposto por Rahman et al. (2006), com algumas modificações, utilizando ácido 5,5'-ditiobis 20-nitrobenzóico no homogenato, evidenciado pela formação da cor amarela. Os níveis de GSH foram medidos a 412 nm e os resultados serão expressos em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína. Os níveis de GSSG e índice de estresse oxidativo (IEO) foram calculados, levando em consideração a estequiometria da reação (22). Os valores de GSSH e IEO foram determinados, respectivamente, pelas equações: $\text{GSSG } (\mu\text{M}) = (\text{GT} - \text{GSH}/2)$; $\text{IEO } (\%) = (\text{GSSG}/\text{GSH}) \times 100$. Os resultados foram expressos em $\mu\text{M/mg}$ protein. A concentração de GT foi determinada utilizando ácido 5,5'-ditiobis 20-nitrobenzóico (DTNB), fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) e a glutathione

redutase (GR) sobre a amostra. As concentrações de GT foram medidas a 412 nm após 15 minutos de incubação das amostras com o meio de reação.

2.6. Análise estatística

Os dados passaram pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A análise estatística utilizada para a maioria dos parâmetros foi ANOVA seguida do contraste de Tukey, exceto para os dados de porcentagem de motilidade e morfologia espermática que foi kruskal-Wallis seguido de Dunn ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS

Os grupos de animais não apresentavam diferença significativa no peso corporal inicial, mas no final do experimento, os que consumiram a dieta hiperlipídica tiveram um menor peso corporal (Figura 2). O consumo de ração hiperlipídica foi menor ($P < 0,05$) do que da ração comercial, os grupos HFQ10 e HFQ20 ainda tiveram o menor ($P < 0,05$) consumo de ração que o HF (Figura 2).

O peso dos testículos, as áreas de túbulo e lúmen seminíferos e a área de epitélio seminífero não diferiram entre os grupos experimentais (Figura 3). Já o peso dos epidídimos e dos ductos deferentes reduziram significativamente nos grupos com dieta hiperlipídica (Figura 3).

Não houve diferença entre os grupos experimentais na motilidade (Figura 4), nem na morfologia espermática (Tabela 1), $p > 0,05$. Também não houve diferença significativa entre os grupos na abundância relativa de RNAm das citocinas inflamatórias *Tnfa* e *Il6*, nem das enzimas antioxidantes *Gss* e *Cat* nos testículos dos animais (Figura 5). Porém, o HFQ20 teve menor expressão ($P = 0,0298$) de *Sod2* que o HF (Figura 5).

Os grupos experimentais não diferiram na concentração de malondialdeído nem na atividade de GST e CAT ($P > 0,05$). Porém, o HF teve maior porcentagem de IEO que o HFQ20 ($p = 0,0377$), devido à maior concentração de GSSG no grupo HF que no grupo HFQ20 (Figura 7), $p = 0,0350$. Os grupos com dieta hiperlipídica tiveram maior concentração de GSH que o grupo controle ($P = 0,008$).

4. DISCUSSÃO

A esteatose hepática dos animais induzida pela dieta hiperlipídica do presente experimento foi confirmada por histologia hepática e por verificação das concentrações séricas das enzimas hepáticas (dados não publicados) (23). Esse modelo de dieta hiperlipídica com acréscimo de banha suína é um modelo para desenvolvimento de esteatose hepática, intolerância à glicose e/ou dislipidemia, visto em vários experimentos (1,11,23–27), o estresse oxidativo também já foi observado em alguns estudos no plasma (27) ou no fígado (25,26,28). O acúmulo intra-hepático de lipídeos (excessivo conteúdo de triglicerídeos) e o estresse oxidativo são os principais mecanismos envolvidos na progressão da esteatose hepática (29). Estudos *in vitro* demonstraram que a quercetina reduz o acúmulo de lipídeos hepáticos e a esteatose hepática, com diminuição no estresse oxidativo (30,31). A quercetina também diminui a esteatose hepática em ratos (23).

Este é um estudo pioneiro que avalia diferentes concentrações de quercetina em parâmetros reprodutivos de um modelo experimental de esteatose hepática. A quercetina na dose de 20 mg/dia, no presente estudo, foi efetiva em diminuir a concentração de glutatona oxidada (GSSG) e o índice de estresse oxidativo (IEO%) dos testículos dos animais alimentados com dieta hiperlipídica. Outros estudos também demonstraram a capacidade antioxidante da quercetina para os testículos. Em ratos diabéticos, a quercetina diminuiu a peroxidação lipídica e aumentou os níveis de enzimas antioxidantes nos testículos (32). Em ratos submetidos ao inseticida rotenona, a quercetina (5, 10 ou 20 mg/Kg) também foi capaz de reduzir o estresse oxidativo testicular (33).

A dieta hiperlipídica provocou um menor consumo de ração pelos animais nos 4 meses de experimento. A dieta rica em gordura pode promover maior saciedade aos indivíduos e com isso reduzir o consumo de ingesta (34). A composição dos ácidos graxos nas dietas hiperlipídicas também influencia na saciedade e é sabido que os ácidos graxos poli-insaturados e os ácidos graxos saturados provocam maior saciedade que os ácidos graxos monoinsaturados (35). A gordura suína contém vários ácidos graxos, sua composição é de aproximadamente 43% de oleico (monoinsaturado), 25% palmítico, 18% esteárico (ambos saturados) e 17% linoleico (poli-insaturado) e menores porcentagens dos demais (36). Observa-se que os grupos que consumiram dieta hiperlipídica e quercetina (10 ou 20 mg), o consumo

foi ainda menor de ração. Foi demonstrado que a quercetina altera o perfil de transcriptoma de diferentes genes, um dos genes que são mais expressos com a quercetina é o neuropeptídeo Y, que atua na saciedade (12).

Condizente com o menor consumo de ração, a dieta hiperlipídica provocou perda de peso nos ratos, mas a quercetina não influenciou no peso. Uma recente metanálise que incluiu nove ensaios clínicos randomizados mostrou que a quercetina não altera o peso corporal, nem a circunferência abdominal dos indivíduos (37).

O peso dos epidídimos e dos ductos deferentes foi menor nos grupos com dieta hiperlipídica. O peso desses órgãos tem relação com a produção espermática, já que são canais de trânsito e armazenamento dos espermatozoides, quanto maior a produção espermática, maior o peso dos órgãos. É sabido que a esteatose hepática devido à dieta hiperlipídica diminui a concentração espermática e o peso do epidídimo (5). Foi observado uma correlação entre o consumo de ácidos graxos saturados e diminuição na concentração espermática de homens (38). Nenhuma das concentrações utilizadas de quercetina foi capaz de reverter o peso desses órgãos.

A dieta hiperlipídica não alterou o peso dos testículos nem a área de epitélio germinativo dos túbulos seminíferos. Alguns estudos com esteatose hepática mostram diminuição do peso do testículo e alterações celulares nos túbulos, apoptose das células germinativas e vacuolização (4,5). Essas diferenças podem ser devido às diferentes dietas hiperlipídicas usadas nos estudos, óleo de canola (4) e ração com 23% de banha suína (5). Nesse estudo, com 25% de banha suína, o peso dos animais não foi menor que do controle, indicando uma maior ingesta de ração (5).

A motilidade e a morfologia espermática também não se alteraram com a dieta hiperlipídica com ou sem quercetina. Em estudo com dieta hiperlipídica de óleo de canola, a dieta aumentou os defeitos morfológicos nos espermatozoides e também a porcentagem de espermatozoides imóveis (4). Já no estudo com ratos com esteatose hepática provocada por dieta hiperlipídica com banha de porco, não foi observado aumento nos defeitos morfológicos dos espermatozoides (5).

