

# Avaliação da qualidade seminal em adultos após o uso de spirulina platensis e resveratrol

## Evaluation of sperm quality in adults after use spirulina platensis and resveratrol

Franciele Bona Verzeletti<sup>1</sup>, Rodrigo Sell Poletto<sup>2</sup>, Telma Elita Bertolin<sup>3</sup>, Fernando Fornari<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Docente das Faculdades Integradas do Brasil (Unibrasil) e Graduada em Biomedicina pela Universidade Luterana do Brasil. Mestranda em Envelhecimento Humano (UPF).

<sup>2</sup>Estudante de Medicina na Faculdade Santa Marcelina (FASM), São Paulo-SP.

<sup>3</sup>Docente Universidade de Passo Fundo (UPF) e Graduada em Biologia. Doutora em Tecnologia Bioquímica Farmacêutica pela Universidade de São Paulo.

<sup>4</sup>Docente da Universidade de Passo Fundo (UPF) e Graduado em Medicina. Doutor em Ciências em Gastroenterologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

### RESUMO

A infertilidade masculina é causada por diferentes fatores. As causas mais comuns incluem número insuficiente de espermatozoides, e/ou pouca motilidade destes. O uso de antioxidantes poderia contribuir no tratamento da infertilidade masculina em pacientes com perda da qualidade seminal. O objetivo deste estudo foi avaliar se o uso de antioxidantes (*Spirulina platensis* e resveratrol) contribui na qualidade seminal em homens entre 40 e 60 anos de idade.

**Material e métodos:** Este é um estudo clínico randomizado com dois grupos: *Spirulina platensis* (Sp) e Resveratrol (R), cada um dos grupos foi composto por 25 homens entre 40 a 60 anos de idade, totalizando 50 homens. Para as análises, o grupo Sp foi submetido à terapia de 4g de *Spirulina platensis* em cápsulas e o grupo R foi submetidos à terapia com 500mg de Resveratrol em cápsulas, ambos durante 90 dias. As amostras foram submetidas às análises de Espermograma, Índice de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) e Catalase (CAT), antes e depois da terapia. Todos os homens foram submetidos a um questionário padrão. A análise de espermograma obteve significância na concentração ( $p=0,022$ ) e morfologia espermática ( $p=0,037$ ) com o uso de Sp, e significância na motilidade ( $p=0,027$ ) e vitalidade ( $p=0,017$ ) com uso de R.

**Conclusão:** a terapia de 90 dias com *Spirulina platensis* ou resveratrol tem um efeito estacionário das espécies reativas de oxigênio, contribuindo para a melhora da qualidade seminal em homens entre 40 e 60 anos de idade.

**Palavras chave:** Antioxidantes. Envelhecimento. Infertilidade masculina. Qualidade seminal.

### ABSTRACT

Male infertility may be caused by different factors. The most common ones include the insufficient number of sperm and/or this little motility. The use of antioxidants should be contribute to the treatment of male infertility in patients with loss of seminal quality. The main objective of this study was evaluating if the of antioxidants (*Spirulina platensis* and resveratrol) contributes in the seminal quality among men between 40 and 60 years old.

**Material and methods:** This is a randomized clinical study with two groups: *Spirulina platensis* (Sp) and Resveratrol(R), each of the groups has been compound by 25 men between 40 and 60 years old, wich means they were 50 in total. For

the analysis, the Sp group were made to have 4g of *Spirulina platensis* whereas the R group took 500mg of Resveratrol, in both cases the medicine was taken in capsules and during 90 days. The samples were sent to spermogram analysis, index of reactive substances to acid 2-thiobarbituric (TBARS) and Catalase (CAT), before and after the therapy. All the men have been submitted to a standard questionnaire. The analysis of semen concentration achieved significance ( $p = 0,022$ ) and morphology ( $p = 0,037$ ) using Sp. Motility ( $p = 0.027$ ) and vitality ( $p = , 017$ ) have significance with use R.

**Conclusion:** the therapy use has a stationary effect of reactive oxygen species, improving the seminal quality in men between 40 and 60 years old.

**Key words:** Antioxidants. Aging. Male infertility. Sperm quality.

### INTRODUÇÃO

A infertilidade é um problema que afeta homens e mulheres na mesma proporção. De acordo com a Associação Americana para Medicina Reprodutiva (ASMR, 2007) e a Organização Mundial de Saúde (2010), infertilidade é a falta de gestação detectada de forma clínica ou hormonalmente após 12 meses de relações sexuais normais, sem contracepção. A infertilidade masculina é causada por diferentes fatores, sendo que as causas mais comuns incluem número insuficiente de espermatozoides, e/ou pouca motilidade destes.

A tendência recente de paternidade tardia levanta preocupações por causa dos efeitos negativos do envelhecimento sobre a fertilidade. Embora se saiba que a fertilidade feminina diminui com o envelhecimento como resultado da diminuição da reserva de ovócitos e de qualidade, estudos recentes têm demonstrado os efeitos do envelhecimento no sistema reprodutor masculino. No entanto, o declínio observado relacionado à idade na fertilidade masculina continua a ser estabelecido (Desai *et al.*, 2010).