Não foi detectado peroxidação lipídica nos testículos dos grupos submetidos à dieta hiperlipídica no presente estudo. O malondialdeído (MDA) é um dos produtos secundários da peroxidação lipídica, que pode ser medido por meio de sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), que produz o complexo MDA-TBA, detectado por

espectrofotometria método conhecido como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (39). O MDA é um produto final da peroxidação lipídica, principalmente proveniente do ácido araquidônico, proveniente do ácido graxo ômega-6 (ácido linoleico), que está em menores concentrações na banha suína e talvez por isso a dieta hiperlipídica não tenha causado peroxidação lipídica nas células testiculares. A produção excessiva de MDA contribui para o aumento da resposta inflamatória por ativação de citocinas pró-inflamatórias. No presente estudo também não houve alteração na expressão gênica de *Tnfa* e *Il6*.

A maior expressão gênica de *Sod2* nos testículos do HF comparado com HFQ20 não refletiu uma redução no estresse oxidativo, pois houve redução do índice de estresse oxidativo e de glutathiona oxidada em dissulfeto (GSSG) nos ratos que receberam dieta HF e 20 mg de quercetina, comparado ao grupo HF sem quercetina, confirmando nossa hipótese de que a quercetina diminuiria o estresse oxidativo testicular. Já 10 mg diários de quercetina não teve efeito na redução no índice de estresse oxidativo, nem na concentração da GSSG nos testículos. A dieta hiperlipídica aumentou as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) como se esperava, pois a GSH possui papel central na defesa do organismo contra o estresse oxidativo, sendo o tiol mais abundante nas células (40).

A atividade da glutathiona-S-transferase (GST) não diferiu entre os grupos, esta enzima tem a função catalisar reações de conjugação da glutathiona reduzida (GSH) com os metabólitos produzidos, facilitando assim sua excreção. Também não houve diferença entre os grupos nem na expressão gênica da catalase, nem na sua atividade, a catalase é responsável pela oxidação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio.

Conclui-se que a suplementação de 20 mg de quercetina diária reduz o estresse oxidativo testicular em ratos com esteatose hepática provocada por dieta hiperlipídica.

Referências

1. Janssens S, Heemskerk MM, van den Berg SA, van Riel NA, Nicolay K, Willems van Dijk K, et al. Effects of low-stearate palm oil and high-stearate lard high-fat diets on rat liver lipid metabolism and glucose tolerance. *Nutrition & Metabolism* [Internet]. 2015 Dec 18;12(1):57. Available from: <http://www.nutritionandmetabolism.com/content/12/1/57>
2. Auguet T, Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porrás JA. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology* [Internet]. 2014 Jul;221. Available from: <http://www.dovepress.com/molecular-pathways-in-non-alcoholic-fatty-liver-disease-peer-reviewed-article-CEG>
3. Craig JR, Jenkins TG, Carrell DT, Hotaling JM. Obesity, male infertility, and the sperm epigenome. *Fertility and Sterility* [Internet]. 2017 Apr;107(4):848–59. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028217302364>
4. Mohammadghasemi F, Abbasi M, Rudkhaneei K, Aghajany-Nasab M. Beneficial effect of apple vinegar on reproductive parameters in male rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *Andrologia* [Internet]. 2018 Oct;50(8):e13065. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/and.13065>
5. Li Y, Liu L, Wang B, Xiong J, Li Q, Wang J, et al. Impairment of reproductive function in a male rat model of non-alcoholic fatty liver disease and beneficial effect of N-3 fatty acid supplementation. *Toxicology Letters* [Internet]. 2013 Oct;222(2):224–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427413008448>
6. Funes A, Saez Lancellotti TE, Santillan LD, Della Vedova MC, Monclus MA, Cabrillana ME, et al. A chronic high-fat diet causes sperm head alterations in C57BL/6J mice. *Heliyon* [Internet]. 2019 Nov;5(11):e02868. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844019365272>
7. Ghanayem BI, Bai R, Kissling GE, Travlos G, Hoffler U. Diet-Induced Obesity in Male Mice Is Associated with Reduced Fertility and Potentiation of Acrylamide-Induced Reproductive Toxicity¹. *Biology of Reproduction* [Internet]. 2010 Jan 1;82(1):96–104. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.109.078915>
8. Collodel G, Castellini C, Lee JC-Y, Signorini C. Relevance of Fatty Acids to

- Sperm Maturation and Quality. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [Internet]. 2020 Feb 5;2020:1–14. Available from:
<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2020/7038124/>
9. Aguirre L, Arias N, Macarulla MT, Gracia A, Portillo MP. Beneficial Effects of Quercetin on Obesity and Diabetes. *The Open Nutraceuticals Journal* [Internet]. 2011 Nov 3;4(1):189–98. Available from:
<http://benthamopen.com/ABSTRACT/TONUUTRAJ-4-189>
 10. Yelumalai S, Giribabu N, Karim K, Omar SZ, Salleh N Bin. In vivo administration of quercetin ameliorates sperm oxidative stress, inflammation, preserves sperm morphology and functions in streptozotocin-nicotinamide induced adult male diabetic rats. *Archives of Medical Science* [Internet]. 2019;15(1):240–9. Available from:
<https://www.termedia.pl/doi/10.5114/aoms.2018.81038>
 11. Cintra DEC. Integração entre vias metabólicas e inflamatórias durante a de esteatose hepática induzida por dieta hiperlipídica [Internet]. Universidade Estadual de Campinas; 2008. Available from:
http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/312910/1/Cintra_DennysEsper_D.pdf
 12. Trusov N V., Apryatin SA, Gorbachev AY, Naumov VA, Mzhelskaya K V., Gmoshinski I V. The effect of hypercaloric diet and Quercetin on the full-transcriptome liver tissue profile of Zucker-LEPR^{fa} rats. *Problems of Endocrinology* [Internet]. 2019 Apr 1;64(6):371–82. Available from:
<https://probl-endojournals.ru/probl/article/view/9936>
 13. Trusov N V., Apryatin SA, Shipelin VA, Shumakova AA, Gmoshinski I V., Nikityuk DB, et al. Effect of Administration of Carnitine, Resveratrol, and Aromatic Amino Acids with High-Fat-High-Fructose Diet on Gene Expression in Liver of Rats: Full Transcriptome Analysis. *Russian Journal of Genetics* [Internet]. 2021 Oct 12;57(10):1149–63. Available from:
<https://link.springer.com/10.1134/S1022795421100136>
 14. Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation. *Reproductive toxicology* (Elmsford, NY) [Internet]. 1996;10(3):237–44. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8738562>
15. Filler R. Methods for Evaluation of Rat Epididymal Sperm Morphology. In: Male Reproductive Toxicology [Internet]. Elsevier; 1993. p. 334–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124612075500250>
 16. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic acids research [Internet]. 2001;29(9):e45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886>
 17. Souza AC de, Silva DG da, Jezuino J da S, Ferreira ARO, Ribeiro MVG, Vidigal CB, et al. Protein restriction during peripubertal period impairs endothelial aortic function in adult male Wistar rats. Journal of Developmental Origins of Health and Disease [Internet]. 2023 May 18;1–8. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S2040174423000119/type/journal_article
 18. Senthilkumar M, Amaesan N, Sankaranarayanan A. Plant-Microbe Interactions [Internet]. New York, NY: Springer US; 2021. (Springer Protocols Handbooks). Available from: <https://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-1080-0>
 19. Aebi H. [13] Catalase in vitro. In 1984. p. 121–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687984050163>
 20. Keen JH, Habig WH, Jakoby WB. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. Journal of Biological Chemistry [Internet]. 1976 Oct;251(20):6183–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820818420>
 21. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. Nature Protocols [Internet]. 2006 Dec 31;1(6):3159–65. Available from: <https://www.nature.com/articles/nprot.2006.378>
 22. Carrara IM, Melo GP, Bernardes SS, Neto FS, Ramalho LNZ, Marinello PC, et al. Looking beyond the skin: Cutaneous and systemic oxidative stress in UVB-induced squamous cell carcinoma in hairless mice. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology [Internet]. 2019 Jun;195:17–26. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134418312132>
 23. Maia JP da C. Suplementação com quercetina reduz a dislipidemia e a esteatose hepática em ratos alimentados com dieta obesogênica

- OBESOGÊNICA. Universidade do Oeste Paulista; 2019.
24. Lionetti L, Mollica MP, Donizzetti I, Gifuni G, Sica R, Pignalosa A, et al. High-Lard and High-Fish-Oil Diets Differ in Their Effects on Function and Dynamic Behaviour of Rat Hepatic Mitochondria. Jekabsons M, editor. PLoS ONE [Internet]. 2014 Mar 24;9(3):e92753. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0092753>
 25. Zhao M, Zang B, Cheng M, Ma Y, Yang Y, Yang N. Differential Responses of Hepatic Endoplasmic Reticulum Stress and Inflammation in Diet-Induced Obese Rats with High-Fat Diet Rich in Lard Oil or Soybean Oil. Miele C, editor. PLoS ONE [Internet]. 2013 Nov 6;8(11):e78620. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0078620>
 26. Kai M, Miyoshi M, Fujiwara M, Nishiyama Y, Inoue T, Maeshige N, et al. A lard-rich high-fat diet increases hepatic peroxisome proliferator-activated receptors in endotoxemic rats. *Journal of Surgical Research* [Internet]. 2017 May;212:22–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022480416305273>
 27. Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Tsalouhidou S, Yepuri G, Mougios V, et al. Hepatic Mitochondrial Energetics During Catch-Up Fat With High-Fat Diets Rich in Lard or Safflower Oil. *Obesity* [Internet]. 2012 Sep;20(9):1763–72. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1038/oby.2011.167>
 28. Migliaccio, Gregorio, Putti, Lionetti. Mitochondrial Involvement in the Adaptive Response to Chronic Exposure to Environmental Pollutants and High-Fat Feeding in a Rat Liver and Testis. *Cells* [Internet]. 2019 Aug 5;8(8):834. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/8/834>
 29. El-Kader SMA. Non-alcoholic fatty liver disease: The diagnosis and management. *World Journal of Hepatology* [Internet]. 2015;7(6):846. Available from: <http://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v7/i6/846.htm>
 30. Vidyashankar S, Sandeep Varma R, Patki PS. Quercetin ameliorate insulin resistance and up-regulates cellular antioxidants during oleic acid induced hepatic steatosis in HepG2 cells. *Toxicology in Vitro* [Internet]. 2013 Mar;27(2):945–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233313000155>
 31. Gori M, Giannitelli SM, Zancla A, Mozetic P, Trombetta M, Merendino N, et al. Quercetin and hydroxytyrosol as modulators of hepatic steatosis: A NAFLD-on-

- a-chip study. *Biotechnology and Bioengineering* [Internet]. 2021 Jan 18;118(1):142–52. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.27557>
32. Kanter M, Aktas C, Erboğa M. Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Food and Chemical Toxicology* [Internet]. 2012 Mar;50(3–4):719–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691511006491>
 33. Akinmoladun AC, Olaniyan OO, Famusiwa CD, Josiah SS, Olaleye MT. Ameliorative effect of quercetin, catechin, and taxifolin on rotenone-induced testicular and splenic weight gain and oxidative stress in rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* [Internet]. 2020 May 26;31(3). Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/jbcpp-2018-0230/html>
 34. Stevenson JL, Paton CM, Cooper JA. Hunger and satiety responses to high-fat meals after a high-polyunsaturated fat diet: A randomized trial. *Nutrition* [Internet]. 2017 Sep;41:14–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900717300588>
 35. Stevenson JL, Clevenger HC, Cooper JA. Hunger and satiety responses to high-fat meals of varying fatty acid composition in women with obesity. *Obesity* [Internet]. 2015 Oct;23(10):1980–6. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/oby.21202>
 36. Ahmad Nizar NN, Nazrim Marikkar JM, Hashim DM. Differentiation of Lard, Chicken Fat, Beef Fat and Mutton Fat by GCMS and EA-IRMS Techniques. *Journal of Oleo Science* [Internet]. 2013;62(7):459–64. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/62/7/62_459/_article
 37. Huang H, Liao D, Dong Y, Pu R. Clinical effectiveness of quercetin supplementation in the management of weight loss: a pooled analysis of randomized controlled trials. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* [Internet]. 2019 Apr;Volume 12:553–63. Available from: <https://www.dovepress.com/clinical-effectiveness-of-quercetin-supplementation-in-the-management--peer-reviewed-article-DMSO>
 38. Jensen TK, Heitmann BL, Jensen MB, Halldorsson TI, Andersson A-M, Skakkebaek NE, et al. High dietary intake of saturated fat is associated with reduced semen quality among 701 young Danish men from the general

- population. The American Journal of Clinical Nutrition [Internet]. 2013 Feb 1;97(2):411–8. Available from:
<https://academic.oup.com/ajcn/article/97/2/411/4577122>
39. Grotto D, Valentini J, Boeira S, Paniz C, Maria LS, Vicentini J, et al. Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo: malondialdeído. Química Nova [Internet]. 2008;31(2):275–9. Available from:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000200016&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
40. Huber PC, Almeida WP, Fátima Â de. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. Química Nova [Internet]. 2008;31(5):1170–9. Available from:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000500046&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt

FIGURA 1. Delineamento experimental do presente estudo. Os 24 ratos Wistar foram divididos em 4 diferentes grupos experimentais: CT (animais controle que receberam a ração balanceada comercial e receberam goma sem quercetina); HF (animais com dieta hiperlipídica que receberam goma sem quercetina); HFQ10 (animais com dieta hiperlipídica e suplementação com 10 mg/dia de goma de quercetina); HFQ20 (animais que receberam ração hiperlipídica e suplementação com 20 mg/dia de goma quercetina). O experimento deve duração de 4 meses e após 2 meses de consumo de ração comercial ou dieta hiperlipídica, a suplementação com goma de quercetina foi adicionada diariamente até o término do experimento.