Os recentes achados da comunidade científica discutem com ênfase a relação entre o envelhecimento humano e o estresse oxidativo (Gharagozloo *et al.* 2011). Dentre as teorias que explicam o envelhecimento humano, a teoria do estresse oxidativo é hoje uma das mais aceitas cientificamente. Estes resultados podem mostrar que existe uma relação entre o processo de envelhecimento humano e sua correlação com o estado oxidativo do organismo.

De acordo com Gharagozloo e Aitken (2011), o estresse oxidativo pode afetar a fertilidade masculina. Assim, especialistas em fertilidade estão explorando ativamente o diagnóstico de estresse em espermatozoides, e avaliar o possível uso de antioxidantes para melhorar esta condição.

Um importante fator que contribui para a infertilidade é o estresse oxidativo. O desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROS) e de antioxidantes no organismo pode levar a queda no número de espermatozoides e deformidade dos mesmos. Altas concentrações de EROS podem causar patologias espermáticas, levando à peroxidação lipídica e perda da motilidade e viabilidade. Estudos demonstram que em pequenas e controladas concentrações, as EROS desempenham importante papel nos processos fisiológicos dos espermatozoides, como a capacitação, reação acrossômica e sinalização de processos para garantir a fertilização (Bansal & Bilaspuri, 2011).

O uso de antioxidantes pode contribuir para redução de estresse oxidativo nas células germinativas, melhorando sua capacidade espermática tanto na concentração quanto na motilidade, apesar de não se conhecer doses e tempo de uso destas substâncias.

Um antioxidante que vem sendo pesquisado é o resveratrol, encontrado na uva e no vinho, podendo contribuir para prevenir doenças e retardar o envelhecimento. O resveratrol, um polifenol natural, é encontrado em uvas vermelhas, amoras, mirtilos, extrato das raízes da erva daninha *Polygonum cuspidatum*, e devido sua estrutura pode estar relacionada à atividade antioxidante, já sendo descrito suas propriedades como um antioxidante e anti-inflamatório. Esta substância pode estimular a ação das sirtuínas, que são enzimas reguladoras dos mecanismos de longevidade, podendo atenuar a ação das EROS (El-Agamy, 2010).

O uso de resveratrol poderia reduzir os processos de lipoperoxidação em homens férteis e inférteis, potencialmente melhorando a qualidade espermática (Garcez *et al.*, 2010). A *Spirulina platensis* é uma cianobactéria encontrada em vários territórios, incluindo areias, pântanos, lagos, rios e mares (Khan *et al.*, 2005). Seu cultivo é realizado em tanques de água expostos ao sol para possibilitar fotossíntese. Pode ser comercializada em pó ou cápsulas, com diversos propósitos terapêuticos. Vem sendo utilizada há séculos no México e na África, e tem sido cultivada em fazendas de algas, com produção atual que ultrapassa um milhão de toneladas/ano, para o consumo humano. A produção mundial é liderada pelos Estados Unidos, seguido pela Tailândia, Índia, Japão e China. A *Spirulina* está legalmente autorizada como alimento ou complemento alimentar na Europa, Japão e Estados Unidos (Fox, 1996).

O laboratório de Bioquímica e Bioprocessos da Universidade de Passo Fundo vem estudando há alguns anos o uso terapêutico da microalga *Spirulina platensis*, a qual têm sido utilizada mundialmente na alimentação humana e animal, assim como na obtenção de aditivos utilizados em formas farmacêuticas e alimentos. Além de excelente suplemento alimentar é uma fonte potencial no tratamento de diversas doenças (Ambrosi *et al.*, 2008), podendo também contribuir para o tratamento da infertilidade masculina, melhorando a qualidade seminal em homens inférteis.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar se o uso de antioxidantes (*Spirulina platensis* e resveratrol) contribui na qualidade seminal em homens entre 40 e 60 anos de idade.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa passou pela aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo. O período de coleta de dados para avaliação, bem como o experimento, ocorreu entre janeiro de 2012 a novembro de 2012 no

Laboratório de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos do Curso de Engenharia de Alimentos da UPF e na Genesis Centro de Reprodução Humana de Passo Fundo.

Foi realizado um estudo clínico randomizado com 2 grupos: *Spirulina platensis* (Sp) e Resveratrol (R). Ambos os grupos foram compostos por 25 homens entre 40 e 60 anos de idade, totalizando 50 homens ( $n=50$ ). Para as análises o grupo Sp foi submetido à terapia oral em cápsulas de 4g de *Spirulina platensis* durante 3 meses (90 dias). O grupo R foi submetidos à terapia oral em cápsulas de 500mg de Resveratrol durante 3 meses (90 dias).