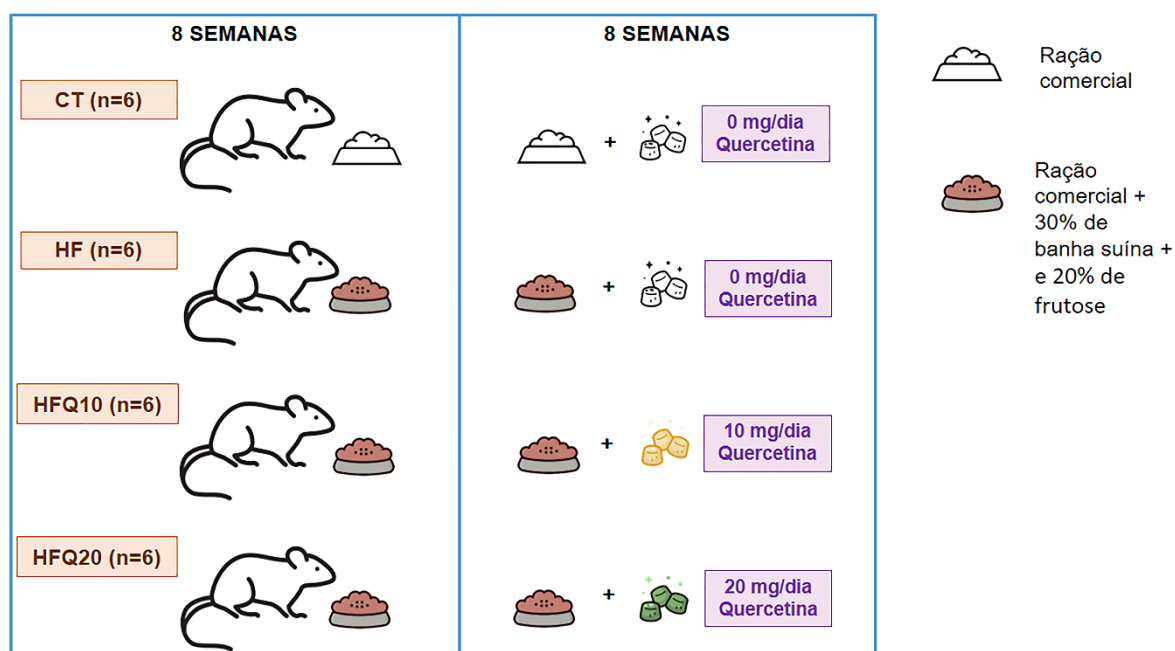
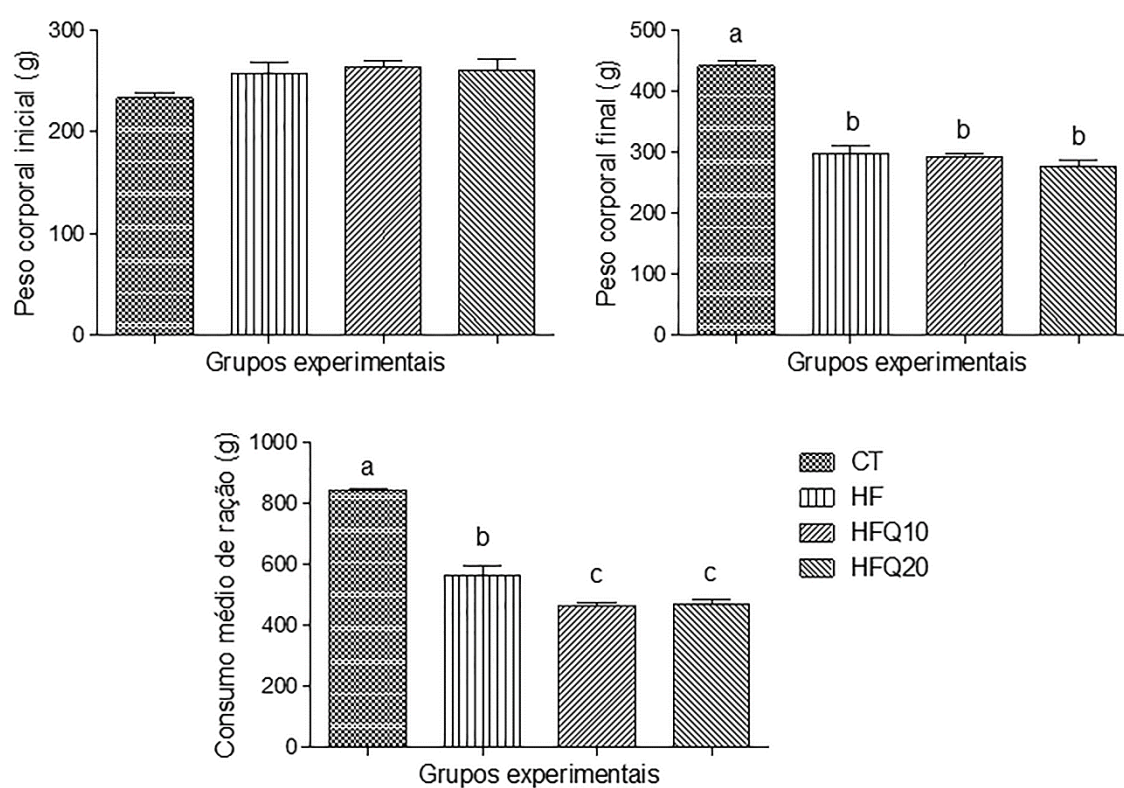
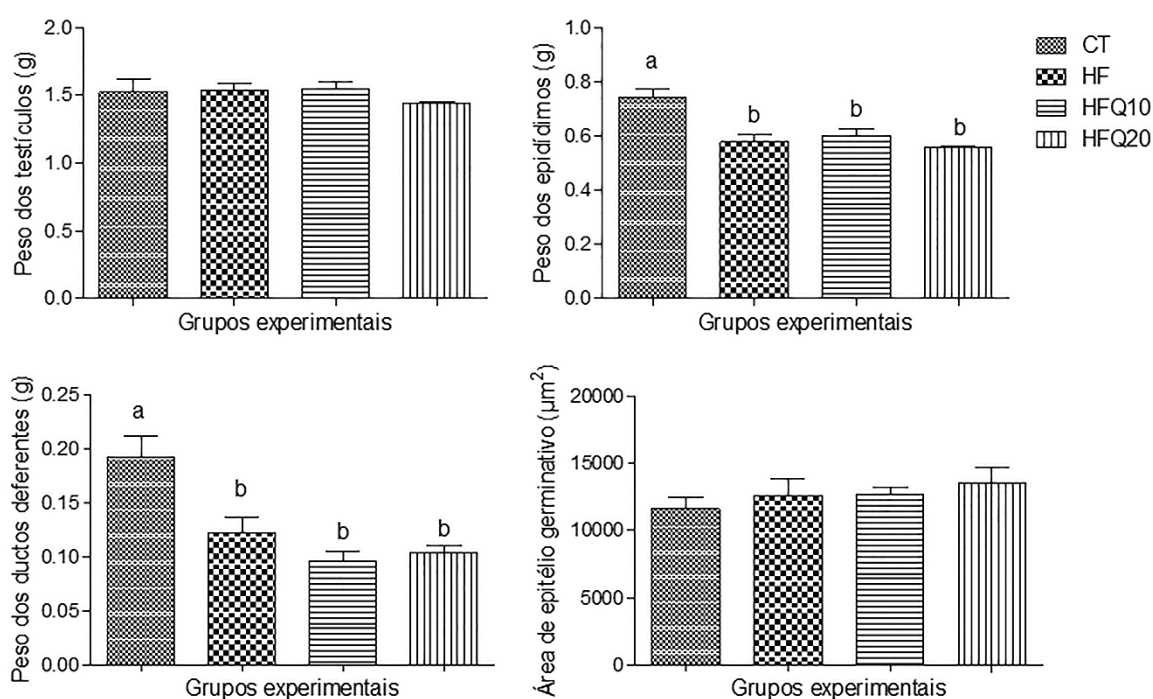


FIGURA 2. Média e erro padrão da média dos pesos corporais inicial e final dos ratos Wistar e do consumo de ração dos mesmos durante os quatro meses de experimento. Os grupos experimentais foram (n=6): CT (animais controle que receberam a ração balanceada comercial e receberam goma sem quercetina); HF (animais com dieta hiperlipídica que receberam goma sem quercetina); HFQ10 (animais com dieta hiperlipídica e suplementação com 10 mg/dia de goma de quercetina); HFQ20 (animais que receberam ração hiperlipídica e suplementação com 20 mg/dia de goma quercetina).