As amostras de ambos os grupos foram submetidas às análises de Espermograma completo, Índice de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) – Análise do Estresse Oxidativo e Catalase (CAT). Após três meses de terapia com *Spirulina platensis* (4g) e resveratrol (500mg), as análises foram efetuadas novamente, comparando os resultados entre as análises antes e depois da terapia.

Ambos os grupos, Sp e R, foram submetidos a um questionário padrão antes da terapia, com os questionamentos sobre idade, etnia, peso, fumante, prática e intensidade de exercícios físicos, consumo e frequência de bebidas alcoólicas, número de filhos, se já realizou fertilização *in vitro* e, ainda, se estava adquirindo medicamento controlado.

A Tabela 1 apresenta os parâmetros seminais de acordo com a Organização Mundial da Saúde (2010), que foram avaliados nesta pesquisa.

**Table 1.** Parâmetros seminais de acordo com a Organização Mundial da Saúde

PARÂMETROS SEMINAIS	OMS 2010
Volume (mL)	≥ 1,5
Concentração (M/mL)	≥ 15
Concentração total (M)	≥ 39
Motilidade total (%)	≥ 40
Motilidade A + B (%)	≥ 32
Vitalidade (%)	≥ 58
Morfologia (%)	≥ 4

Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2010.

Para seleção dos pacientes, foram incluídos no estudo homens entre 40 e 60 anos de idade que apresentavam sub-infertilidade, caracterizada por espermograma anormal e homens com espermograma normal de acordo com a Organização Mundial de Saúde, 2010 (WHO, 2010).

A análise seminal – espermograma – também foi realizada de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010). Para tal, as amostras seminais foram coletadas por masturbação em uma sala equipada do laboratório da Clínica Genesis de Passo Fundo. Esse método teve a vantagem de ter sob controle as condições de meio ambiente, e também a maneira como a amostra foi coletada, e se ocorreu ou não perda do material biológico durante a coleta. Além disso, pode-se saber o lapso de tempo entre a ejaculação e a investigação, e, ainda, observações como, por exemplo, a presença de coagulação e a ocorrência de liquefação. O período de abstinência sexual foi de três a cinco dias para todos os pacientes. Para análise da liquefação, após alguns minutos da ejaculação, o material coletado à temperatura ambiente, começa a liquefazer, ficando mais fino. Este processo de liquefação foi analisado dentro de 30 minutos, ou seja, em 30 minutos a amostra deveria estar totalmente liquefeita. Após a liquefação, a viscosidade da amostra foi estimada aspirando, suavemente, com auxílio de uma pipeta, permitindo que o sêmen caísse por gravidade, e observado o comprimento

do fio formado, que deveria ter até 2 cm de comprimento. A medida do volume foi realizado com auxílio de uma pipeta descartável. Após misturar bem a amostra seminal, espalhou-se uma gota de sêmen uniformemente sobre a fita de pH. Passados alguns segundos, foi realizada a comparação da cor com a tira de calibração para determinar o pH seminal. A análise da concentração e motilidade dos espermatozoides foram realizadas com auxílio de um microscópio óptico, com objetiva de 20x e uma magnificação de 200x. Para tal, foi homogeneizado a amostra de sêmen, retirando-se uma alíquota de 5µL de sêmen. Esta amostra foi colocada na câmara de Makler, e então acrescentou-se a lamínula redonda, que permite a obtenção de uma espessura constante do esperma de 10mm. Levou-se o material ao microscópio com objetiva de 20x. Foi realizada a contagem de 5 quadrados da câmara e a seguir, adicionou-se seis zeros ao número de espermatozoides contados nos 5 quadrados do campo. Para análise da motilidade, foi realizado imediatamente após contagem de espermatozoides (concentração). Foi examinado no microscópio óptico em contraste de fase de 200 a 400 vezes de ampliação. Foram escolhidos campos aleatórios da lâmina. Com auxílio de um contador celular, foi realizada a contagem espermática avaliando a motilidade, expressa em porcentagem de espermatozoides móveis. Estes foram classificados em: grau A (motilidade progressiva rápida), grau B (motilidade progressiva lenta), grau C (motilidade não-progressiva) e grau D (imobilidade). Para determinação da vitalidade foi utilizado o teste da eosina Y. Foi preparado NaCl 0,9% (dissolvendo 0,9g de NaCl em 100ml de água purificada); eosina Y 0,5%, dissolvida em 0,5g de eosina Y em 100ml de 0,9% NaCl. Para a análise, a amostra de sêmen foi homogeneizada; retirou-se uma alíquota de 5 µL de sêmen e 5 µL de solução de eosina, e foram colocados em lâmina e misturados com auxílio da ponteira. Deixou-se por 30 segundos em repouso, e em seguida analisou-se o material em microscópio óptico com contraste de fase de 200 a 400 vezes as cabeças dos espermatozoides. Foi realizada a contagem do número de espermatozoides corados (mortos) e não corados (vital) com auxílio do contador de células. Foram avaliados 200 espermatozoides, a fim de alcançar uma forma aceitável de baixa porcentagem de erro. Após, foi realizado o cálculo da média de espermatozoides vivos e mortos. O resultado final foi expresso em porcentagem. Para realização da morfologia espermática foi retirado uma pequena quantidade desse material seminal sob a forma de uma pequena gota de esperma. O material foi colocado na extremidade de uma lâmina histológica limpa. A seguir, foi feita uma distensão de forma semelhante à executada para estudo citológico do sangue, em película fina. Esperou-se secar o material durante dois a cinco minutos. A fixação do material foi realizada com kit de coloração de Leishman. Deixou-se o corante agir aproximadamente 15 minutos. A seguir o excesso do corante foi retirado com algumas gotas de álcool metílico em uma lavagem rápida, e depois, com muito cuidado lavou-se delicadamente a lâmina em água corrente. Após secagem foi efetuada a análise em microscópio na objetiva de imersão com óleo antidissipador de fluorescência de alta qualidade (1000x). Foram realizadas as análises bioquímicas do índice de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) e a Catalase (CAT).

Para determinação do TBARS, foi utilizada a técnica de Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Ohkawa *et al.*, 1979). Para tal, foi preparado os reagentes Lauril sulfato de sódio, ácido acético 20% pH 3,5 e TBA 0,8% (Ácido Tiobarbitúrico). Foi pipetado em um tubo falcon 200 µL de sêmen, 25 µL de Lauril sulfato de sódio, 750 µL de ácido acético 20% pH 3,5, 350 µL de água e por último o reagente TBA 0,8% . Após encubado em banho fervente (95°C)

por 60 minutos. Após, centrifugado (QUIMIS®) a 10.000 rpm por 10 minutos. Em seguida retirado 500 µL do sobrenadante e colocado em uma cubeta de quartzo para efetuar a leitura no espectrofotômetro em 535nm. Após o ensaio determinou-se a proteína de cada uma das amostras pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1971). Realizou-se o cálculo final para obtenção do resultado.

A atividade da Catalase (CAT) é diretamente proporcional a taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, e obedece a uma cinética de pseudo primeira ordem. Desta forma, a atividade da enzima Catalase pode ser medida através da avaliação do consumo de peróxido de hidrogênio. Este teste consiste em avaliar a diminuição da absorbância no comprimento de onda, onde há a maior absorção pelo peróxido de hidrogênio, utilizando-se cubetas de quartzo devido à alta energia do comprimento de onda no qual foram realizadas as medidas (Nelson & Kiesov, 1972).

A CAT degrada o peróxido de hidrogênio, que diminui a absorção e com o tempo pode ser medido em 240 nm. A diferença de extinção por unidade de tempo é uma medida de atividade da CAT. A atividade de CAT foi calculada a partir da variação de absorbância e expressa em U/mg (Ohkawa *et al.*, 1979). O princípio da técnica se dá pela queda da absorbância do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A<sub>240</sub>) pela metabolização deste pela catalase. Foi preparado tampão de fosfato de sódio 20mM pH 7,4, homogeneizado e centrifugado por 10 minutos. Os materiais utilizados para a técnica foram tampão para catalase (fosfato 50mM), solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3M, (peróxido de hidrogênio), cubetas de quartzo de 3 mL e material biológico (sêmen). Foi colocado 2 mL de tampão, acrescentado 20µL da amostra e homogeneizado. Zerou-se o espectrofotômetro e acrescentou-se 50µL da solução peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,3M na cubeta, 20 µL de amostra seminal, e imediatamente pressionado o botão "iniciar leitura". A duração do ensaio foi de 60 segundos. Após o ensaio determinou-se a proteína de cada uma das amostras pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1971). Realizou-se o cálculo final para obtenção do resultado.

Para a estruturação do banco de dados foi utilizado o aplicativo Epi Info™ 3.5.1 e para as análises os programas estatísticos SPSS 18 e R 2.10.0 for Windows. Para a análise dos dados foram utilizados os seguintes testes: a) para a comparação de uma variável quantitativa com outra categórica foi utilizado o Teste Qui-quadrado; b) para a comparação de duas variáveis quantitativas foi utilizado o Teste *t* de Student. O nível de significância utilizado nos testes para rejeitar H<sub>0</sub>, quando a hipótese nula for verdadeira, foi de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Todos os pacientes que participaram desta pesquisa realizaram a terapia de acordo com o que foi estabelecido no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assim como finalizaram no tempo proposto (90 dias) a administração da *Spirulina platensis* e resveratrol, e realizaram as coletas antes e após a terapia.

Após análise dos dados do grupo submetido a terapia com *Spirulina platensis*, constatou-se que os parâmetros de análise seminal – espermograma – que tiveram melhora nos resultados foram: concentração ( $p=0,022$ ) e morfologia espermática ( $p=0,037$ ), demonstrando haver relação positiva depois da terapia oral com *Spirulina platensis*, conforme apresentado na Tabela 2.