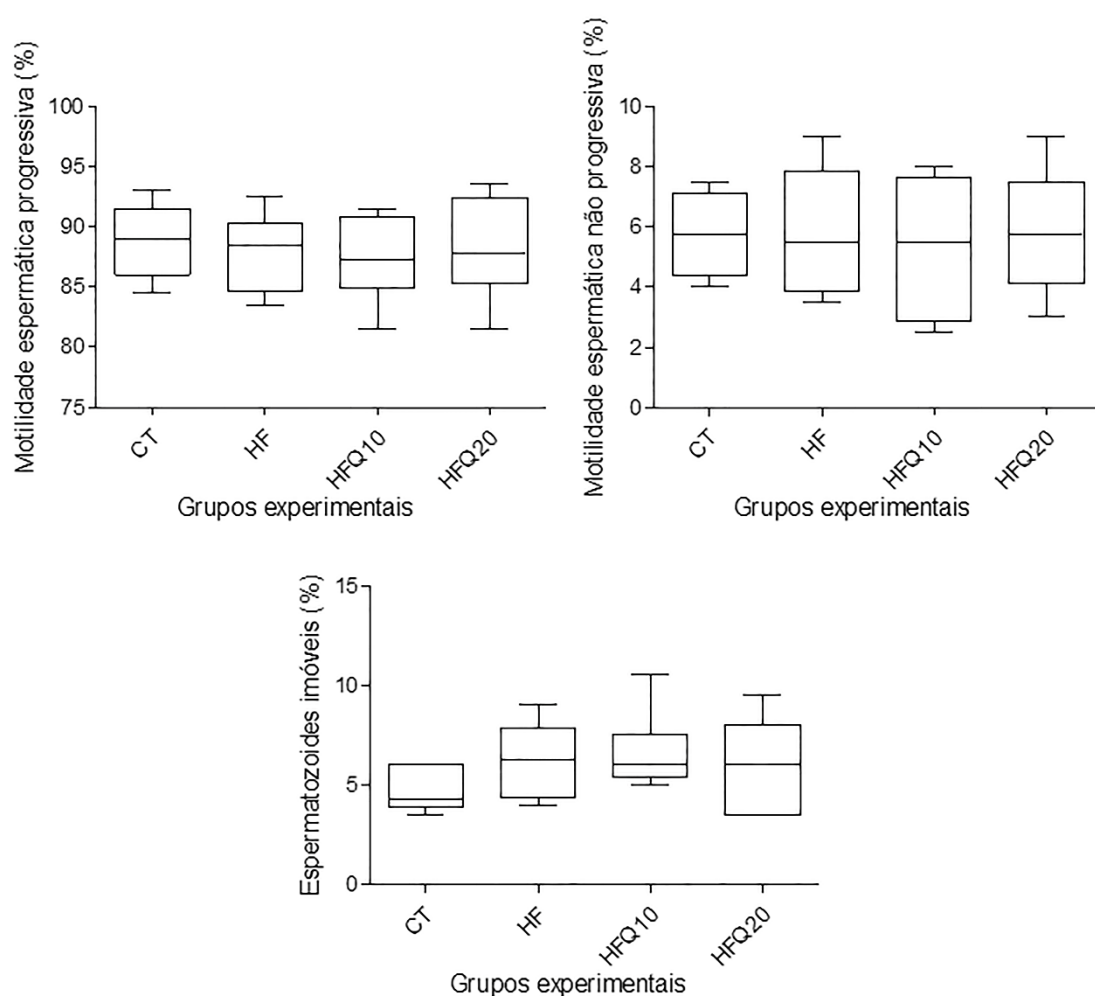
Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos experimentais. ANOVA seguida de Tukey ($P < 0,05$).

FIGURA 3. Média e erro padrão da média dos pesos dos testículos, epidídimos e ductos deferentes e área do epitélio germinativo dos túbulos seminíferos de ratos Wistar dos seguintes grupos experimentais foram (n=6): CT (animais controle que receberam a ração balanceada comercial e receberam goma sem quercetina); HF (animais com dieta hiperlipídica que receberam goma sem quercetina); HFQ10 (animais com dieta hiperlipídica e suplementação com 10 mg/dia de goma de quercetina); HFQ20 (animais que receberam ração hiperlipídica e suplementação com 20 mg/dia de goma quercetina).



Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos experimentais. ANOVA seguida de Tukey ($P < 0,05$).

FIGURA 4. Mediana, mínima e máxima da porcentagem de espermatozoides em movimento progressivo, em movimento não progressivo e de espermatozoides imóveis de ratos Wistar dos seguintes grupos experimentais foram (n=6): CT (animais controle que receberam a ração balanceada comercial e receberam goma sem quercetina); HF (animais com dieta hiperlipídica que receberam goma sem quercetina); HFQ10 (animais com dieta hiperlipídica e suplementação com 10 mg/dia de goma de quercetina); HFQ20 (animais que receberam ração hiperlipídica e suplementação com 20 mg/dia de goma quercetina).



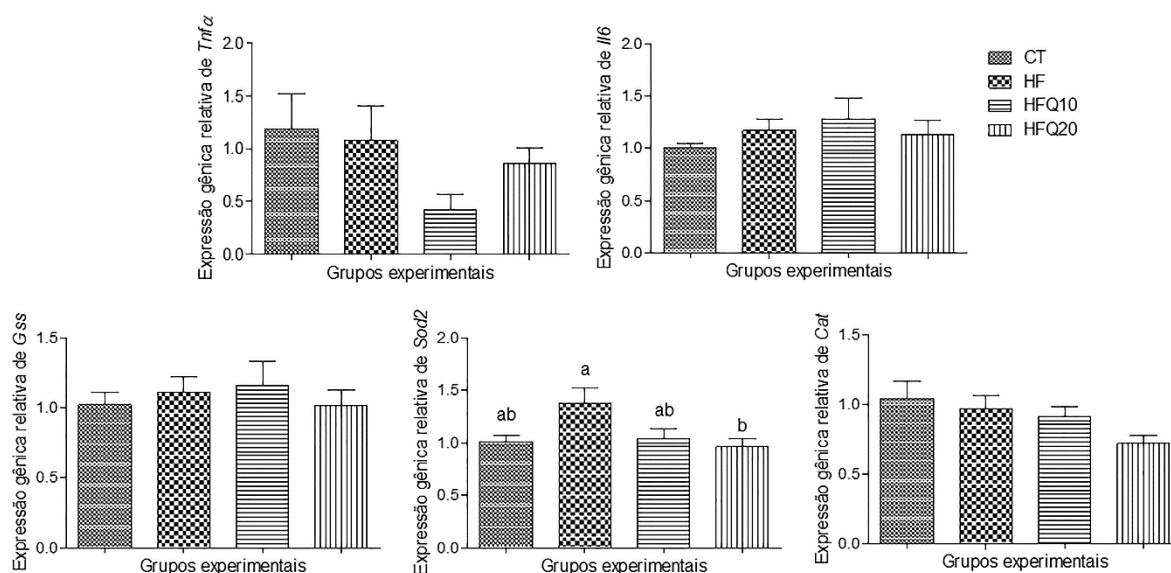
Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. Kruskal-Wallis seguido de Dunn ($P > 0,05$).

TABELA 1. Mediana (mínima-máxima) da porcentagem de morfologia espermática de ratos Wistar de 4 diferentes grupos experimentais (n=6): CT (animais controle que receberam a ração balanceada comercial e receberam goma sem quercetina); HF (animais com dieta hiperlipídica que receberam goma sem quercetina); HFQ10 (animais com dieta hiperlipídica e suplementação com 10 mg/dia de goma de quercetina); HFQ20 (animais que receberam ração hiperlipídica e suplementação com 20 mg/dia de goma quercetina).

Morfologia espermática	Grupos experimentais			
	CT	HF	HFQ10	HFQ20
Sem patologias	80,75 (59,0-90,5)	84,50 (69,0-91,0)	84,75 (64,5-90,5)	89,00 (73,5-91,0)
Patologias de cabeça	15,75 (9,0-34,0)	12,25 (5,0-26,0)	11,75 (8,5-31,0)	7,75 (7-21,5)
Patologias da cauda	3,75 (0,5-7,0)	4,5 (0,5-6,0)	3,25 (1,0-8,0)	3,25 (2,0-5,0)

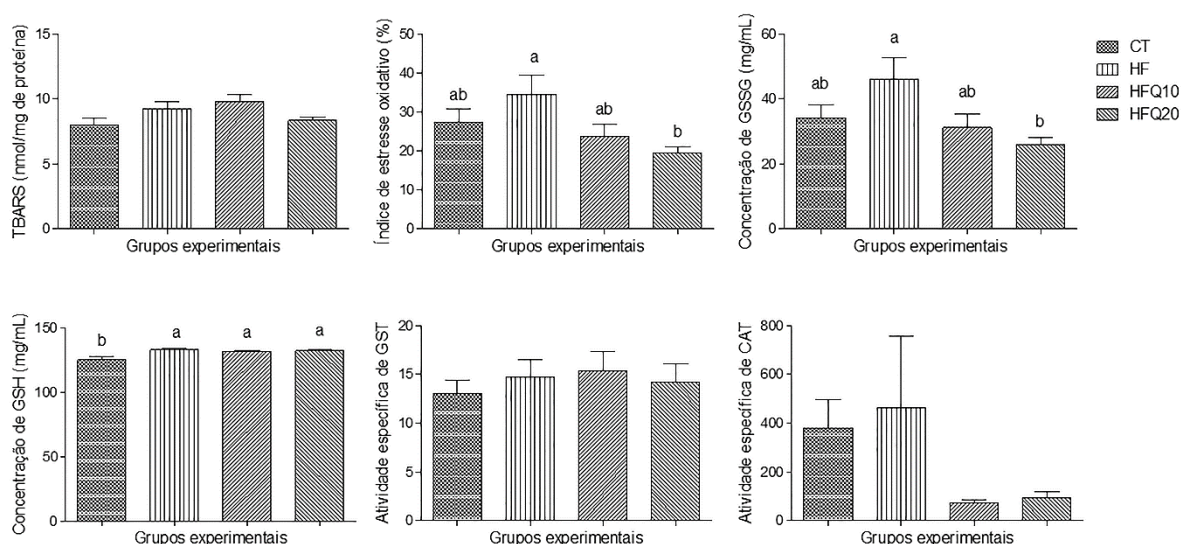
Não houve diferença entre os grupos experimentais ($P > 0,05$).

FIGURA 5: Expressão gênica relativa de genes inflamatórios (*Tnfa* e *Il6*) e de genes antioxidantes (*Gss*, *Sod2* e *Cat*) em testículos de ratos Wistar dos seguintes grupos experimentais foram (n=6): CT (animais controle que receberam a ração balanceada comercial e receberam goma sem quercetina); HF (animais com dieta hiperlipídica que receberam goma sem quercetina); HFQ10 (animais com dieta hiperlipídica e suplementação com 10 mg/dia de goma de quercetina); HFQ20 (animais que receberam ração hiperlipídica e suplementação com 20 mg/dia de goma quercetina). O gene referência utilizado foi o *Hprt1*.



Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos experimentais. ANOVA seguida de Tukey ($P < 0,05$).

FIGURA 6: Média e erro padrão da média do TBARS - quantidade de malondialdeído (MDA), índice de estresse oxidativo (IEO%), concentração de glutathiona oxidada (GSSG), concentração de glutathiona reduzida (GSH) e as atividades específicas das enzimas glutathiona-S-transferase (GST) e catalase (CAT) em testículos de ratos Wistar dos seguintes grupos experimentais foram (n=6): CT (animais controle que receberam a ração balanceada comercial e receberam goma sem quercetina); HF (animais com dieta hiperlipídica que receberam goma sem quercetina); HFQ10 (animais com dieta hiperlipídica e suplementação com 10 mg/dia de goma de quercetina); HFQ20 (animais que receberam ração hiperlipídica e suplementação com 20 mg/dia de goma quercetina).



Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos experimentais. ANOVA seguida de Tukey ($P < 0,05$).

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PIBIC-EM - Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica para o Ensino Médio

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE QUERCETINA NA EXPRESSÃO GÊNICA DE TNF α E IL6 NOS TESTÍCULOS DE RATOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERCALÓRICA", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 6151 e tendo como participante(s) ALINE DE OLIVEIRA SANTOS (discente), GABRIELA BRAMBILO MENEGASSO VIEIRA (discente), MELINA COTINI ORBOLATO (discente), MAYARA DE OLIVEIRA VIDOTTO FIGUEIREDO (técnico participante), GIOVANA GALUCCI HENRIQUES (participante externo/voluntário), LUIS SOUZA LIMA DE SOUZA REIS (docente), INES CRISTINA GIOMETTI CEDA (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 17/06/2020.

MATERIAL ARMAZENADO/DOADO

Protocolo(s)	Data Aprovação	Armazenado (local)	É doação	Detalhes armazenamento
3567	07/12/2016	UNOESTE	SIM	Freezer a -80oC no Laboratório de Genética Molecular - Bloco Q - Campus II

Presidente Prudente, 10 de Junho de 2021.

Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CPDI

Prof. Dra. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE



Author Guidelines

Sections

- [1. Submission](#)
- [2. Aims and Scope](#)
- [3. Manuscript Categories and Requirements](#)
- [4. Preparing the Submission](#)
- [5. Editorial Policies and Ethical Considerations](#)
- [6. Author Licensing](#)
- [7. Publication Process After Acceptance](#)
- [8. Post Publication](#)
- [9. Editorial Office Contact Details](#)

1. SUBMISSION

New submissions should be made via the Research Exchange submission portal submission.wiley.com/journal/aji. Should your manuscript proceed to the revision stage, you will be directed to make your revisions via the same submission portal. You may check the status of your submission at anytime by logging on to submission.wiley.com and clicking the "My Submissions" button. For technical help with the submission system, please review our [FAQs](#) or contact submissionhelp@wiley.com.

Data protection

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>.

Preprint policy

[Please find the Wiley preprint policy here.](#)

This journal accepts articles previously published on preprint servers.

American Journal of Reproductive Immunology will consider for review articles previously available as preprints. Authors may also post the submitted version of a manuscript to a preprint server at any time. Authors are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

For help with submissions, please contact: AJRledoffice@wiley.com

2. AIMS AND SCOPE

The *American Journal of Reproductive Immunology* is an international journal devoted to the presentation of current information in all areas relating to Reproductive Immunology. The journal is directed toward both the basic scientist and the clinician, covering the whole process of reproduction as affected by immunological processes. The journal covers a variety of subspecialty topics, including fertility immunology, pregnancy immunology, immunogenetics, mucosal immunology, immunocontraception, endometriosis, abortion, tumor immunology of the reproductive tract, autoantibodies, infectious disease of the reproductive tract, and technical news.

3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

i. Research Articles

Reports of original, basic, clinical, translational studies relating to Reproductive Immunology. The reports should be well documented, novel, and significant. Research articles are published an average of 40 days after their final acceptance.

Word limit: 5,000 words maximum, excluding references.

Abstract: 250 words maximum; must be structured, under the sub-headings: Problem, Method of Study, Results, Conclusions.

References: Maximum of 150 references.

Figures/Tables: Total of no more than 8 figures and tables.

ii. Reviews

Articles that review a timely subject important to reproductive immunologist researchers. Reviews must be written as concisely as possible. All Review Articles, whether or invited or not, will be subject to peer review.

Word limit: 5,000 words maximum, excluding abstract, references and figures/tables.

Abstract: 200 words maximum, not to be structured.

References: Maximum of 250 references.

Figures/Tables: Total of no more than 5 figures and tables.

iii. Letters to the Editor and Opinion

The Editors invite the submission of correspondence that presents considered opinions in response to articles published in the journal or meeting presentations. Letters to the Editor will be peer reviewed and, if found to meet the requisite publication criteria the Letter may be sent to the author(s) of the originally published article and possibly to other interested parties for a response to be published in the same issue of the journal as the Letter.

Word limit: 800

References: 10

Figures/Tables: 1

iv. Technical Note

The objective of Technical Notes is to describe primary research data on a new technique that is likely to be influential in the field of reproductive immunology. Technical Notes have a format broadly similar to that of Original Articles, though many Technical Notes are shorter than a typical Article. Technical Notes may be accompanied by supplementary information. Technical Notes are peer reviewed, and authors must provide a competing financial interests statement before publication.

Word limit: 3000

Abstract: 250 words maximum; must be structured, under the sub-headings: Problem, Method of Study, Results, Conclusions.

Structure: Introduction, Material and Methods and a combined Results and Discussion section. If statistical testing was used to analyze the data, the Methods section must contain a subsection on statistical analysis.

References: 100.

Figures/Tables: There is no strict limit on the number of display items.

v. Short Communications/Cutting Edge

Short Communications/Cutting Edge is the rapid publication section for the AJRI and represents short reports describing significant advances in an area of reproductive immunology. Manuscripts submitted for consideration in this section should present scientifically sound and novel research and contain unusual interest to reproductive immunologist. In addition to research reports, Short Communications/Cutting Edge section publishes invited Commentaries on controversial issues or findings of high interest for the field of reproduction and immunology.

Word limit: Concise manuscripts of five or less journal pages which represent not more than 2,500 words.

Abstract: 200 words maximum; must be structured, under the sub-headings: Problem, Method of Study, Results, Conclusions.