Observa-se na Figura 1 que a vitalidade das amostras submetidas a esta terapia (*Spirulina platensis*), obtiveram melhora de 3,33%.

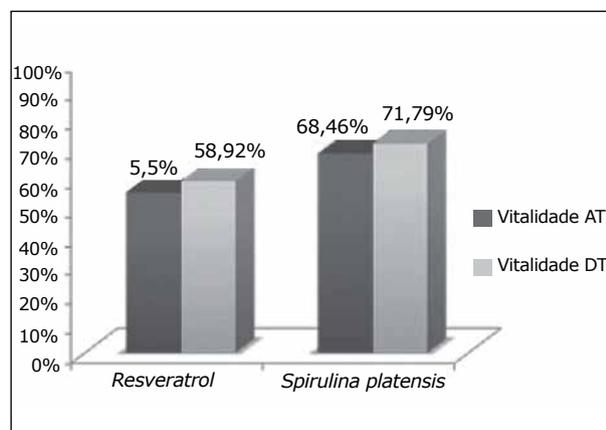
A motilidade aumentou quando comparado antes e depois da terapia, conforme Tabela 2. A concentração espermática (milhões/mL) também aumentou significativamente após uso de resveratrol, cerca de 23,33%.

**Table 2.** Análise seminal grupo *Spirulina platensis*

Variável	Experimento	Média e desvio padrão	Teste t
Volume (ml)	AT	2,72±1,16	0,255
	DT	2,96±1,40	
Concentração (milhões/ml)	AT	29,44±24,09	0,022*
	DT	39,32±27,68	
Concentração Total (milhões/ml)	AT	109,96±70,25	0,079
	DT	88,60±69,43	
Motilidade (%)	AT	63,83±39,65	0,839
	DT	65,42±34,49	
Grau A (%)	AT	7,79±17,26	0,721
	DT	8,08±16,24	
Grau B (%)	AT	36,17±30,80	0,692
	DT	39,12±29,72	
Grau C (%)	AT	19,62±20,43	0,678
	DT	18,37±17,27	
Grau D (%)	AT	19,62±28,04	0,760
	DT	21,92±25,09	
Vitalidade (%)	AT	68,46±31,12	0,129
	DT	71,79±30,59	
Morfologia (%)	AT	3,33±2,06	0,037*
	DT	4,21±3,02	
pH	AT	7,16±0,20	0,212
	DT	7,13±0,21	

\* Significativo  $p < 0,05$ 

Variável	Antes	Depois	p-value
Volume de sêmen (ml)	2,7±1,16	3±1,4	0,255
Concentração de espermatozoides (milhões/ml)	29,4±24,1	39,3±27,7	0,022*
Concentração Total (milhões/ml)	88,6±69,4	110±70,2	0,079
Motilidade (%)	63,8±39,6	65,4±34,5	0,839
Grau A (%)	7,8±17,3	8,1±16,2	0,721
Grau B (%)	36,2±30,8	39,1±29,7	0,692
Grau C (%)	19,6±20,4	18,4±17,3	0,678
Grau D (%)	19,6±28,0	21,9±25,1	0,760
Vitalidade (%)	68,5±31,1	71,8±30,6	0,129
Morfologia (%)	3,3±2,1	4,2±3,0	0,037*
pH	7,2±0,2	7,1±0,2	0,212

\* Significativo  $p < 0,05$ **Figure 1.** Vitalidade antes e depois do tratamento com Resveratrol e *Spirulina platensis*.

Analisando a morfologia espermática antes e após a terapia com *Spirulina platensis*, houve melhora de 0,88%.

No grupo Resveratrol, assim como no grupo da *Spirulina platensis*, apresentaram resultados significativos na motilidade ( $p=0,027$ ), após o terapia oral de 500mg de Resveratrol (Tabela 3). Ou seja, a motilidade espermática aumentou 7,80% depois da terapia. Já a concentração espermática aumentou 24,35%, e a morfologia teve uma melhora de 0,24%. A vitalidade espermática aumentou 3,92% após esta terapia.

Não foi possível a aplicação de teste estatístico dos parâmetros cor e aparência, viscosidade e liquefação em ambos os grupos, por se tratar de uma constante, não existindo diferença antes e depois da terapia, conforme Tabela 4.

Tanto o grupo Resveratrol quanto o grupo *Spirulina platensis*, a vitalidade, a concentração e a concentração total foram significativas ( $p < 0,05$ ), porém o

**Table 3.** A análise seminal do grupo Resveratrol. A tabela mostra as variáveis realizadas no espermograma completo.

Variável	Antes	Depois	p-value
Volume de sêmen (ml)	3,0±1	2,9±1	0,505
Concentração de espermatozoides (milhões/ml)	32,7±32,3	40,7±37	0,229
Concentração Total (milhões/ml)	91,9±98,6	129±140,4	0,109
Motilidade (%)	59,3±43,1	67,1±39,5	0,158
Grau A (%)	7,3±24,9	9,72±26,6	0,099
Grau B (%)	30,1±33,8	40,9±35,5	0,027*
Grau C (%)	24,2±28,2	19,4±24,5	0,199
Grau D (%)	19,9±32,6	9,7±19,3	0,057
Vitalidade (%)	55±33,6	58,9±34,1	0,017*
Morfologia (%)	3,4±2,7	3,7±2,7	0,110
pH	7,2±0,2	7,0±0,5	0,096

\* Significativo  $p < 0,05$

grupo Resveratrol apresentou melhor desempenho nas análises. Ainda, a terapia com Resveratrol mostrou-se mais eficiente do que a *Spirulina platensis* no quesito motilidade, sendo um aumento de apenas 1,59% no grupo *Spirulina platensis*, e 7,80% no grupo Resveratrol. Por outro lado, analisando morfológicamente os espermatozoides, o grupo *Spirulina platensis* apresentou maior destaque (0,88% versus 0,24%).

**Table 4.** Impossibilidade de análise estatística das variáveis.

Parâmetro		Normal	Aumentada	Qui-quadrado
Viscosidade	AT	23 (92%)	2 (8%)	0,920
	DT	24 (96%)	1 (4%)	
Cor e aparência	AT	25 (100%)	0 (0%)	*
	DT	25 (100%)	0 (0%)	
Liquefação	AT	25 (100%)	0 (0%)	*
	DT	25 (100%)	0 (0%)	

\* Constante

Aplicando análise estatística Qui-quadrado no questionário padrão, constatou-se que a motilidade espermática foi menor no grupo de fumantes do que aqueles não fumantes ( $p=0,044$ ). Os homens que praticam atividade física apresentaram melhor motilidade seminal (espermatozoides grau A e B) do que aqueles que não praticam nenhuma atividade física,  $p=0,035$ , e a

**Table 5.** Variáveis questionário padrão através da análise estatística Qui-quadrado.

Dados pessoais	Dados coletados	p-value
Fumantes	Motilidade espermática	0,044*
Praticantes de atividades físicas	Motilidade seminal	0,035*
Fumantes	Vitalidade espermática	0,105
Consumo de bebidas alcoólicas	Qualidade seminal	0,308
Fumantes	Morfologia	0,042*

\* Significativo  $p < 0,05$

concentração espermática é 6,27% maior que os não praticantes.

Por outro lado, a atividade física não influencia na vitalidade espermática. Assim como a vitalidade não obteve significância entre os fumantes e os não fumantes ( $p=0,105$ ). Não foi constatado nenhuma relação entre consumo de bebidas alcoólicas e a qualidade seminal ( $p=0,308$ ). O uso de medicamentos controlados não influenciou na qualidade seminal.

Após as análises de TBARS, constatou-se que em ambos os grupos, Resveratrol e *Spirulina platensis*, não obteve-se resultado significativo após a terapia. Na análise de Catalase também não obteve-se resultado significativo após a terapia de ambos os grupos, Tabelas 6 e 7, respectivamente.

**Table 6.** Análise de TBARS pela aplicação do Teste t de Student.

Terapia	Média e desvio-padrão	p-value
Resveratrol TBARS AT	1,284±0,64	0,985
Resveratrol TBARS DT	1,288±0,85	
Spirulina TBARS AT	1,390±0,62	0,114
Spirulina TBARS DT	1,151±0,46	

**Table 7.** Análise de TBARS pela aplicação do Teste t de Student.

Terapia	Média e desvio-padrão	p-value
Resveratrol CAT AT	23,56±9,21	0,490
Resveratrol CAT DT	25,94±19,49	
Spirulina CAT AT	22,25±15,82	0,278
Spirulina CAT DT	18,49±11,75	

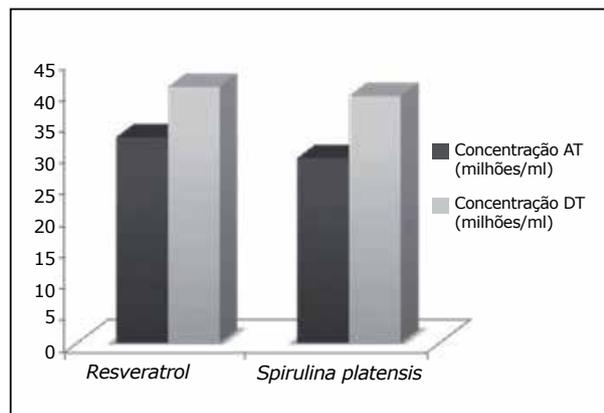
## DISCUSSÃO

O espermograma inclui uma análise seminal completa, incluindo a estimativa quantitativa (percentual de espermatozoides móveis) e qualitativa (velocidade de progressão e motilidade). Também são realizados procedimentos de coloração vital para determinar a vitalidade, a concentração e a morfologia espermática (MENKEVLD; KRUGER, 1997; DESAI, et al., 2010).

Os fatores ambientais, fisiológicos e genéticos têm sido implicado nas funções do espermatozoide e na infertilidade. Um dos fatores mais importantes que contribuem para espermatozoides de má qualidade é o estresse oxidativo. Entre as várias causas, o estresse oxidativo afeta a fertilidade e a fisiologia das células espermáticas (BANSAL; BILASPURI, 2011).

Não foram encontrados estudos referente ao uso de *Spirulina platensis* e resveratrol na avaliação da qualidade espermática quando estes administrados via oral, somente quando adicionados ao processo de congelamento espermático, agindo como antioxidantes.

Neste estudo, aqueles pacientes submetidos à terapia com *Spirulina platensis* e resveratrol, quando analisado o parâmetro de vitalidade constatou-se melhora após a terapia. A vitalidade refletiu na proporção de espermatozoides vivos. O princípio desta técnica baseia-se na perda da integridade da membrana plasmática, que está ligada também ao dano do DNA



**Figure 2.** Concentração antes e depois do tratamento com Resveratrol e *Spirulina platensis*.

espermático e morte celular. A partir deste dado, podemos concluir que o uso destes antioxidantes auxiliam na proteção da membrana plasmática, impedindo a morte celular, e consequentemente aumentando a porcentagem de espermatozóides vivos nos homens submetidos a estas terapias, ou seja, aumentando a viabilidade espermática (CAPUCHO *et al.*, 2012).

Após uso de *Spirulina platensis* e resveratrol, a concentração espermática (milhões/mL) também aumentou nas amostras. Ao contrário do que mostrou o estudo de Garcez *et al.* (2010), quando aplicou resveratrol em congelamento de espermatozóides e notaram que após descongelamento a concentração e motilidade espermática permaneceram iguais. Já outro estudo mostrou que a adição do resveratrol no congelamento espermático apresentou melhora da motilidade e viabilidade espermática (MEAMAR *et al.*, 2012). Isto significa que, em nosso estudo, a terapia oral com antioxidantes contribuiu para a melhora da qualidade seminal, principalmente nos parâmetros concentração e motilidade espermática. Esses parâmetros são importantes para àqueles casais que desejam ter filhos naturalmente, sem necessidade de recorrer ao tratamento de fertilização *in vitro*, uma vez que a concentração e motilidade espermática permitem a fertilização natural do oócito.

A morfologia obteve uma melhora significativa naqueles pacientes submetidos à *Spirulina platensis*, e com o resveratrol, houve aumento da porcentagem após a terapia (0,24%). Pode-se dizer que os efeitos danosos do estresse oxidativo em espermatozóides estão entre 30% a 80% dos casos de infertilidade masculina (ESTEVES; AGARWAL, 2011). Os espermatozóides são protegidos por vários antioxidantes e enzimas antioxidantes no plasma seminal. Estes antioxidantes são agentes responsáveis pela quebra da reação oxidativa, reduzindo, assim, o estresse oxidativo.

A partir disso, o uso destas terapias contribuíram para a melhora da concentração, motilidade e morfologia dos espermatozóides, sendo útil no tratamento da infertilidade masculina (BANSAL; BILASPURI, 2011). Em ambos os grupos (Resveratrol e *Spirulina platensis*), obteve-se resultados positivos após a terapia oral, ou seja, alguns parâmetros houve melhora e outros permaneceram estáveis aos resultados, mostrando que estes antioxidantes podem ser importantes no tratamento da infertilidade masculina através da estagnação dos parâmetros ou melhora destes. Um dado importante a citar, é o fato da inexistência de estudos comparando a *Spirulina platensis* com

a qualidade seminal, principalmente no parâmetro concentração espermática. E, neste estudo, mostramos a melhora deste parâmetro seminal. Assim como, quando utilizado resveratrol, houve melhora na motilidade espermática.

Apesar de não ter sido encontrado estudos referente a motilidade espermática e o uso de cigarro, nesta pesquisa constatou-se que a motilidade foi menor no grupo de fumantes do que no grupo de não fumantes ( $p=0,044$ ). Acredita-se que, o cigarro por ser um dos contribuintes da formação de espécies reativas de oxigênio, tem a influência de danificar os parâmetros seminais. Ainda, os homens que praticam atividade física apresentaram melhor motilidade seminal (espermatozóides grau A e B) do que aqueles que não praticam nenhuma atividade física,  $p=0,035$ . Os espermatozóides grau A e B são aqueles capazes de fertilizar o óvulo naturalmente. Portanto, a prática de atividade física também pode contribuir para a qualidade seminal, já que o nível de estresse oxidativo e geração de espécies reativas de oxigênio também diminui, contribuindo assim para a fertilidade masculina (CAPUCHO *et al.*, 2012).

## CONCLUSÕES

O uso do Resveratrol e da *Spirulina platensis* estão associados com muitos benefícios à saúde, principalmente a inativação de doenças, por serem fontes ricas de antioxidantes e facilmente incorporados na membrana lipídica, inibindo a formação de radicais lipídicos e mantendo a integridade da membrana e o equilíbrio iônico da célula.

Nesta pesquisa teve-se a perspectiva que estas duas terapias fossem capaz de agir como antioxidantes, melhorando a qualidade seminal em humanos após sua administração oral. Mostramos resultados positivos apenas de que a ingestão oral de resveratrol e *Spirulina platensis* também podem contribuir no tratamento da infertilidade masculina, já que após a terapia de 90 dias houve melhora dos parâmetros seminais concentração e motilidade, que são considerados cruciais para a fertilização natural do óvulo. Não constatamos ação destas substância sob o estresse oxidativo, onde não foram apontados resultados significativos da relação com TBARS e CAT associados. Devido à falta de artigos científicos que relacionam a análise de TBARS e CAT com o uso de resveratrol e *Spirulina platensis*, acredita-se na necessidade de mais pesquisas envolvendo estas terapias como ação antioxidante nas células germinativas masculinas.

A causa mais comum da infertilidade masculina é a pouca concentração ou a motilidade espermática, ou seja, presença apenas de espermatozóides grau C e grau D, que são incapazes de fertilizar os óvulos naturalmente. Nesta pesquisa conseguimos obter melhora destes parâmetros em homens entre 40 e 60 anos de idade, mostrando relação positiva deste tipo de terapia quando relacionado a estas duas causas mais comuns da infertilidade masculina.

Portanto, com este estudo mostramos que a suplementação oral destas substâncias também podem melhorar a qualidade seminal em humanos quando realizadas análises em amostras frescas, sendo tratamentos promissores para estudos futuros em homens inférteis.

## Correspondência:

Franciele Bona Verzeletti

Avenida Visconde de Guarapuava, 1131 – Apt. 04  
CEP 80045-200 - Alto da XV  
Curitiba – (PR), Brasil

e-mail: fra.verzeletti@gmail.com

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A. Role of oxidative stress in male infertility and antioxidant supplementation. *Business Briefing; Urology and Urological Disease*, 2005; 7; 122-129.
- AMBROSI, M. A. et al. Propriedades de saúde de Spirulina spp. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*; 2008; 29; 2.
- AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Super-ICSI: Nova pesquisa confirma bons resultados; 2007; 88.
- BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. Impacts of Oxidative stress an antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*; 2011; 7; 1-7.
- CAPUCHO, C. et al. Green propolis effects on sperm count and epididymis morphology and oxidative stress. *Food Chem Toxicol.*; 2012; 50; 11; 3956 - 3962.
- DESAI, N.; SABANEKH, E. J.; KIM, T.; AGARWAL, A. Free radical theory of aging: implications in male fertility. *Urology*; 2010; 75; 1; 9-14.
- EL-AGAMY, D.S. Comparative effects of curcumin and resveratrol on aXatoxin B1-induced liver injury in rats. *Arch Toxicol*; 2010; 84; 5; 389-396.
- FOX, R.D.; Spirulina production and potencial. France: Edisud, 232p., 1996.
- GARCEZ, M.E. et al. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. *Fertility and Sterility*, v. 94, n. 6, p. 2118-2121, mar. 2010.
- GHARAGOZLOO, P.; AITKEN, J.R. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Human Reproduction*, v. 26, n.7, p. 1628-1640, mai. 2011.
- KHAN, Z.; BHADOURIA, P.; BISEN, P.S.; Nutritional and therapeutic potential of Spirulina. *Curr Pharm Biotechnol*, v.5, n. 6, p. 373-379, out. 2005.
- LOWRY O.H. et al. *Journal Biol. Chem.*; 1951; 193; 265-275.
- MEAMAR, M. et al. Sperm DNA fragmentation induced by cryopreservation: new insights and effect of a natural extract from *Opuntia ficus-indica*. *Fertility & Sterility*, 2012; 98, 2; 326-333
- MENKEVLD, R.; KRUGER, T. Análise Seminal Básica. In: BADALOTTI, Mariangela; TELÖKEN, Claudio; PETRACCO, Alvaro (Org.). *Fertilidade e Infertilidade Humana*. Porto Alegre: Medsi.,1997; 417-423.
- NELSON, D.P.; KIESOV, L.A. *Analytical Biochemistry*; 1972; 49;174-178.
- OHKAWA, H. et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 1979; 95; 351-358.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory manual for examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 5th ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, mai., 2010.
- Glossário revisado da Terminologia das Técnicas de Reprodução Assistida (TRA), 2009†, Comitê Internacional para Monitorização da Tecnologia Reprodutiva Assistida (ICMART) e Organização Mundial da Saúde (OMS).
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S. Glossário revisado da Terminologia das Técnicas de Reprodução Assistida (TRA), 2009†, Comitê Internacional para Monitorização da Tecnologia Reprodutiva Assistida (ICMART) e Organização Mundial da Saúde (OMS). *Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida*, 2010; 14:14-8.