Structure: Introduction, Material and Methods and a combined Results and Discussion section.

References: 80

Figures/Tables: 3 figures and 1 table

4. PREPARING THE SUBMISSION

Cover Letters

Cover letters are not mandatory; however, they may be supplied at the author's discretion.

Free format submission

The *American Journal of Reproductive Immunology* offers free format submission for a simplified and streamlined submission process.

Before you submit, you will need:

- Your manuscript: this should be an editable file including text, figures, and tables, or separate files—whichever you prefer. All required sections should be contained in your manuscript, including abstract, introduction, methods, results, and conclusions. Figures and tables should have legends. Figures should be uploaded in the highest resolution possible. References may be submitted in any style or format, as long as it is consistent throughout the manuscript. Supporting information should be submitted in separate files. If the manuscript, figures or tables are difficult for you to read, they will also be difficult for the editors and reviewers, and the editorial office will send it back to you for revision. Your manuscript may also be sent back to you for revision if the quality of English language is poor.
- An ORCID ID, freely available at <https://orcid.org>. (*Why is this important? Your article, if accepted and published, will be attached to your ORCID profile. Institutions and funders are increasingly requiring authors to have ORCID IDs.*)
- The title page of the manuscript, including:
 - Your co-author details, including their affiliation and email address. (*Why is this important? We need to keep all co-authors informed of the outcome of the peer review process.*)

- An ethical statement which should include any necessary ethical approval(s) and consent procedures. (*Why are these important? We need to uphold rigorous ethical standards for the research we consider for publication*)
- Statement of contribution for authors, listing each author's contribution to the manuscript.

If you are invited to revise your manuscript after peer review, the journal will request the revised manuscript to be formatted according to journal requirements as described below.

Parts of the Manuscript

The manuscript should be submitted in separate files: main text file; figures.

Main Text File

The text file should be presented in the following order:

- i. A short informative title that contains the major key words. The title should not contain abbreviations (see Wiley's [best practice SEO tips](#));
- ii. A short running title of less than 45 characters;
- iii. The full names of the authors;
- iv. The author's institutional affiliations where the work was conducted, with a footnote for the author's present address if different from where the work was conducted;
- v. Acknowledgments;
- vi. Conflict of interest statement;
- vii. Author contribution statement
- viii. Ethics statement
- ix. Abstract and keywords;
- x. Main text;
- xi. References;
- xii. Tables (each table complete with title and footnotes);
- xiii. Figure legends;
- xiv. Appendices (if relevant).

Figures and supporting information should be supplied as separate files.

Author Contributions

For all articles, the journal mandates the CRediT (Contribution Roles Taxonomy)—more information is available on our [Author Services](#) site.

Authorship

Please refer to the journal's authorship policy the [Editorial Policies and Ethical Considerations](#) section for details on eligibility for author listing.

Acknowledgments

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

Conflict of Interest Statement

Authors will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. For details on what to include in this section, see the section 'Conflict of Interest' in the [Editorial Policies and Ethical Considerations](#) section below. Submitting authors should ensure they liaise with all co-

authors to confirm agreement with the final statement.

Ethics Statement

Authors must include an Ethics Statement confirming that they have adhered to the journal's ethical policy. This should state the ethical guidelines followed and the ethical approval process and approval number, if available. If no ethical approval was required, for example, if the paper is a review which includes no original research data – this should be stated within the Ethics Statement. Examples of how these statements may look are below:

Example of an Ethics Statement where ethical approval **was** required: *'The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to and the appropriate ethical review committee approval has been received. The study conformed to the US Federal Policy for the Protection of Human Subjects.'*

Example of an Ethics Statement where ethical approval **was not** required: *'The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to. No ethical approval was required as this is a review article with no original research data.'*

Author Contribution Statement

Statement of contribution for authors, listing each author's contribution to the manuscript.

Abstract

Abstracts are required for some manuscript types. For details on manuscript types that require abstracts, as well as how to prepare them, please refer to the 'Manuscript Types and Criteria' section.

Graphical Abstract

Please upload the Graphical Abstract as a Graphical Abstract Image and separate Graphical Abstract Text file. The Graphical Abstract Image is an illustration published in the Table of Contents to help non-specialists understand the context and significance of your research. It should be approximately square, ideally in colour and should contain a high impact Figure, Graph or Photograph that summarises the key findings of your research. This image will be captioned with the Graphical Abstract Text that you supply as a separate file.

The Graphical Abstract Text is a short statement of 50 words or less (1-2 sentences) published in the Table of Contents that describes the key findings and main message of the work. This caption will appear with the Graphical Abstract Image that you supply as a separate file. As some search engines may not return the Graphical Abstract Image with the text Abstract; the text Abstract should still be written in a manner that allows it to be understood without reference to the Graphical Abstract Image.

Keywords

Please provide 3-8 keywords. Keywords should be taken from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at www.nlm.nih.gov/mesh.

Main Text

- The journal uses US spelling; however, authors may submit using either option, as spelling of accepted papers is converted during the production process.
- Footnotes to the text are not allowed and any such material should be incorporated into the text as parenthetical matter.

References

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals. For more information about AMA reference style please consult the [AMA Manual of Style](#)

Sample references follow:

Journal article

1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.

Book

2. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.

Internet document

3. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2003*.

<http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2003PWSecured.pdf> Accessed March 3, 2003

Tables

Tables should be self-contained and complement, not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend, and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

Figure Legends

Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

Figures

Although authors are encouraged to send the highest-quality figures possible, for peer-review purposes, a wide variety of formats, sizes, and resolutions are accepted. [Click here](#) for the basic figure requirements for figures submitted with manuscripts for initial peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements.

Figures submitted in colour may be reproduced in colour online free of charge. Please note, however, that it is preferable that line figures (e.g. graphs and charts) are supplied in black and white so that they are legible if printed by a reader in black and white.

Data Citation

[Please review Wiley's data citation policy here.](#)

Additional Files

Appendices

Appendices will be published after the references. For submission they should be supplied as separate files but referred to in the text.

Graphical Table of Contents

The journal's table of contents will be presented in graphical form with a brief abstract.

The table of contents entry must include the article title, the authors' names (with the corresponding author indicated by an asterisk), no more than 80 words or 3 sentences of text summarising the key findings presented in the paper and a figure that best represents the scope of the paper (see the section on abstract writing for more guidance).

Table of contents entries should be submitted to Scholar One in one of the generic file formats and uploaded as 'Supplementary material for review' during the initial manuscript submission process.

The image supplied should fit within the dimensions of 50mm x 60mm, and be fully legible at this size.

Supporting Information

Supporting information is information that is not essential to the article, but provides greater depth and background. It is hosted online and appears without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc.

[Click here](#) for Wiley's FAQs on supporting information.

Note: if data, scripts, or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper.

General Style Points

The following points provide general advice on formatting and style.

- **Abbreviations:** In general, terms should not be abbreviated unless they are used repeatedly and the abbreviation is helpful to the reader. Initially, use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only.
- **Units of measurement:** All measurements must be given in metric units. English units may also be given parenthetically if the measurements were originally done in English units. These guidelines are in accordance with the 'Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals'.
- **Numbers:** numbers under 10 are spelt out, except for: measurements with a unit (8mmol/l); age (6 weeks old), or lists with other numbers (11 dogs, 9 cats, 4 gerbils).
- **Trade Names:** Chemical substances should be referred to by the generic name only. Trade names should not be used. Drugs should be referred to by their generic names. If proprietary drugs have been used in the study, refer to these by their generic name, mentioning the proprietary name and the name and location of the manufacturer in parentheses.

Wiley Author Resources

Manuscript Preparation Tips: Wiley has a range of resources for authors preparing manuscripts for submission available [here](#). In particular, authors may benefit from referring to Wiley's best practice tips on [Writing for Search Engine Optimization](#).

Article Preparation Support: [Wiley Editing Services](#) offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract

design – so you can submit your manuscript with confidence.

Also, check out our resources for [Preparing Your Article](#) for general guidance about writing and preparing your manuscript.

Guidelines for cover submissions: If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the cover of the journal, please follow these [general guidelines](#).

5. EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS

Peer Review and Acceptance

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to journal readership. Manuscripts are single-blind peer reviewed. Papers will only be sent to review if the Editor-in-Chief determines that the paper meets the appropriate quality and relevance requirements.

Wiley's policy on the confidentiality of the review process is [available here](http://www.wileypeerreview.com/reviewpolicy).

Expects Data Sharing

[Please review Wiley's policy here](#). This journal expects and peer review data sharing.

The journal expects that data supporting the results in the paper will be archived in an appropriate public repository. Authors are required to provide a data availability statement to describe the availability or the absence of shared data. When data have been shared, authors are required to include in their data availability statement a link to the repository they have used, and to cite the data they have shared. Whenever possible the scripts and other artefacts used to generate the analyses presented in the paper should also be publicly archived. If sharing data compromises ethical standards or legal requirements then authors are not expected to share it.

See the [Standard Templates for Author Use](#) section to select an appropriate data availability statement for your dataset.

Guidelines on Publishing and Research Ethics in Journal Articles

[Please review Wiley's policies surrounding human studies, animal studies, clinical trial registration, biosecurity, and research reporting guidelines here](#).

Genetic Nomenclature

Sequence variants should be described in the text and tables using both DNA and protein designations whenever appropriate. Sequence variant nomenclature must follow the current HGVS guidelines; see varnomen.hgvs.org, where examples of acceptable nomenclature are provided.

Conflict of Interest

The journal requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or directly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to: patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication. If

the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to disclose with the submission ALL pertinent commercial and other relationships.

Funding

Authors should list all funding sources in the Acknowledgments section. Authors are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the Open Funder Registry for the correct nomenclature: <https://www.crossref.org/services/funder-registry/>

Authorship

The list of authors should accurately illustrate who contributed to the work and how. All those listed as authors should qualify for authorship according to the following criteria:

1. Have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data;
2. Been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content;
3. Given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content; and
4. Agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section (for example, to recognize contributions from people who provided technical help, collation of data, writing assistance, acquisition of funding, or a department chairperson who provided general support). Prior to submitting the article all authors should agree on the order in which their names will be listed in the manuscript.

Additional Authorship Options. Joint first or senior authorship: In the case of joint first authorship, a footnote should be added to the author listing, e.g. 'X and Y should be considered joint first author' or 'X and Y should be considered joint senior author.'

As part of the journal's commitment to supporting authors at every step of the publishing process, the journal requires the submitting author (only) to provide an ORCID iD when submitting a manuscript. This takes around 2 minutes to complete. [Find more information here.](#)

Publication Ethics

This journal is a member of the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#). Note this journal uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read Wiley's Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors [here](#). Wiley's Publication Ethics Guidelines can be found [here](#).

Rapid publication

Concise manuscripts (4 or fewer journal pages) representing studies of outstanding scientific significance may be submitted for Rapid Publication. These manuscripts must be completely documented by reference to the literature and by a thorough description of the experimental procedures. If authors desire Rapid Publication, they must state so explicitly in their covering letter. For more information regarding guidelines for Rapid Publication, please contact the Central Editorial Office.

6. AUTHOR LICENSING

If a paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author will receive an email

prompting them to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper.

Authors may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or [open access](#) under the terms of a Creative Commons License.

General information regarding licensing and copyright is available [here](#). To review the Creative Commons License options offered under open access, please [click here](#). (Note that certain funders mandate that a particular type of CC license has to be used; to check this please click [here](#).)

Self-Archiving Definitions and Policies. Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions. Please [click here](#) for more detailed information about self-archiving definitions and policies.

Open Access fees: Authors who choose to publish open access will be charged a fee. For more information on this journal's APCs, please see the [Open Access page](#).

Funder Open Access: Please click [here](#) for more information on Wiley's compliance with specific Funder Open Access Policies.

7. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE

Accepted article received in production

When an accepted article is received by Wiley's production team, the corresponding author will receive an email asking them to login or register with [Wiley Author Services](#). The author will be asked to sign a publication license at this point.

Accepted Articles

The journal offers Wiley's Accepted Articles service for all manuscripts. This service ensures that accepted 'in press' manuscripts are published online shortly after acceptance, prior to copy-editing or typesetting. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance and appear in PDF format only. They are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked and are indexed by PubMed. After the final version article is published (the article of record), the DOI remains valid and can still be used to cite and access the article.

Accepted Articles will be indexed by PubMed; submitting authors should therefore carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript so it is accurate for indexing. Subsequently, the final copyedited and proofed articles will appear in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will update automatically.

Proofs

Once the paper is typeset, the author will receive an email notification with the URL to download a PDF typeset page proof, as well as associated forms and full instructions on how to correct and return the file.

Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made during the editorial process – authors should check proofs carefully. Note that proofs should be returned within 48 hours from receipt of first proof.

Early View

The journal offers rapid speed to publication via Wiley's Early View service. [Early View](#) (Online Version of Record) articles are published on Wiley Online Library before inclusion in an issue. Note there may be a delay after corrections are received before the article appears online, as Editors also need to review proofs. Once the article is published on Early View, no further changes to the article are possible. The Early View article is fully citable and carries an online publication date and DOI for citations.

8. POST PUBLICATION

Access and sharing

When the article is published online:

- The author receives an email alert (if requested).
- The link to the published article can be shared through social media.
- The author will have free access to the paper (after accepting the Terms & Conditions of use, they can view the article).
- The corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to the article.

Promoting the Article

To find out how to best promote an article, [click here](#).

Correction to Authorship

In accordance with [Wiley's Best Practice Guidelines on Research Integrity and Publishing Ethics](#) and the [Committee on Publication Ethics' guidance](#), *American Journal of Reproductive Immunology* will allow authors to correct authorship on a submitted, accepted, or published article if a valid reason exists to do so. All authors – including those to be added or removed – must agree to any proposed change. To request a change to the author list, please complete the [Request for Changes to a Journal Article Author List Form](#) and contact either the journal's editorial or production office, depending on the status of the article. Authorship changes will not be considered without a fully completed Author Change form. [Correcting the authorship is different from changing an author's name; the relevant policy for that can be found in [Wiley's Best Practice Guidelines](#) under "Author name changes after publication."]

Measuring the Impact of an Article

Wiley also helps authors measure the impact of their research through specialist partnerships with [Kudos](#) and [Altmetric](#).

Cover Image Submissions

This journal accepts artwork submissions for Cover Images. This is an optional service you can use to help increase article exposure and showcase your research. For more information, including artwork guidelines, pricing, and submission details, please visit the [Journal Cover Image page](#).

9. EDITORIAL OFFICE CONTACT DETAILS

AJRledoffice@wiley.com

Author Guidelines Updated 21 November 2019

Sign up for email alerts

Enter your email to receive alerts when new articles and issues are published.

Email address*

[Continue](#)

Submit an article

As of October 15, 2020, all new *American Journal of Reproductive Immunology* manuscripts are submitted through the [Research Exchange](#) platform.

Start your submission

For submissions started prior to October 15, 2020, please visit [Manuscript Central](#) to manage or complete your submission.

Official Journal of the American Society for Reproductive Immunology



More from this journal

[Top 20 Most Cited Articles](#)
[Special Issues](#)

More from this journal

[Top 20 Most Cited Articles](#)
[Special Issues](#)

About Wiley Online Library

[Privacy Policy](#)
[Terms of Use](#)

[About Cookies](#)

[Manage Cookies](#)

[Accessibility](#)

[Wiley Research DE&I Statement and Publishing Policies](#)

[Developing World Access](#)

[Help & Support](#)

[Contact Us](#)

[Training and Support](#)

[DMCA & Reporting Piracy](#)

[Opportunities](#)

[Subscription Agents](#)

[Advertisers & Corporate Partners](#)

[Connect with Wiley](#)

[The Wiley Network](#)

[Wiley Press Room](#)

Copyright © 1999-2023 John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved