

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA E FISIOTERAPIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENVELHECIMENTO HUMANO

**Avaliação da qualidade seminal em adultos após uso de Spirulina  
platensis e resveratrol**

Franciele Bona Verzeletti

Passo Fundo  
2012

Franciele Bona Verzeletti

Avaliação da qualidade seminal em adultos após uso de Spirulina platensis e resveratrol

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano da Faculdade de Educação Física e Fisioterapia da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Envelhecimento Humano.

Orientador:

Profa. Dra. Telma Elita Bertolin

Coorientador:

Prof. Dr. Fernando Fornari

Passo Fundo  
2012

CIP – Catalogação na Publicação

---

V574a Verzeletti, Franciele Bona

Avaliação da qualidade seminal em adultos após uso de spirulina platensis e resveratrol / Franciele Bona Verzeletti. – 2012.

90 f. : il. ; 30 cm.

Orientação: Profa. Dra. Telma Elita Bertolin.

Coorientação: Prof. Dr. Fernando Fornari.

Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) – Universidade de Passo Fundo, 2012.

1. Envelhecimento. 2. Antioxidantes. 3. Infecundidade masculina. I. Bertolin, Telma Elita, orientadora. II. Fornari, Fernando, coorientador. III. Título.

CDU: 613.98

---

Catalogação: Bibliotecária Ângela Saadi Machado - CRB 10/1857

# ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO



ATA DE DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado DA ALUNA

**FRANCIELE BONA VERZELETTI**

Aos vinte dias do mês de dezembro do ano dois mil e doze às nove horas, realizou-se, na Faculdade de Educação Física e Fisioterapia da Universidade de Passo Fundo, a sessão pública de defesa da Dissertação: “Avaliação da qualidade seminal em adultos após o uso de *Spirulina platensis* e *resveratrol*”, apresentada pela mestranda Franciele Bona Verzeletti, que concluiu os créditos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Envelhecimento Humano. Segundo os encaminhamentos do Conselho de Pós-Graduação (CPG) do Mestrado em Envelhecimento Humano e dos registros existentes nos arquivos da Secretaria do Programa, a aluna preencheu todos os requisitos necessários para a defesa. A banca foi composta pelos professores doutores Telma Elita Bertolin - orientadora e presidente da banca examinadora (UPF), Helenice de Moura Scortegagna, Luciane Maria Colla e Adriano Pasqualotti. Após a apresentação e a arguição da dissertação, a banca examinadora considerou a candidata **APROVADA**, em conformidade com o disposto na Resolução Consun Nº 07/2010.

A banca recomenda a consideração dos pareceres, a realização dos ajustes sugeridos e a divulgação do trabalho em eventos científicos e em publicações.

Encerrados os trabalhos de defesa e proclamados os resultados, eu, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Telma Elita Bertolin, presidente, dou por encerrada a sessão pela banca.

Passo Fundo, 20 de dezembro de 2012.

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Telma Elita Bertolin  
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Helenice de Moura Scortegagna  
Universidade de Passo Fundo – UPF

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciane Maria Colla  
Universidade de Passo Fundo – UPF

Prof. Dr. Adriano Pasqualotti  
Universidade de Passo Fundo – UPF

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais que sempre estiveram presentes em todos os momentos da minha vida. Sou grata pela maior riqueza que vocês poderiam me dar: minha educação e formação. E ao meu noivo, Rodrigo Sell Poletto, que sempre esteve do meu lado me apoiando, me acompanhando e acreditando nos meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por abençoar tanto minha vida, por me dar esta oportunidade, por estar do meu lado em todos os momentos.

À minha orientadora Profa. Dra. Telma Elita Bertolin, pela confiança em mim depositada. Por me incentivar e querer sempre o melhor para mim. Pelos congressos que juntas apresentamos trabalhos. Agradeço a oportunidade, o apoio, o incentivo e a amizade.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Fernando Fornari, que me auxiliou principalmente no primeiro momento quando ainda não fazia ideia do número de amostras para a concretização desta pesquisa científica. Pelas correções e auxílio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Alcides Tarasconi, que colaborou com apoio de materiais e laboratório da Clínica Genesis para realização dos meus experimentos. Obrigada pela confiança depositada em mim, e pela oportunidade, de mais uma vez, fazer parte desta equipe maravilhosa.

Ao meu pai, um homem incrível, batalhador. Cheio de ideias e que me passou uma energia positiva em todos os momentos para a concretização de mais este sonho em minha vida. Graças a você pai, eu sempre quis fazer a diferença e hoje concluo mais uma etapa vencida. Obrigada por fazer parte da minha vida e de todos os meus sonhos, auxiliando a se tornar realidade, sempre. E a minha mãe, mulher batalhadora, minha melhor amiga, que esteve ao meu lado todos os dias, me dando apoio, sempre preocupada, me dando colo quando precisei, e depositou a confiança nos meus sonhos e no meu trajeto. Graças a você quero seguir a carreira de docente, quero ensinar, quero passar adiante tudo o que sei e quero aprender todos os dias com a vida. Sem vocês nada disso estaria acontecendo. Agradeço de coração o auxílio em conseguir pacientes para que esta pesquisa se tornasse realidade, e quanta dedicação para isto. Vocês simplesmente são os melhores, são os anjos da minha vida. Obrigada por tudo.

Ao meu noivo, Rodrigo Sell Poletto, que sempre acreditou e me incentivou a seguir em frente.

Ao Ewerton Soldatelli pelo encapsulamento do resveratrol e *Spirulina platensis*.

A Gisele Barbieri, Marina Zanco Pezzini e Marina Migliavacca pelo auxílio nas análises de estresse oxidativo.

## RESUMO

Verzeletti, Franciele Bona. Avaliação da qualidade seminal em adultos após uso de spirulina platensis e resveratrol. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2012.

A infertilidade masculina é causada por diferentes fatores. As causas mais comuns incluem número insuficiente de espermatozóides, 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. 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 4 g de *Spirulina platensis* em cápsulas e o grupo R foi submetidos à terapia com 500 mg de Resveratrol em cápsulas, ambos durante 90 dias. As amostras foram submetidas à análise de espermograma, 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. Concluiu-se que, a terapia de 90 dias com *Spirulina platensis* ou resveratrol tem um efeito significativo na melhora da qualidade seminal em homens entre 40 e 60 anos de idade.

Palavras-chave: 1. Antioxidantes. 2. Envelhecimento. 3. Infertilidade masculina. 4. Qualidade seminal.

## ABSTRACT

Verzeletti, Franciele Bona. Avaliação da qualidade seminal em adultos após uso de spirulina platensis e resveratrol. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2012.

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. 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 4 g of *Spirulina platensis* whereas the R group took 500 mg of Resveratrol, in both cases the medicine was taken in capsules and during 90 days. The sample was sent to spermogram analysis, 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 ( $p = 0,017$ ) have significance with use R. It has been concluded that the therapy use has improving the seminal quality in men between 40 and 60 years old.

Key words: 1. Antioxidants. 2. Ageing. 3. Male infertility. 4. Sperm quality.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Motilidade antes e depois do tratamento com Resveratrol e *Spirulina platensis*. ..... 26
- Figura 2 - Concentração antes e depois do tratamento com Resveratrol e *Spirulina platensis*. ..... 26

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros seminais de acordo com a Organização Mundial da Saúde .....	22
Tabela 2 - Análise seminal dos grupos <i>Spirulina platensis</i> e resveratrol. A tabela mostra as variáveis realizadas na análise seminal completa.....	25
Tabela 3 - Variáveis questionário padrão através da análise estatística Qui-quadrado...	29

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASMR	Associação Americana para Medicina Reprodutiva
AT	Antes do Tratamento
DT	Depois do Tratamento
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
H2O2	Peróxido de Hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
OMS	Organização Mundial da Saúde
R	Resveratrol
Sp	Spirulina platensis
SPSS	Statistical Package Social Sciences

## LISTA DE SÍMBOLOS

Cm	Centímetro
G	Gramas
mg	Miligramas
M/ML	Milhões por mililitros
μL	Microlitro
ML	Mililitros
MM	Milímetros

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA I</b>	<b>19</b>
	<b>AVALIAÇÃO DA QUALIDADE SEMINAL EM ADULTOS APÓS O USO DE SPIRULINA PLATENSIS E RESVERATROL</b>	<b>19</b>
2.1	<i>Introdução</i>	19
2.2	<i>Materiais e métodos</i>	21
2.3	<i>Resultados</i>	24
2.4	<i>Discussão</i>	27
2.5	<i>Conclusões</i>	30
2.6	<i>Referências</i>	31
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>33</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>34</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>38</b>
Anexo A.	<i>Parecer Comitê de Ética</i>	39
Anexo B.	<i>Comprovante de submissão</i>	41
Anexo C.	<i>Normas da Revista científica</i>	43
	<b>APÊNDICES</b>	<b>48</b>
Apêndice A.	<i>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</i>	49
Apêndice B.	<i>Projeto de Pesquisa</i>	52
Apêndice C.	<i>Questionário aplicado antes da coleta biológica</i>	86

## 1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um fenômeno que tem sido discutido na última década, sobretudo por seu significativo crescimento populacional. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), entre 1950 e 2025, a população brasileira de idosos crescerá 16 vezes, enquanto a população geral sofrerá aumento de cinco vezes (WHO, 2005). As previsões do IBGE são de que no ano de 2020 teremos mais de 30 milhões de idosos na nossa população, o que representará por volta de 13% do total de brasileiros (LARA; SOARES, 2009). Estima-se que o número de pessoas com 60 anos ou mais irá crescer rapidamente nos próximos 50 anos em todo o mundo (WHO, 2005).

Pesquisadores de diferentes áreas têm mostrado interesse em estudar essa fase da vida (ALMEIDA; LOURENÇO, 2007). Por outro lado, houve uma queda significativa na taxa de fecundidade, e a medicina está se desenvolvendo a respeito ao processo de cura e à prevenção de doenças, a economia crescendo e a alimentação se aprimorando. Estes fatores contribuem para que o número de pessoas idosas no país cresça, aumentando a expectativa de vida do brasileiro.

À medida que envelhecemos, torna-se cada vez mais difícil de serem realizadas algumas tarefas do dia a dia (MARQUES et al., 2010). A sexualidade, um tema difícil entre os jovens, se agrava no caso dos idosos. Nesta fase, isso acaba dificultando a superação de seus problemas. Acredita-se que através do esclarecimento das informações distorcidas em relação à sexualidade poderá contribuir para diminuição de crenças sobre um assunto com muitos preconceitos, já que muitas vezes a sociedade classifica este período da vida como de assexualidade (RISMAN, 2005). A partir das últimas décadas, o Brasil se depara com um declínio rápido e acentuado na taxa de fecundidade, se sobressaindo quando comparado com outros países desenvolvidos ou em desenvolvimento. Em todos estes países ocorreu diminuição da fecundidade e houve também queda da mortalidade, levando ao processo de envelhecimento populacional e

---

aumento da longevidade (ALVES et al., 2007).

O envelhecimento bem-sucedido passa a ser resultado da interação de fatores multidimensionais, que incluem questões relacionadas à saúde, tanto física quanto mental, independência na vida diária, aqui podem entrar os aspectos relacionados também a sexualidade, aspectos econômicos e psicossociais. Nesse contexto, é preciso procurar por melhores estratégias de planejamento e avaliação de ações, com vistas à melhoria da qualidade de vida do idoso (MARQUES et al., 2010), além de conscientizar a importância da sexualidade em qualquer fase da vida, pois esta é uma necessidade básica do ser humano, e deve permanecer até os últimos dias do indivíduo (LARA; SOARES, 2009).

Um dos fatores associados com a idade é a infertilidade. A infertilidade é um problema que afeta homens e mulheres na mesma proporção. De acordo com a Associação Americana para Medicina Reprodutiva (ASMR), 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.

Sabe-se que com o passar dos anos os espermatozoides sofrem alterações genéticas. Além disso, partir dos 40 anos, os hormônios masculinos diminuem 1% ao ano, e nesse período de envelhecimento o homem sofre mudanças fisiológicas e psicológicas. Por volta dos 50 anos de idade, os homens são afetados pela diminuição do tamanho dos testículos e declínio da produção de testosterona, que é fundamental para as características sexuais masculinas. Isto é causado pela andropausa (BALLONE G.J, 2002).

A tendência recente de paternidade tardia levanta preocupações por causa dos efeitos negativos do envelhecimento sobre a fertilidade. Embora sabe-se que a fertilidade feminina diminui com o envelhecimento, como resultado da diminuição da

---

reserva de ovócitos e de qualidade, estudos recentes têm demonstrado também os efeitos do envelhecimento no sistema reprodutor masculino. No entanto, o declínio observado relacionado à idade na fertilidade masculina continua a ser estabelecido, assim como as terapias promissoras para o tratamento da infertilidade masculina (DESAI et al., 2009).

Os recentes achados da comunidade científica discutem com ênfase a relação entre o envelhecimento humano e o estresse oxidativo (GHARAGOZLOO; AITKEN, 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 espermatozóides, afim de avaliar o possível uso de antioxidantes para melhorar esta condição.

O desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROS) e de antioxidantes no organismo pode levar a queda no número de espermatozóides 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 espermatozóides, como a capacitação, reação acrossômica e sinalização de processos para garantir a fertilização (BANSAL; BILASPURI, 2011).

O uso de substâncias 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. Como está presente em pequenas quantidades no vinho tinto, estudos têm demonstrado sua ação através de uma dosagem maior desta substância para uso em terapias, como anti-inflamatório. Ainda, o resveratrol pode estimular a ação das sirtuínas, que são enzimas reguladoras dos mecanismos de longevidade, podendo atenuar a ação das EROS, assim como na infertilidade humana causada pelo excesso de EROS (EL-AGAMY, 2010; DIPAK et al., 2011).

Estudos mostram que o uso de resveratrol pode 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 platensis* está legalmente autorizada como alimento ou complemento alimentar na Europa, Japão e Estados Unidos (FOX RD, 1996).

A Universidade de Passo Fundo, junto ao curso de Engenharia de Alimentos e ppgEH vêm estudando a utilização da cianobactéria *Spirulina platensis*. Estes estudos podem ser exemplificados pelos trabalhos publicados recentemente: GUARIENTTI et al. (2010); BERTOLIN et al. (2011a); BENEDETTI, et al. (2011); BERTOLIN et al. 2011b; CENTENARO, et al. (2010); BERTOLIN et al. (2009); AMBROSI et al. (2008); SOUZA et al. (2007); BERTOLIN et al. (2005). Nestas abordagens buscamos o desenvolvimento de alimentos saudáveis, a atenuação do estresse oxidativo e da lipoperoxidação lipídica, e mais recentemente na expressão de enzimas deacetilases-

sirtuinas e por consequência o aumento do tempo de vida do homem.

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.

## 2 PRODUÇÃO CIENTÍFICA I

### AVALIAÇÃO DA QUALIDADE SEMINAL EM ADULTOS APÓS O USO DE SPIRULINA PLATENSIS E RESVERATROL

RESUMO: Uma das causas mais comuns da infertilidade masculina é causado por pouca concentração espermática ou motilidade. Hoje, duas substâncias estão sendo pesquisadas: *Spirulina platensis* e resveratrol, com intenção de melhorar parâmetros seminais. O objetivo deste estudo foi avaliar se o uso de *Spirulina platensis* e resveratrol contribui na qualidade seminal em homens entre 40 e 60 anos de idade. Trata-se de um estudo clínico randomizado cego com dois grupos: *Spirulina platensis* (Sp) e Resveratrol (R), onde cada um dos grupos foi composto por 25 homens entre 40 e 60 anos de idade, os quais passaram por terapia durante 90 dias. O grupo Sp foi submetido à terapia oral de 4 g de *Spirulina platensis* e o grupo R foi submetidos à terapia oral com 500 mg de Resveratrol. As amostras foram submetidas às análises de espermograma antes e depois da terapia. Após a terapia de 90 dias, constatou-se que a concentração e morfologia foram significativos no grupo de Sp e a motilidade e vitalidade foram significativos no grupo resveratrol. Concluiu-se que, o uso destas terapias contribuem para a melhora da qualidade seminal em homens entre 40 a 60 anos de idade, sendo terapias promissoras para futuros estudos no tratamento da infertilidade em homens inférteis.

**Palavras-chave:** 1. Antioxidantes. 2. Infertilidade masculina. 3. Qualidade seminal.

#### 2.1 Introdução

De acordo com a Associação Americana para Medicina Reprodutiva (ASMR, 2007), infertilidade é a falta de gestação detectada após 12 meses de relações sexuais normais, sem contracepção. A infertilidade é um problema que afeta homens e mulheres na mesma proporção.

---

A infertilidade masculina é causada por diferentes fatores, sendo as causas mais comuns número insuficiente de espermatozóides ou pouca motilidade destes, ou ainda quando ambos associados (ASMR, 2007).

Sabe-se 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 também no sistema reprodutor masculino, que há poucos anos não era muito estudado. No entanto, o declínio observado relacionado à idade na fertilidade masculina continua a ser estabelecido (DESAI et al., 2009).

O desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROS) e de antioxidantes no organismo pode levar a queda no número de espermatozóides e deformidade dos mesmos, alterando sua morfologia. Altas concentrações de EROS podem causar patologias espermáticas, levando à peroxidação lipídica e perda da motilidade e viabilidade. Em pequenas e controladas concentrações, as EROS desempenham importante papel nos processos fisiológicos dos espermatozóides, como a capacitação, reação acrossômica e sinalização de processos para garantir a fertilização (BANSAL; BILASPURI, 2011).

O resveratrol 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 Espécies Reativas de Oxigênio, contribuindo também no tratamento da infertilidade causada pelo excesso de EROS (EL- AGAMY, 2010).

Um estudo recente demonstrou que a adição do resveratrol no processo de criopreservação espermática os parâmetros concentração e motilidade permaneceram estáveis, auxiliando no tratamento da infertilidade masculina. Isto significa que o uso de

resveratrol pode reduzir os processos de lipoperoxidação nos espermatozóides, melhorando a qualidade espermática (GARCEZ et al., 2010).

A *Spirulina platensis* é uma cianobactéria, que está legalmente autorizada como alimento ou complemento alimentar (KHAN et al., 2005). Recentemente, a Food and Drug Administration (FDA), emitiu o primeiro certificado GRAS (Generally Recognized as Safe) para a *Spirulina*, deliberando que a *Spirulina* poderia ser utilizada como alimento sem apresentar risco à saúde. No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2009) reconheceu a *Spirulina* como ingrediente que pode ser utilizado nas formulações de alimentos, sendo a recomendação diária de consumo do produto limitada a 1,6 g.

A *Spirulina platensis*, além de excelente suplemento alimentar, é uma fonte potencial no tratamento de diversas doenças (AMBROSI et al., 2008; LABBÉ et al., 2011), 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 *Spirulina platensis* e resveratrol contribui na qualidade seminal em homens entre 40 e 60 anos de idade.

## 2.2 *Materiais e métodos*

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo sob número 0153.0.398.000-11. O período de coleta de dados para avaliação, bem como o experimento, ocorreu entre janeiro de 2012 a novembro de 2012 no 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 ensaio clínico randomizado cego 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 4 g de *Spirulina platensis* durante o período de 90 dias. O grupo R foi submetidos à terapia oral em cápsulas de 500 mg de Resveratrol durante o período de 90 dias. Por ser um estudo cego, nenhum dos grupo recebeu a informação sobre a terapia a qual estava sendo submetido.

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 administrando medicamento controlado.

A Tabela 1 apresenta os parâmetros seminais de acordo com a Organização Mundial da Saúde (2010), que serviram como valores de referência para esta pesquisa.

Tabela 1 - Parâmetros seminais de acordo com a Organização Mundial de Saúde

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

Fonte: Organização Mundial de 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.

---

A análise seminal – espermograma – 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 pré-estabelecido, de três a cinco dias, para todos os pacientes.

Para as análises macroscópicas de aparência, volume, liquefação, viscosidade e pH, foram determinadas de acordo com manual da Organização Mundial de Saúde (2010).

As análises microscópicas de concentração, motilidade, vitalidade e morfologia das amostras também foram realizados de acordo com a OMS (2010).

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  $p < 0,05$ .

---

### 2.3 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.

Como a pesquisa envolveu pacientes entre 40 e 60 anos de idade, foi realizada uma divisão uniforme entre os grupos *Spirulina platensis* e resveratrol, de acordo com a faixa etária, para não haver desvio padrão significativo e comprometer os resultados desta pesquisa.

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.

O grupo Resveratrol apresentou resultados significativos na motilidade ( $p = 0,027$ ), após o terapia oral de 500 mg (Tabela 2). Ou seja, a motilidade espermática aumentou 7,80% depois da terapia. Já a concentração espermática passou de 32,7% para 40,7% (Tabela 2), e a morfologia teve uma melhora de 0,24%. A vitalidade espermática aumentou 3,92% após esta terapia.

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



Tabela 2 - Análise seminal dos grupos *Spirulina platensis* e resveratrol. A tabela mostra as variáveis realizadas na análise seminal completa.

		Antes	Depois	<i>p-value</i>
Spirulina	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*
	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
Resveratrol	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
	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  $p < 0,05$ 

A vitalidade das amostras submetidas a esta terapia (*Spirulina platensis*), obteve melhora de 3,33%. A motilidade aumentou quando comparado antes e depois da terapia, visualizado na Figura 1. E, a concentração espermática (milhões/mL) também aumentou, cerca de 8,00% (Figura 2).

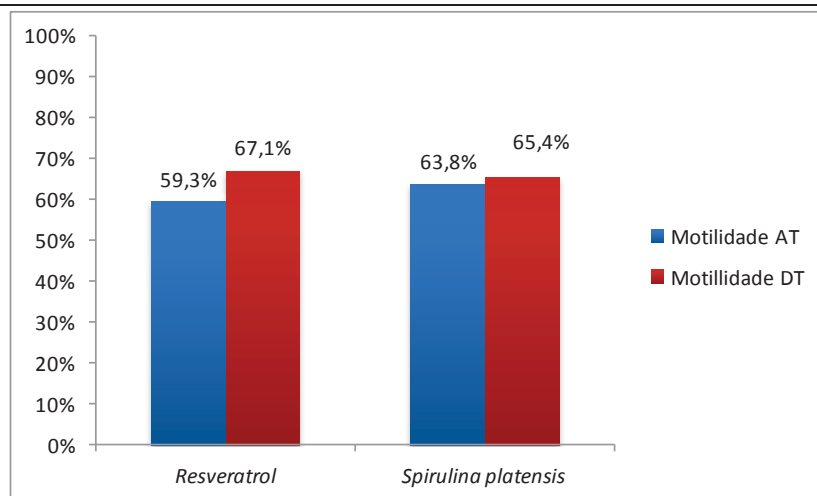


Figura 1 - Motilidade antes e depois do tratamento com Resveratrol e *Spirulina platensis*.

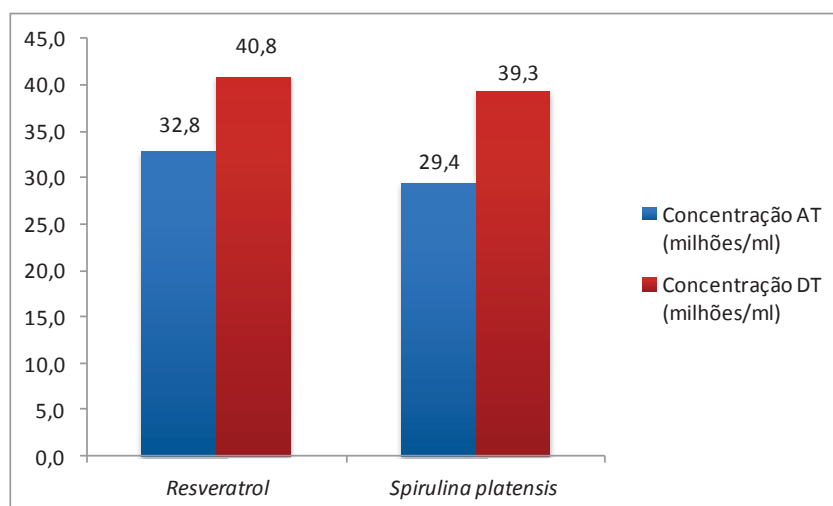


Figura 2 - Concentração antes e depois do tratamento com Resveratrol e *Spirulina platensis*.

Tanto o grupo Resveratrol quanto o grupo *Spirulina platensis*, apresentaram melhora do parâmetro de vitalidade espermática, porém o grupo Resveratrol apresentou melhor desempenho na análise, sendo significativo (R 3,92% versus Sp 3,33%). 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 morfolologicamente os

espermatozóides, o grupo *Spirulina platensis* apresentou maior destaque (0,88% versus 0,24%).

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 praticavam atividade física apresentaram melhor motilidade seminal (espermatozóides grau A e B) do que aqueles que não praticam nenhuma atividade física,  $p = 0,035$ , e a concentração espermática é 6,27% maior que os não praticantes. E, quando comparado a atividade física com vitalidade espermática, não foi constatado influência deste parâmetro seminal. 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 alcóolicas e a qualidade seminal ( $p = 0,308$ ).

Tabela 3 - Variáveis questionário padrão através da análise estatística Qui-quadrado.

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

\* Significativo  $p < 0,05$

#### 2.4 Discussão

O espermograma inclui uma análise seminal completa, incluindo a estimativa quantitativa (percentual de espermatozóides 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 espermatozóide e na infertilidade. Um dos fatores mais importantes que contribuem para espermatozóides 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 (GARCEZ et. al, 2010; CAPUCHO et al., 2012). Foram encontrados apenas estudos que demonstram a ação de outras substâncias antioxidantes na melhora da qualidade seminal.

Estudo demonstra a ação da vitamina C administrada via oral como fonte antioxidante, para manutenção das células espermáticas, sendo considerado o principal antioxidante do plasma seminal (MEMBRILLO et al., 2003). Ainda, outro estudo mostrou que a administração oral de multivitaminas durante período de 90 dias, contendo L-carnitina, vitamina C, coenzima Q10, vitamina E, vitamina B9, vitamina B12, zinco e selênio, melhorou significativamente os parâmetros espermáticos em 20 homens estudados que tinham sido diagnosticados com atenozoospermia, ou seja, espermatozóides com baixa motilidade e morfologia anormal (ROBERTSON, 2012).

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 reflete na proporção de espermatozóides vivos. O princípio desta técnica baseia-se na perda da integridade da membrana plasmática, que está ligada também ao dano do DNA 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 percentagem 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 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 (ESTEVEZ; 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).

## 2.5 Conclusões

Conclui-se que o tratamento de 90 dias com *Spirulina platensis* ou resveratrol melhora a qualidade seminal em homens entre 40 e 60 anos de idade. Considerando seu perfil de segurança, *Spirulina platensis* e resveratrol são terapias promissoras para estudos futuros em homens inférteis.

Apesar de resultados positivos com ambas as terapias para melhora da qualidade seminal, ainda são necessárias mais pesquisas para que haja estabelecimento de uma

dosagem ideal de *Spirulina platensis* e resveratrol, para que possam ser aplicados como terapias complementares no tratamento da infertilidade masculina.

## 2.6 Referências

AMBROSI, M. A. et al. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 29, n. 2, 2008.

AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. *Super-ICSI: Nova pesquisa confirma bons resultados*, v. 88, set. 2007.

BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. Impacts of Oxidative stress an antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*, n. 7, p. 1-7, set. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. VII Lista dos novos ingredientes aprovados – Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Disponível em:  
<[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos\\_ingredientes.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_ingredientes.htm)> . 2009.  
Acesso em: jan. 2012.

CAPUCHO, C. et al. Green propolis effects on sperm count and epididymis morphology and oxidative stress. *Food Chem Toxicol.*, v. 50, n. 11, p. 3956 – 3962, ago. 2012.

DESAI, N.; SABANEKH, E. J.; KIM, T.; AGARWAL, A. Free radical theory of aging: implications in male fertility. *Urology*, v. 75, n.1, p. 9-14, jul. 2010.

EL-AGAMY, D.S. Comparative effects of curcumin and resveratrol on aXatoxin B1-induced liver injury in rats. *Arch Toxicol*, v. 84, n. 5, p. 389-396, jan. 2010.

ESTEVEZ, S.C.; AGARWAL, A. Novel concepts in male infertility. *International Brazil Journal Urology*, v. 37, n. 1, p. 5-15, jan./fev. 2011.

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.

KHAN, Z.; BHADOURIA, P.; BISEN, P.S.; Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina*. *Curr Pharm Bioyechmol*, v.5, n. 6, p. 373-379, out. 2005.

LABBÉ, A. et al. Resveratrol Improves insulin resistance hyperglycemia and hepatosteatosis but not hypertriglyceridemia, inflammation and life span in a mouse model for werner syndrome. *Journal of Gerontology*. v. 66, n. 3, p. 264-278, out. 2011.

MEAMAR, M. et al. Sperm DNA fragmentation induced by cryopreservation: new insights and effect of a natural extract from *Opuntia ficus-indica*. *Fertility & Sterility*, v. 98, n.2 p. 326-333, mai. 2012.

MEMBRILLO A. et al. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: Una revisión. *INCI*, Caracas, 2003, v. 28, n. 12.

MENKEVLD, R.; KRUGER, T. Análise Seminal Básica. In: BADALOTTI, Mariangela; TELÖKEN, Claudio; PETRACCO, Alvaro (Org.). *Fertilidade e Infertilidade Humana*. Porto Alegre: Medsi.,1997. p. 417-423.

ROBERTSON, S. Antioxidants improve sperm quality in infertile men. News Medical. Disponível em: <<http://www.news-medical.net/news/20120910/Antioxidants-improve-sperm-quality-in-infertile-men.aspx>>. 2012. Acesso em: dez. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory manual for examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 5th ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, mai., 2011



### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

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.

A causa mais comum da infertilidade masculina é a pouca concentração ou a pouca 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.

No projeto de pesquisa foi relatado que seria realizado análises de estresse oxidativo. Não foram relatados esses resultados, pois não apresentaram significância. Acredita-se que possa ter ocorrido algum erro analítico pelo tempo que as amostras permaneceram congeladas.

## REFERÊNCIAS

- AMBROSI, M. A. et al. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 29, n. 2, 2008.
- ALMEIDA, T.; LOURENCO, M. L. Envelhecimento, amor e sexualidade: utopia ou realidade. *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.*, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, jan. 2007.
- ALVES L.C. et al. A influência das doenças crônicas na capacidade funcional dos idosos do Município de São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v. 23, n. 8, ago, 2007.
- AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. *Super-ICSI: Nova pesquisa confirma bons resultados*, v. 88, set. 2007.
- BALLONE G.J. Andropausa. *Psiquiatria Geral*. Disponível em <<http://gballone.sites.uol.com.br/geriat/andropausa.html>>. 2002. Acesso em: nov. 2011.
- BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. Impacts of Oxidative stress an antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*, n. 7, p. 1-7, set. 2011.
- BERTOLIN, T. E. et al. Efeito antioxidante da ficocianina em pescado salgado-seco. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, v. 35, n. 4, p. 85-91, ago. 2011.
- BERTOLIN, T. E. et al. Effect of microalga *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on hippocampus lipoperoxidation and lipid profile in rats with induced hypercholesterolemia. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, n. 5, p. 1253-1259, set./out. 2009.
- BERTOLIN, T. E. et al. Antioxidant Effect of Phycocyanin on Oxidative Stress Induced with Monosodium Glutamate in Rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology (Impresso)*, v. 54, n. 4, p. 733-738, jul./ago. 2011.

BERTOLIN, T. et al. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* a partir de efluente sintético de suíno. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras - MG, v. 29, n.1, p. 118-125, jan./fev., 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. VII Lista dos novos ingredientes aprovados – Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Disponível em:  
<[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos\\_ingredientes.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_ingredientes.htm)> . 2009.  
Acesso em: jan. 2012.

CAPUCHO, C. et al. Green propolis effects on sperm count and epididymis morphology and oxidative stress. *Food Chem Toxicol.*, v. 50, n. 11, p. 3956 – 3962, ago. 2012.

CENTENARO, A.; GARIANTI, Cintia; Amaral, F.U.I. ; Viganó, G. S.; COLLA, Luciane Maria ; COSTA, Jorge Alberto Vieira; BERTOLIN, T. E. Restrição calórica e ficocianina no processo do envelhecimento de ratos. *Revista Brasileira de Ciências do Envelhecimento Humano*, v. 7, n. 1, p. 81-90, 2010.

COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E. ; COLLA, L. M. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grow under different temperatures and nitrogen concentrations. *Zeitschrift für Naturforschung. C, A Journal of Biosciences*, v. 59, n.1, p. 55-59, jan. 2004.

DESAI, N. et al. Free radical theory of aging: implications in male fertility. *Urology*, v. 75, n.1, p. 9-14, jul. 2010.

DIPAK, K.; SUBHENDU M.; DIPTARKA R. Erratum to: Resveratrol and red wine, healthy heart and longevity. *Heart Fail Rev*, v.4, n. 16, p. 425-435, jul. 2011.

EL-AGAMY, D.S. Comparative effects of curcumin and resveratrol on aXatoxin B1-induced liver injury in rats. *Arch Toxicol*, v. 84, n. 5, p. 389-396, jan. 2010.

ESTEVEES, S.C.; AGARWAL, A. Novel concepts in male infertility. *International Brazil Journal Urology*, v. 37, n. 1, p. 5-15, jan./fev. 2011.

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.

GUARIENTTI, C.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Capacidade antioxidante da microalga Spirulina platensis em células da levedura Saccharomyces cerevisiae submetidas ao estressor paraquat. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 69, n.1 p. 56-62, jan./mar. 2010.

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.

LARA, M. A.; SOARES, F. A. Envelhecimento humano e atividade sexual. *Revista Digital*, Buenos Aires, v. 14, n. 135, 2009. Disponível em <<http://www.efdeportes.com/efd135/envelhecimento-humano-e-atividade-sexual.htm>> Acesso em: mar. 2011.

LABBÉ, A. et al. Resveratrol Improves insulin resistance hyperglycemia and hepatosteatosis but not hypertriglyceridemia, inflammation and life span in a mouse model for werner syndrome. *Journal of Gerontology*. v. 66, n. 3, p. 264-278, out. 2011.

MARQUES M. et al. Capacidade Funcional: estudo prospectivo em idosos residentes em uma instituição de longa permanência. *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.*, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, ago. 2010.

MEAMAR, M. et al. Sperm DNA fragmentation induced by cryopreservation: new insights and effect of a natural extract from *Opuntia ficus-indica*. *Fertility & Sterility*, v. 98, n.2 p. 326-333, mai. 2012.

MEMBRILLO A. et al. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: Una revisión. *INCI*, Caracas, 2003, v. 28, n. 12.

---

MENKEVLD, R.; KRUGER, T. Análise Seminal Básica. In: BADALOTTI, Mariangela; TELÖKEN, Claudio; PETRACCO, Alvaro (Org.). *Fertilidade e Infertilidade Humana*. Porto Alegre: Medsi.,1997. p. 417-423.

RISMAN, A. Sexualidade e Terceira Idade: uma visão histórico-cultural. *Textos Envelhecimento*, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, nov. 2005.

ROBERTSON, S. Antioxidants improve sperm quality in infertile men. News Medical. Disponível em: <<http://www.news-medical.net/news/20120910/Antioxidants-improve-sperm-quality-in-infertile-men.aspx>>. 2012. Acesso em: dez. 2012.

SOUZA, F. T. et al. Avaliação do potencial antioxidante da ficocianina em sistema lipídico óleo de soja e azeite de oliva. *Alimentos e Nutrição (UNESP. Marília)*, São Paulo - SP, v. 17, n. 3, p. 287-291, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Envelhecimento Ativo: uma política de saúde. Brasília (DF): Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) 2005.

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.

## ANEXOS

Anexo A. Parecer Comitê de Ética



PARECER N. 389/2011

O Comitê de Ética em Pesquisa – UPF, em reunião no dia 31/08/11, analisou o projeto de pesquisa “Avaliação da qualidade seminal em humanos com o uso das terapias *Spirulina platensis* e resveratrol”, CAAE nº 0153.0.398.000-11, de responsabilidade da pesquisadora Franciele Bona Verzeletti.

O projeto tem como objetivo(s): Analisar se há melhora na qualidade seminal em homens entre 40 a 70 anos de idade frente ao uso de antioxidante resveratrol e *Spirulina platensis*. Como específicos: Avaliar a qualidade seminal em homens entre 40 anos a 70 anos, através de espermograma nas terapias com resveratrol e *Spirulina platensis*; comparar qualidade seminal das terapias com *Spirulina platensis* e resveratrol e com o grupo controle nos grupos analisados; determinar se o uso de antioxidante contribui para aumento da capacidade reprodutiva e fertilidade masculina.

Trata-se de um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, com grupo controle. A coleta de dados será durante 2012 no Laboratório de Bioquímica (ICB) e no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos do Curso de Engenharia de Alimentos da UPF. Participarão 75 sujeitos sorteados para participar de Três grupos: Grupo controle, grupo *Spirulina platensis* (Sp) e grupo Resveratrol (R). Cada grupo será composto por 25 sujeitos masculinos entre 40 e 70 anos de idade. O grupo de controle será constituído por sujeitos sem uso de terapia. No grupo *Spirulina platensis* (Sp), 25 homens serão submetidos à terapia com 4g de *Spirulina platensis* em cápsulas durante 3 meses (90 dias). No grupo resveratrol (R), 25 homens serão submetidos à terapia com 100mg de Resveratrol em cápsulas durante 3 meses (90 dias). Após três meses (90 dias) de terapia com *Spirulina platensis* (4g) e resveratrol (100mg), as análises serão efetuadas novamente, comparando os resultados entre as análises (inicial e posterior à terapia).

Serão incluídos no estudo homens entre 40 a 70 anos de idade que apresentem Oligospermia (concentração de espermatozoides inferior a 15 milhões/ml), àqueles que apresentam Ateospermia (motilidade inferior a 40%) e àqueles que apresentam Oligosastenospermia (diminuição da concentração e motilidade espermática).

Serão excluídos do estudo os homens que não comparecerem para realizar nova coleta após terapia com o uso dos antioxidantes e aqueles que desistirem no decorrer da pesquisa.

As amostras seminais serão coletadas por masturbação em uma sala do laboratório (equipada para isso). O período de abstinência ideal para obter melhores parâmetros seminais é entre três e cinco dias.

As pendências foram ajustadas.

Os direitos fundamentais dos participantes foram garantidos no projeto e no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O protocolo foi instruído e apresentado de maneira completa e adequada. Os compromissos da pesquisadora e das instituições envolvidas estavam presentes. O projeto foi considerado claro em seus aspectos científicos, metodológicos e éticos.

Diante do exposto, este Comitê, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.

Solicita-se ao (a) pesquisador (a) apresentar relatório a este CEP no final do estudo.

**Situação: PROTOCOLO APROVADO**

Passo Fundo, 12 de setembro de 2011

Nadir Antonio Pichler  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa



Anexo B. Comprovante de submissão

iju@gol.com  
Para: fra.verzeletti@gmail.com  
International Journal of Urology - IJU-01454-2012

16 de novembro de 2012 17:03

16-Nov-2012

Dear Prof. FRANCIELE VERZELETTI

This is to acknowledge the receipt of your manuscript submitted to International Journal of Urology. We will notify you of the review result as soon as we reach a decision on your paper.

Ms. No.: IJU-01454-2012  
Title: Evaluation of seminal quality after using Spirulina platensis and resveratrol.  
Author(s): VERZELETTI, FRANCIELE; Poletto, Rodrigo; Bertolin, Telma; Fornari, Fernando  
Category: Original Articles

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/iju> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/iju>.

Sincerely yours,

Administrator  
Editorial Office  
International Journal of Urology

ScholarOne Manuscripts

16/11/12 17:03

INTERNATIONAL JOURNAL OF  
**UROLOGY**

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

SCHOLARONE<sup>™</sup>  
Manuscripts

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as FRANCIELE VERZELETTI


## Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *International Journal of Urology*.

Manuscript ID: IJU-01454-2012  
Title: Evaluation of seminal quality after using Spirulina platensis and resveratrol.  
Authors: VERZELETTI, FRANCIELE  
Poletto, Rodrigo  
Bertolin, Telma  
Fornari, Fernando  
Date Submitted: 16-Nov-2012

 Print  Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts<sup>™</sup> v4.10.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2012. All Rights Reserved.  
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

 Follow ScholarOne on Twitter

Anexo C. Normas da Revista científica

# INTERNATIONAL JOURNAL OF **UROLOGY**

## AUTHOR GUIDE

### 1. ABOUT THE JOURNAL

**Scope** IJU is the official English journal of The Japanese Urological Association and Urological Association of Asia. It publishes original research articles dealing with clinical and laboratory urology.

**Editor** Yukio Homma **Frequency** Monthly **ISSN** 0919-8172 (print), 1442-2042 (online). **Impact Factor** 1.747 **Journal abbreviation** Int J Urol **Publisher** Wiley-Blackwell, an imprint of John Wiley & Sons, Inc.

### 2. EDITORIAL REVIEW AND ACCEPTANCE

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to our readership. Except where otherwise stated, manuscripts are peer reviewed by two anonymous reviewers and the

**Editor.** The Editorial Board reserves the right to refuse any material for publication and advises that authors should retain copies of submitted manuscripts and correspondence as material cannot be returned. Final acceptance or rejection rests with the Editorial Board.

All manuscripts should be written so that they are intelligible to the professional reader who is not a specialist in the particular field. They should be written in a clear, concise, direct style. Where contributions are judged as acceptable for publication on the basis of urologic content, the Editor and the Publisher reserve the right to modify manuscripts to eliminate ambiguity and repetition and improve communication between author and reader. If extensive alterations are required, the manuscript will be returned to the author for revision.

Authorship should be finalized during the submission process. Please ensure that all authors are listed and in the correct order, because changes are not permissible once the accepted manuscript goes into production.

### 3. MANUSCRIPT CATEGORIES

(1) **ORIGINAL ARTICLES** Word limit: 3,000 words including abstract but excluding references, tables and figures. Abstract: 250 words maximum, structured (sub-

headers): Objectives, Methods, Results, Conclusions. References: No limit. Description: Full-length reports of current research in either basic or clinical science. Arrange text as follows: Introduction, Methods, Results, Discussion, Acknowledgment, References, and when relevant, Supplementary Material.

Figures/tables: Up to 4 in total. Description: New findings that will substantially and immediately affect research or clinical practice. The words "Short Communication" must appear at the top left corner of the title page. Arrange text as in Original Articles.

#### 4. DISCLOSURE

Conflicts of Interest: Authors should declare relationships that may pose any conflicts of interest as a Conflict of Interest statement in the CONFLICTS OF INTEREST section within the Manuscript.

Financial Support: Authors are required to identify explicitly all sources of funding. If the research reported in the manuscript has received partial or complete funding from commercial sponsors, the authors must also include a statement to that effect. The existence of financial support is not an impediment to publication; however, the disclosure of funding is mandatory and should be indicated in the ACKNOWLEDGEMENT section within the Manuscript.

#### 5. ETHICAL CONSIDERATIONS

Authors must state that the protocol for the research project has been approved by a suitably constituted Ethics Committee of the institution within which the work was undertaken and that it conforms to the provisions of the Declaration of Helsinki (as revised in Tokyo 2008), available at: <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>. In general, submission of a case report should be accompanied by the written consent of the subject (or parent/guardian) before publication; this is particularly important where photographs are to be used or in cases where the unique nature of the incident reported makes it possible for the patient to be identified. While the Editors recognize that it might not always be possible or appropriate to seek such consent, the onus will be on the authors to demonstrate that this exception applies in their case. Any experiments involving animals must be demonstrated to be ethically acceptable and where relevant conform to national guidelines for animal usage in research.

#### 6. STRUCTURE OF MANUSCRIPTS

The length of manuscripts must adhere to the specifications under the section Manuscript Categories. Manuscripts should be presented in the following order: (i) title page, (ii) abstract and key words, (iii) text, (iv) acknowledgments, (v)

conflicts of interest, (vi) references, (vii) supporting information, (viii) figure legends, (ix) tables (each table complete with title and footnotes) and (x) figures. Footnotes to the text are not allowed and any such material should be incorporated into the text as par- enthetical matter.

## TITLE PAGE

The title page should contain (i) the title of the paper, (ii) the full names of the authors and (iii) the addresses of the institutions at which the work was carried out together with (iv) the full postal and email address, plus facsimile and telephone numbers, of the author to whom correspondence about the manuscript should be sent (v) a word count.

The present address of any author, if differ- ent from that where the work was carried out, should be supplied in a footnote. In keeping with the latest guidelines of the In- ternational Committee of Medical Journal Editors, each author's contribution to the paper is to be quantified. The title should be short, informative and contain the major key words so that readers and in particular online users will discover the article easily in online search. Do not use abbreviations in the title. A short running title (less than 40 characters) should also be provided. The running title is the short title in the upper right hand corner of articles to help article search.

## ABSTRACT AND KEYWORDS

The length of abstracts must adhere to the specifications under the section Manuscript Categories. Please note that the require- ments differ between manuscript types. The abstract should not contain abbreviations or references.

Five key words, for the purposes of indexing, should be supplied below the abstract, in al- phabetical order, and should be taken from those recommended by the US National Li- brary of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>

## TEXT

Please note that the requirements differ between manuscript types. Please refer to Manuscript Categories for individual requirements.

## ACKNOWLEDGMENTS

The source of financial grants and other funding must be acknowledged, including a frank declaration of the authors' industrial links and affiliations. The contribution of col- leagues or institutions should also be acknowledged. Thanks to anonymous re- viewers are not appropriate.

## REFERENCES

The Vancouver system of referencing should be used (examples are given below). In the text, references should be cited using superscript Arabic numerals in the order in which they appear. If cited in tables or figure legends, number according to the first identification of the table or figure in the text. In the reference list, cite the names of all authors when there are six or fewer; when seven or more, list the first three followed by et al. Do not use *ibid.* or *op cit.* Reference to unpublished data and personal communications should not appear in the list but should be cited in the text only (e.g. Smith A, 2000, unpublished data). All citations mentioned in the text, tables or figures must be listed in the reference list. Names of journals should be abbreviated in the style used in *Index Medicus*. Authors are responsible for the accuracy of the references.

Standard journal article:

1. Furuya R, Takahashi S, Furuya S, Takeyama K, Masumori N, Tsukamoto T. Chlamydial seminal vesiculitis without symptomatic urethritis and epididymitis. *Int. J. Urol.* 2006; 13: 466–7.

Standard journal article using DOI; articles published online in advance without volume, issue, or page number. The DOI will remain valid and allow an article to be tracked even after its allocation to an issue. (More information about DOIs: <http://www.doi.org/faq.html>):

1. Furuya R, Takahashi R, Furuya S et al. Is urethritis accompanied by seminal vesiculitis? *Int. J. Urol.* Published online: 12 May 2009; DOI:10.1111/j.1442-2042.2009.02314.x

Books: 2. Ernstoff M. *Urologic Cancer*. Blackwell Science, Boston, 1997

Chapter in an edited book: 3. Gilchrist RK. Further commentary: Continent stroma. In: King LR, Stone AR, Webster GD (eds). *Bladder Reconstruction and Continent Urinary Diversion*. Year Book Medical, Chicago, 1987; 204–205

## 12. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts must be submitted online at:

<http://mc.manuscriptcentral.com/iju>

Authors must supply an email address as all correspondence will be by email.

## APÊNDICES



Apêndice A. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado para participar da pesquisa intitulada “Avaliação da Qualidade seminal em adultos após o uso de *Spirulina platensis* e resveratrol”, realizada pelos pesquisadores Franciele Bona Verzeletti, Telma Elita Bertolin e Fernando Fornari, vinculados à Universidade de Passo Fundo.

Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador, (ou com a entidade vinculada) ou para o seu atendimento e tratamento.

O objetivo desta pesquisa é avaliar o efeito da alga *Spirulina platensis* e resveratrol (um dos compostos presentes na uva e vinho tinto) na qualidade espermática em homens com exame alterado do esperma, com idade entre 40 a 60 anos.

A justificativa do estudo é, resumidamente, a seguinte: Existem muitos fatores biológicos que podem ser estudados no que diz respeito ao envelhecimento humano, um deles é o processo de envelhecimento do sistema reprodutor masculino, especificamente nas células germinativas. Certamente indivíduos que apresentam deficiências em seus níveis de antioxidantes apresentam um risco significativo para algumas patologias relacionadas ao envelhecimento, uma delas é a infertilidade. Já se sabe que com o passar dos anos as células precursoras dos espermatozoides sofrem alterações genéticas, mas não temos dados conclusivos para dizer até que ponto um homem mais velho pode gerar filhos sem problemas. A partir disto, esta pesquisa propõe avaliar se a suplementação oral de antioxidante resveratrol e *Spirulina platensis* podem melhorar a qualidade seminal. A pesquisa contribuirá para expandir e aprofundar nossos conhecimentos referente a capacidade reprodutiva masculina e do processo de envelhecimento humano.

O estudo consiste basicamente em administrar de forma oral *Spirulina platensis* ou Resveratrol num período de 90 dias. Para *Spirulina platensis* serão administradas 6 cápsulas ao dia (3 cápsulas pela manhã e 3 cápsulas a noite), o resveratrol será administrado 1 cápsula ao dia. O objetivo é comparar a *Spirulina platensis* e o resveratrol na qualidade seminal. Caso concorde em participar do estudo, você será sorteado para receber *Spirulina platensis* ou resveratrol, por 90 dias. As amostras seminais serão coletadas através de masturbação em uma sala do laboratório equipada para isso. Serão realizadas duas coletas no decorrer da pesquisa, uma anterior a terapia com *Spirulina platensis* ou resveratrol, e outra após a terapia de 90 dias com *Spirulina platensis* ou resveratrol.

Ao participar, os riscos para você serão mínimos. Não há relatos de efeitos adversos importantes associados à *Spirulina platensis* ou resveratrol.

Você não será beneficiado(a) diretamente pela pesquisa, mas você estará ajudando a entender se o uso de antioxidante pode trazer benefício para pessoas que desejam ser pais em idade mais avançada, auxiliar no tratamento da infertilidade masculina, e avaliar o processo de envelhecimento nessas células germinativas – espermatozoides. Além dos benefícios em prol da ciência e pesquisa científica.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais, isto é, o seu nome não será divulgado em nenhum momento, sendo mantido sigilo sobre sua participação.

Você não será recompensado(a) financeiramente pela sua participação.

Ao assinar este documento, você estará concordando em participar da pesquisa e que entendeu os objetivos, riscos e benefícios da sua participação e todas as informações que lhe foram prestadas pelos pesquisadores.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço dos pesquisadores, podendo tirar suas dúvidas sobre a pesquisa e sua participação, a qualquer momento.

Concordo em participar do estudo.

**Pesquisador:**

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

**Participante:**

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**O presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi elaborado de acordo com a Res. CNS 196/96 e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo.**

O participante pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo pelo telefone (054) 3316-8370, e com a pesquisadora pelo telefone (041) 9996-2007.

## Apêndice B. Projeto de Pesquisa

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO**  
**FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA E FISIOTERAPIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENVELHECIMENTO HUMANO**

Franciele Bona Verzeletti

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE SEMINAL**  
**EM HUMANOS COM O USO DAS TERAPIAS**  
***SPIRULINA PLATENSIS* E RESVERATROL**

**Orientadora: Telma Elita Bertolin**  
**Co-orientador: Fernando Fornari**

**Passo Fundo**  
**Julho de 2011**

# 1 DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

## 1.1 Título

Avaliação da qualidade seminal em adultos após o uso de *Spirulina platensis* e resveratrol.

## 1.2 Grupo de pesquisa

Grupo Vivencer.

## 1.3 Linha de pesquisa

Aspectos biológicos e culturais do envelhecimento humano.

## 1.4 Equipe executora

**1.4.1 Autor:** Franciele Bona Verzeletti, graduada em Biomedicina pela Universidade Luterana do Brasil, especialista em Reprodução Humana Assistida e mestranda em Envelhecimento Humano pelo Programa de Pós-graduação em Envelhecimento Humano da Universidade de Passo Fundo – RS, e-mail: [fra.verzeletti@gmail.com](mailto:fra.verzeletti@gmail.com).

**1.4.2 Orientadora:** Professora Dra. Telma Elita Bertolin, professora do Programa de Pós-graduação em Envelhecimento Humano da Universidade de Passo Fundo - RS, e-mail: [telma@upf.br](mailto:telma@upf.br).

**1.4.3 Co-orientador:** Professor Dr. Fernando Fornari, professor colaborador do Programa de Pós-graduação em Envelhecimento Humano da Universidade de Passo Fundo - RS, e-mail: [fernandofornari@gmail.com](mailto:fernandofornari@gmail.com).

## **1.5 Duração**

O mestrado terá duração de 24 meses, sendo que o período para o trabalho experimental está previsto de março a julho de 2012.

## **1.6 Vigência**

O início da pesquisa será no mês de março de 2011 e estender-se-á até dezembro de 2012.

## **1.7 Palavras-chave**

Antioxidantes, envelhecimento, infertilidade masculina, qualidade seminal.

## **2 INTRODUÇÃO**

A infertilidade é um problema que afeta homens e mulheres na mesma proporção. De acordo com a Associação Americana para Medicina Reprodutiva (ASMR), 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 espermatozóides, e/ou pouca motilidade destes.

Os recentes achados da comunidade científica discutem com ênfase a relação entre o envelhecimento humano e o estresse oxidativo (GHARAGOZLOO; AITKEN, 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 espermatozóides, 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 espermatozóides 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 espermatozóides, como a capacitação, reação acrossômica e sinalização de processos para garantir a fertilização (BANSAL; BILASPURI, 2010).

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 RD, 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 será avaliar se o uso de antioxidantes (*Spirulina platensis* e resveratrol), podem contribuir na qualidade seminal em homens entre 40 e 70 anos de idade.

### **3 PROBLEMA DA PESQUISA**

Vários estudos estão sendo realizados visando entender o papel das Espécies Reativas de Oxigênio e antioxidantes na função espermática. Um dos fatores mais importantes que contribuem para a baixa qualidade de espermatozóides é o estresse oxidativo, levando a infertilidade masculina.

Tem-se a perspectiva que o uso oral da *Spirulina platensis* e o resveratrol possam melhorar a qualidade espermática em homens adultos e idosos, contribuindo assim para o tratamento da infertilidade masculina e diminuição do estresse oxidativo.

Neste contexto, pergunta-se: o uso da *Spirulina platensis* e antioxidante resveratrol podem contribuir para melhorar a qualidade seminal, auxiliando no tratamento da infertilidade masculina e reduzindo o estresse oxidativo dos espermatozóides?

#### **4 JUSTIFICATIVA**

A gerontologia é a ciência que estuda o processo de envelhecimento em suas dimensões biológicas, psicológicas e sociais. Trata-se de um campo multi e interdisciplinar que visa à descrição e à explicação das mudanças típicas do processo de envelhecimento e de seus determinantes genético-biológicos, psicológicos e socioculturais. Investiga o potencial de desenvolvimento humano associado ao curso de vida e ao processo de envelhecimento. Dentre os diferentes fatores biológicos que podem ser estudados no que diz respeito ao envelhecimento humano, um deles é o processo de envelhecimento do sistema reprodutor masculino. Sabe-se que com o passar dos anos os espermatozoides sofrem alterações genéticas, mas é tem inexistência de dados conclusivos para dizer até que ponto um homem mais idoso pode gerar filhos sem problemas. A partir dos 40 anos, os hormônios masculinos diminuem 1% ao ano, e nesse período de envelhecimento o homem sofre com mudanças fisiológicas e psicológicas. Por volta dos 50 anos, os homens são afetados pela diminuição do tamanho dos testículos e conseqüentemente declínio na produção do hormônio testosterona, que é fundamental para as características sexuais masculinas. Isso é acarretado pelo distúrbio de androgênio do envelhecimento masculino, denominado de andropausa. A partir disto, esta pesquisa objetiva avaliar se a suplementação oral de antioxidantes pode melhorar a capacidade reprodutiva masculina e qualidade seminal. Os indivíduos que apresentam deficiências em seus níveis de antioxidantes apresentam um risco significativo para algumas patologias relacionadas ao envelhecimento, uma delas é na infertilidade. Estudos recentes demonstram que a suplementação com antioxidantes tem sido demonstrado para fornecer qualidade do espermatozoides humano, melhorando assim parâmetros seminais, como por exemplo, a motilidade dos espermatozoides (BANSAL; BILASPURI, 2011). Esta pesquisa poderá contribuir para expandir e aprofundar nossos conhecimentos referente à capacidade reprodutiva masculina, ação antioxidante e o processo de envelhecimento.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito terapêutico da *Spirulina platensis* e do resveratrol em homens adultos com alteração seminal.

### **5.2 Objetivo específico**

Avaliar a qualidade seminal por espermograma antes e depois das terapias com resveratrol e *Spirulina platensis*.

## **6 REVISÃO DE LITERATURA**

### **6.1 Envelhecimento**

O envelhecimento é um fenômeno que tem sido discutido na última década, sobretudo por seu significativo crescimento populacional. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, entre 1950 e 2025, a população brasileira de idosos crescerá 16 vezes, enquanto a população geral sofrerá aumento de cinco vezes (WHO, 2005). As previsões do IBGE são de que no ano de 2020 teremos mais de 30 milhões de idosos na nossa população, o que representará por volta de 13% do total de brasileiros (LARA; SOARES, 2009). Estima-se que o número de pessoas com 60 anos ou mais irá crescer rapidamente nos próximos 50 anos em todo o mundo (SCAZUFCA et al., 2002).

Pesquisadores de diferentes áreas têm mostrado interesse em estudar essa fase da vida (ALMEIDA; LOURENÇO, 2007). Por outro lado, houve uma queda significativa na taxa de fecundidade, e a medicina está se desenvolvendo a respeito ao processo de cura e à prevenção de doenças, a economia crescendo e a alimentação se aprimorando. Estes fatores contribuem para que o número de pessoas idosas no país cresça, aumentando a expectativa de vida do brasileiro.

À medida que envelhecemos, torna-se cada vez mais difícil de serem realizadas algumas tarefas do dia a dia (MARQUES et al., 2010). A sexualidade, um tema difícil entre os jovens, se agrava no caso dos idosos. Nesta fase, isso acaba dificultando a superação de seus problemas. Acredita-se que através do esclarecimento das informações distorcidas em relação à sexualidade poderá contribuir para diminuição de crenças sobre um assunto com muitos preconceitos, já que muitas vezes a sociedade classifica este período da vida como de assexualidade, onde o idoso deve apenas cuidar de seus netos, fazendo trabalhos manuais ou até mesmo vendo televisão (RISMAN, 2005). A partir das últimas décadas, o Brasil se depara com um declínio rápido e acentuado na taxa de fecundidade, se sobressaindo quando comparado com outros países desenvolvidos ou em desenvolvimento. Em todos estes países ocorreu com este declínio queda da mortalidade, levando ao processo de envelhecimento populacional e aumento da longevidade (ALVES et al., 2007). O envelhecimento bem-sucedido passa a ser resultado da interação de fatores multidimensionais, que incluem questões relacionadas à saúde, tanto física quanto mental, independência na vida diária, aqui podem entrar os aspectos relacionado também a sexualidade, aspectos econômicos e psicossociais. Nesse contexto, é preciso procurar por melhores estratégias de planejamento e avaliação de ações, com vistas à melhoria da qualidade de vida do idoso (MARQUES et al., 2010), e conscientizar a importância da sexualidade em qualquer fase da vida, pois esta é uma necessidade básica do ser humano, e deve permanecer até os últimos dias do indivíduo (LARA; SOARES, 2009).

## **6.2 Infertilidade**

A infertilidade pode ser definida como inabilidade de um casal sexualmente ativo de engravidar, sem a utilização de métodos contraceptivos, dentro de um ano. A infertilidade é um fenômeno universal, que atinge aproximadamente 8 a 15% dos casais, independente dos fatores socioeconômicos ou culturais. Trata-se de um problema que afeta homens e mulheres na mesma proporção (PASQUALOTTO, 2007).

De acordo com a Associação Americana para Medicina Reprodutiva (ASMR), define-se como infertilidade a falta de gestação detectada clínica ou hormonalmente

após 12 meses (um ano) de relações sexuais normais sem contracepção. O prazo de 12 meses de relações desprotegidas para definir infertilidade tem como base que 80% dos casais engravidam em um ano de tentativa, e 20% restantes seriam os casais que deveriam ser tratados como inférteis. Segundo a Organização Mundial da Saúde, a infertilidade pode ser classificada em infertilidade primária: casal sem gravidez, com vida sexual regular após dois anos sem contracepção; e infertilidade secundária: casal com gravidez prévia, com ausência de gravidez após dois anos de relações sexuais normais sem contracepção (PETRACCO; BADALLOTTI, 1997). A tendência recente de paternidade tardia levanta preocupações por causa dos efeitos negativos do envelhecimento sobre a fertilidade. Embora sabe-se 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 relacionados à idade na fertilidade masculina continua a ser estabelecido (DESAI et al., 2009).

### 6.2.1 Infertilidade Masculina

Nos últimos anos, vários estudos estão sendo realizados visando entender o papel das espécies reativas de oxigênio (EROS) e antioxidantes na função espermática (MAIA; BICUDO, 2009). As EROS podem ter efeitos benéficos ou prejudiciais as funções espermáticas, dependendo da natureza e da concentração das mesmas, bem como a localização e tempo de exposição ao estresse oxidativo (AGARWAL, 2005; ESTEVES; AGARWAL, 2011). A geração excessiva de EROS pode subjugar o sistema intracelular de defesa antioxidante do espermatozóide, que é fraco, devido escassez de citoplasma, tornando-o susceptível ao estresse oxidativo (MAIA; BICUDO, 2009). Todos os componentes celulares, incluindo lipídios, proteínas, ácidos nucléicos e açúcares são alvos potenciais de estresse oxidativo (BANSAL; BILASPURI, 2011). Os espermatozoides adquirem a capacidade de avançar progressivamente, de fertilizar no trato feminino, através de uma série de alterações fisiológicas chamada de “capacitação”. De acordo com condições fisiológicas, os espermatozoides produzem pequenas quantidades de EROS, que são necessários para a capacitação e reação

acrossomal (AGARWAL, 2005). Os efeitos danosos do estresse oxidativo em espermatozoides estão entre 30% a 80% dos casos de infertilidade masculina. A suplementação oral com antioxidantes pode melhorar a qualidade seminal, reduzindo assim, o estresse oxidativo (SHOWELL et al., 2011).

### **6.3 Análise seminal**

#### **6.3.1 Análise Seminal segundo Organização Mundial da Saúde (OMS) – 2010**

Durante a ejaculação, o sêmen é produzido a partir de uma suspensão concentrada de espermatozoides, armazenados nos epidídimos, misturados, e diluído com as secreções de líquidos dos órgãos sexuais. A comparação dos volumes de sêmen pré e pós-vasectomia, revela que cerca de 90% do volume de sêmen é composto de secreções dos órgãos acessórios, principalmente a próstata e vesícula seminal, com contribuições menores de glândulas bulbouretrais (de Cowper) e epidídimo (WHO, 2010).

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 (MENKVELD; KRUGER, 1997).

Os parâmetros físicos que incluem cor, liquefação, viscosidade e pH da amostra são de simples avaliação e executados sob visão direta. Essas investigações são efetuadas após a liquefação da amostra seminal. Isso pode ser observado checando-se periodicamente o frasco, que é mantido em uma incubadora comum à 37°C, para verificar se a amostra adquiriu consistência e aparência homogêneas (MENKVELD; KRUGER, 1997). A amostra de sêmen normal possui cor branca opalescente, homogênea e se liquefaz a temperatura ambiente em menos de 60 minutos. Aumento da viscosidade ou consistência pode interferir no processo de determinação da concentração dos espermatozoides (FRANCO JUNIOR, 2008).

A Tabela 1 apresenta os parâmetros seminais de acordo com a Organização Mundial da Saúde (2010):

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

### 6.3.2 Volume Seminal

O volume do sêmen é realizado principalmente pelas vesículas seminais e próstata, com uma pequena quantidade de glândulas bulbouretrais e epidídimo. A medida precisa de volume é essencial em qualquer avaliação seminal, porque permite que o número total de espermatozoides possa ser calculado. O volume alterado pode estar relacionado com bloqueio total ou parcial das vesículas seminais, ou até mesmo a ausência de vesículas seminais (WHO, 2010).

### 6.3.3 Concentração Espermática

O número total de espermatozoides por ejaculado e concentração espermática estão relacionados tanto com o tempo de gravidez (SLAMA et al., 2002), quanto com as taxas de gravidez (ZINAMAN et al, 2000), e são preditores de concepção (BONDE et al, 1998; LARSEN et al, 2000). Os dados relativos a concentração espermática têm correlacionado número total de espermatozoides com os resultados reprodutivos. O número de espermatozoides no ejaculado é calculado a partir da concentração de espermatozoides, que é medido durante avaliação do sêmen. A concentração de espermatozoides no sêmen, quando relacionados com taxas de fertilização e gravidez, é influenciado pelo volume da secreção das vesículas seminais e da próstata (WHO, 2010).

#### 6.3.4 Motilidade Espermática

O grau de motilidade progressiva está relacionado à gravidez. A motilidade espermática deve ser avaliada o mais rapidamente possível após a liquefação da amostra, preferencialmente em 30 minutos após a ejaculação, para limitar os efeitos deletérios da desidratação, pH ou alterações de temperatura sobre a motilidade (WHO, 2010). Para realizar o método manual, uma pequena gota de sêmen é colocada em uma lâmina limpa pré-aquecida e coberta com uma lamínula. A gota deve preencher completamente a área abaixo da lamínula, sem borda vazia e sem flutuação do espécime. Cerca de 10 campos de 400 aumentos são examinados e a motilidade é expressa como percentual de espermatozoides móveis (MENKEVELD; KRUGER, 1997).

A estimativa e a relevância da estimativa da duração da motilidade ainda são aspectos controversos. Porém, se sabe que podem ser encontrados espermatozoides móveis em amostra de sêmen, após 24 horas da coleta, à temperatura ambiente (MENKVELD; KRUGER, 1997).

#### 6.3.5 Vitalidade

A vitalidade é realizada para avaliação da integridade da membrana celular. Este teste pode fornecer um controle sobre a avaliação da motilidade, uma vez que a porcentagem de células mortas não deve exceder (dentro do erro de amostragem) a porcentagem de espermatozoides imóveis. Normalmente, o percentual de células viáveis é superior ao de células móveis. A porcentagem de espermatozoides vivos é avaliada, identificando aqueles com membrana celular intacta, através de corante. Este método é baseado no princípio de dano à membrana através de corante. Os espermatozoides corados são considerados os espermatozoides não vitais (mortos), pois apresentam membranas lesadas que permitem a penetração de corantes. A vitalidade espermática deve ser realizada o mais rápido possível após liquefação seminal, para evitar observação dos efeitos deletérios da desidratação ou mudanças de temperatura sobre a vitalidade (WHO, 2010).



### 6.3.6 Morfologia Espermática

De acordo com Kruger e colaboradores (1997), a maneira mais efetiva de avaliar a morfologia espermática ficou conhecida como morfologia estrita ou critério de Kruger. O espermatozóide normal deve ter uma única cabeça, com acrossomo definido – compreendendo entre 40 e 70% da área da cabeça – e com forma oval perfeitamente lisa, ou aquela que afina levemente ao nível da região pós-acrossômica. A cabeça deve ter de 4 a 5  $\mu\text{m}$  ou 5 a 6  $\mu\text{m}$  de comprimento, e 2,5 a 4  $\mu\text{m}$  ou 2,5 a 3,5  $\mu\text{m}$  de largura. Nenhuma anormalidade no pescoço, peça intermediária ou cauda devem estar presentes. A peça intermediária deve ser delgada, presa axialmente, com menos de 1  $\mu\text{m}$  de largura, e seu comprimento deve ser de aproximadamente 1,5 vezes o comprimento da cabeça. O citoplasma não deve ser maior do que a metade da área da cabeça do espermatozóide. A cauda deve ser uniforme, discretamente mais fina que a peça intermediária, não enrolada e com aproximadamente 4,5  $\mu\text{m}$  de comprimento (KRUGER et al., 1997).

A cabeça deve apresentar configuração oval lisa, simétrica, acrossoma bem definido ocupando 40 - 70% da parte apical, comprimento  $4.75 \pm 0.28 \mu\text{m}$  e largura  $3.28 \pm 0.20 \mu\text{m}$ ; peça intermediária deve ser estreita, única, ligada axialmente a cabeça, largura  $\leq 1 \mu\text{m}$  e comprimento de 7.0 - 8.0  $\mu\text{m}$ ; cauda uniforme, ligeiramente mais estreita na zona média, não espiralada, sem resíduos, diâmetro 0.4 - 0.5  $\mu\text{m}$  e comprimento de 50  $\mu\text{m}$ . (LUCHESE, 2008).

## 6.4 Radicais livres e estresse oxidativo

As camadas eletrônicas de um elemento químico são denominadas K, L, M e N, e seus subníveis, s, p, d, f. O termo radical livre refere-se a átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas. Os radicais livres são formados em um cenário de reações de oxidação-redução, isto é, cede o elétron solitário oxidando-se, ou recebe

outro se reduzindo. Portanto, os radicais livres ou provocam ou resultam dessas reações de óxido-redução (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os fatores ambientais, fisiológicos e genéticos têm sido implicado nas funções do espermatozóide e infertilidade. Um dos fatores mais importantes que contribuem para espermatozóides de má qualidade é o estresse oxidativo. O estresse oxidativo é uma condição associada com o aumento da taxa de dano celular induzido por oxigênio e derivados oxidantes comumente conhecido como EROS, que estão presentes em todas as células biológicas. Entre as várias causas, o estresse oxidativo afeta a fertilidade e a fisiologia das células espermáticas. O termo estresse oxidativo é geralmente aplicado quando oxidantes superam os antioxidantes. O desequilíbrio entre a produção de EROS contribui para um dano que é conhecido como estresse oxidativo. Os principais aspectos destrutivos do estresse oxidativo são a produção de EROS, que incluem radicais livres e peróxidos (BANSAL; BILASPURI, 2011).

Em condições de normalidade do metabolismo celular aeróbico, o oxigênio molecular ( $O_2$ ) sofre redução tetravalente (aceitação de quatro elétrons), resultando na formação de  $H_2O$  (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; MAIA; BICUDO, 2009). Durante esse processo são formados intermediários reativos: radicais superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ) e hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), e o não radical peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (MAIA; BICUDO, 2009).

O ânion superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) é um radical livre, formado a partir do oxigênio molecular, através da adição de um elétron. É gerado de forma espontânea, na mitocôndria, através da cadeia respiratória. É um radical pouco reativo e não tem a habilidade de penetrar nas membranas lipídicas, agindo apenas no compartimento onde é produzido (MAIA; BICUDO, 2009).

O radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) é o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, pois capaz de causar mais danos do que qualquer outra Espécie Reativa de Oxigênio. Este é formado a partir do peróxido de hidrogênio, em uma reação catalisada por íons metais ( $Fe^{++}$  ou  $Cu^+$ ), denominada reação de Fenton, que reage rapidamente com

biomoléculas e pode desencadear a peroxidação dos lipídios nas membranas celulares (MAIA; BICUDO, 2009).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) não é um radical livre, mas sim um metabólito do oxigênio extremamente deletério, participando como intermediário na reação que produz o radical  $OH^\bullet$ . É gerado a partir da dismutação enzimática do  $O_2^-$  pela superóxido dismutase, tem vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A célula espermática é capaz de gerar e degradar EROS, as quais, em pequenas quantidades, são necessárias para o funcionamento normal da célula (MAIA; BICUDO, 2009). Porém, quando em grandes quantidades, é um dos fatores que contribui para a baixa qualidade seminal, causando estresse oxidativo. O estresse oxidativo é uma condição associada com o aumento da taxa de dano celular induzido pelo oxigênio e oxidantes derivados do oxigênio comumente conhecida como a produção de EROS descontrolada, que ultrapassa o antioxidante do plasma seminal e leva ao estresse oxidativo, que é prejudicial aos espermatozóides, e quando em excesso no organismo causam doenças como: envelhecimento e infertilidade (BANSAL; BILASPURI, 2011). Na atualidade, é possível utilizar terapia com antioxidante para casais inférteis, visando maximizar os resultados de fertilização (INFERT, 2011).

Os radicais livres também são conhecidos como uma condição necessária para a sinalização intracelular envolvida no processo normal da proliferação celular, diferenciação e migração. No trato reprodutivo, os radicais livres também desempenham duplo papel e podem modular várias funções de reprodução. O excesso de geração de radicais livres envolve um erro na liberação de espermatozóides durante a espermiogênese (BANSAL; BILASPURI, 2011). Os espermatozóides são células altamente susceptíveis aos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio, podendo sofrer peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados de suas membranas, com conseqüente alteração de suas funções (AGARWAL, 2005; INFERT, 2011). Além disso, as baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu citoplasma reduzido contribuem para torná-los vulneráveis (SHARMA; AGARWAL, 1996). Para neutralizar os efeitos das EROS, os espermatozóides sintetizam antioxidantes. Os espermatozóides possuem uma quantidade baixa do sistema celular de EROS de defesa que consiste de

catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e vitamina E (SHEWEITA et al., 2005).

## **6.5 Antioxidantes**

Os antioxidantes são agentes que quebram a reação oxidativa, reduzindo o estresse oxidativo. Os espermatozoides são protegidos por vários antioxidantes e enzimas antioxidantes no plasma seminal. O uso de antioxidante auxilia na redução do estresse oxidativo, melhorando a motilidade dos espermatozoides, sendo útil no tratamento da infertilidade masculina (BANSAL; BILASPURI, 2011). O uso de antioxidantes tem como efeito estacionário das espécies reativas de oxigênio no plasma seminal (AGARWAL, 2005). Nos sistemas aeróbicos, é essencial esse equilíbrio entre a quantidade de EROS e a quantidade removida pelo sistema antioxidante. Em condições normais, o sistema de defesa antioxidante é capaz de promover eficiente eliminação dos radicais livres produzidos pelo metabolismo basal e, por consequência, proteger contra as lesões oxidativas desencadeadas pelos radicais livres (DRÖGE, 2002; BANSAL; BILASPURI, 2011). Melhorar o dano celular ocorre quando este equilíbrio é perturbado, levando ao estresse oxidativo, quando a defesa celular não consegue eliminar excesso de EROS produzido (MAIA; BICUDO, 2009).

### **6.5.1 Resveratrol**

O resveratrol é uma fitoalexina polifenólica encontrada nas uvas e no vinho tinto, é um dos produtos naturais extensivamente estudados, com atividades biológicas como cardio-protetor, neuro-protetor, anti-envelhecimento e anti-câncer. A maioria dos efeitos desses estilbenos é atribuída a sua propriedade antioxidante (PANDEY; RIZVI, 2010).

Embora os vinhos tintos sejam geralmente reconhecidos como fonte de resveratrol, o conteúdo real de resveratrol é muito baixa e varia em relação a variedade da uva. Estudos determinaram que o resveratrol presente no vinho tinto possui inúmeros

benefícios à saúde, a maioria das suas propriedades são associadas com sua capacidade de exercer ação anti-inflamatória e limpeza de espécies reativas de oxigênio (DIPAK et al., 2011).

Recentemente, uma série de estudos tem descritos o resveratrol como um composto anti-envelhecimento. Os primeiros estudos vieram da Faculdade de Medicina e Laboratório de Biomoléculas de Harvard, que relatou em uma descoberta revolucionária que resveratrol poderia ativar o gene SIRT1 do anti-envelhecimento. Baseado no estudo de animais, os autores observaram que, dependendo da concentração de resveratrol presente no vinho tinto, uma pessoa precisa consumir várias garrafas de vinho tinto por dia para obter tal dose ideal de resveratrol. Estudos posteriores mostraram que o resveratrol em uma dose muito pequena poderia ativar não somente a Sirt1, mas também a Sirt 3 e Sirt 4, que são as proteínas relacionadas com a longevidade (DIPAK et al., 2011).

O uso do resveratrol está associado com muitos benefícios à saúde, principalmente a inativação de doenças. Foi relatado em recente estudo, que a adição de resveratrol antes do processo de congelamento de sêmen foi capaz de evitar danos oxidativos ao esperma, tanto em homens férteis quanto homens inférteis, mostrando, pela primeira vez que este antioxidante pode ser útil no congelamento de sêmen humano. Isto se deve ao grande potencial de limpeza de EROS que o resveratrol proporciona. Os polifenóis são facilmente incorporados na membrana lipídica, inibindo a formação de radicais lipídicos e mantendo a integridade da membrana e equilíbrio iônico da célula (GARCEZ, et al., 2010).

Alguns estudos relatam evidências crescentes de que o resveratrol pode prevenir ou retardar o aparecimento de câncer, doença cardíaca, lesões de isquemia e quimicamente induzido, diabetes, inflamação patológica e infecção viral. Estes efeitos são observados, apesar de biodisponibilidade extremamente baixa e rápida depuração da circulação no organismo. A administração via oral de resveratrol recomendada por dia a um ser humano é de 50 a 100mg, apesar de ainda estar em estudo a dose diária ideal (BAUR; SINCLAIR, 2006).

### 6.5.2 *Spirulina platensis*

A *Spirulina platensis* é uma micro-alga pertencente a grupo de cianobactérias (*Arthrospira*). Desde a pré-história, a *Spirulina* tem sido utilizada como fonte alimentar em algumas culturas. Mais recentemente, é usada como suplemento nutricional em todo o mundo, com relatos de seus efeitos benéficos na prevenção de doenças (OROPEZA et. al., 2009; DENG; CHOW, 2010; CHU et. al, 2010).

A partir de 1980, grandes investigações são realizadas voltadas para o desenvolvimento de alimentos funcionais e bebidas para prevenir ou tratar várias doenças. A *Spirulina platensis* se tornou um dos alimentos nutracêuticos com diversos efeitos benéficos sobre uma variedade de doenças (DENG; CHOW, 2010; CHU et al., 2010). O consumo da *Spirulina platensis* promove benefícios para a saúde humana, já que em sua composição química possui 65% de proteína, e possui uma rede de proteínas completas, por acrescentar todos os aminoácidos essenciais. Além disso, é fonte de vitaminas A, E, K, B1, B2, B3, B6, B12, ácido pantotênico e alguns minerais como ferro, manganês, cromo, selênio, cobre e zinco. Também contém muitas enzimas, uma delas é a SOD que possui uma atividade de que varia de 10.000 a 37.500 unidades a cada 10 gramas de *Spirulina* (HENRIKSON, 1994). No Brasil, sua comercialização é permitida pela ANVISA, desde que o produto final, no qual o microorganismo tenha sido adicionado, esteja devidamente registrado (BRASIL, 2008).

Estudos clínicos mostraram que a dosagem de *Spirulina* entre 1 a 4,5g em homens mais velhos teve efeito significativo após 3 meses de tratamento, onde o efeito hipolipidêmico da *Spirulina* foi demonstrado também em pacientes com doença cardíaca isquêmica hipercolesterolêmicos (DENG; CHOW, 2010).

A *Spirulina platensis* possui vários antioxidantes, a ficocianina (CHU et al., 2010), que apresenta alto potencial antioxidante, aumentando a atividade de algumas enzimas como a glutathione peroxidase e a glutathione reductase, pode-se sugerir que ela seja empregada em algumas doenças causadas ou agravadas pelas EROS (BERMEJO-BESCÓS; PIÑERO-ESTRADA; VILLAR DEL FRESNO, 2008), como o caso da infertilidade masculina. Estudos mostram que a *Spirulina* tem um grande efeito protetor contra apoptose celular causado por radicais livres. Ainda tem-se muito a explorar sobre

potencial de aplicação da *Spirulina*, principalmente a sua capacidade antioxidante em humanos (CHU et al., 2010).

## **7 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **7.1 Delineamento**

Ensaio clínico randomizado cego.

#### **7.1.1 Período e locais do estudo**

O período de coleta de dados para avaliação, bem como o experimento, ocorrerá entre janeiro de 2012 a dezembro de 2012 no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos do Curso de Engenharia de Alimentos da UPF e na Genesis Centro de Reprodução Humana de Passo Fundo.

#### **7.1.2 Protocolo do estudo**

Esta pesquisa será realizada em 2 grupos: *Spirulina platensis* (Sp) e Resveratrol (R).

O grupo *Spirulina platensis* (Sp) será composto por 25 homens entre 40 a 60 anos de idade, e o grupo Resveratrol (R) será composto por 25 homens entre 40 a 60 anos de idade. Totalizando 50 homens estudados. Para as análises: no grupo *Spirulina platensis* (Sp), 25 homens serão submetidos à terapia com 4g de *Spirulina platensis* em cápsulas durante 3 meses (90 dias). No grupo resveratrol (R), 25 homens serão submetidos à terapia com 500 mg de Resveratrol em cápsulas durante 3 meses (90 dias).

As amostras destes grupos serão submetidas à análise de Espermograma. Após três meses (90 dias) de terapia com *Spirulina platensis* (4g) e resveratrol (500mg), as

análises serão efetuadas novamente, comparando os resultados entre as análises (inicial e posterior à terapia).

### 7.1.3 Descrição dos tratamentos

A Tabela 2 abaixo apresenta a descrição dos tratamentos experimentais.

<b>Tratamentos experimentais</b>	<b>Sigla dos tratamentos</b>	<b>Características dos tratamentos</b>
<i>Spirulina platensis</i> Resveratrol	<i>Sp</i> <b>R</b>	Cápsulas oral de <i>Sp</i> Cápsulas oral de <b>R</b>

### 7.1.4 Tratamento dos grupos experimentais

#### 7.1.4.1 *Spirulina platensis* (*Sp*)

O grupo *Spirulina platensis* será submetido à terapia oral com cápsulas de *Spirulina platensis* na dose diária de 4 g. Sendo para tal necessária a ingestão de 6 (seis) cápsulas diárias.

#### 7.1.4.2 *Resveratrol* (*R*)

O grupo resveratrol será submetido à terapia oral com cápsulas de resveratrol na dose diária de 500 mg. Sendo para tal necessária a ingestão de 1 (uma) cápsula diária.



## 7.1.5 Seleção dos pacientes

### 7.1.5.1 Critérios de Inclusão

Homens entre 40 e 60 anos de idade que apresentem sub-infertilidade, caracterizada por espermograma anormal, ou espermograma normal, de acordo com a OMS 2010.

### 7.1.5.2 Critérios de exclusão

Serão: (1) homens entre 40 e 60 anos de idade que apresentem espermograma normal e (2) não concordância em participar da pesquisa.

### 7.1.5.3 Processamento de material para análise

#### 7.1.5.3.1 Análise Seminal

As amostras seminais devem ser coletadas por masturbação em uma sala do laboratório (equipada para isso). Esse método tem a vantagem de ter sob controle as condições de meio ambiente, e também a maneira como a amostra foi coletada. 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. (MENKVELD; KRUGER, 1997). O período de abstinência sexual pode ter efeito significativo na concentração e no volume seminal. Por isso, é importante que um determinado período de abstinência seja estabelecido, de tal maneira que a análise seminal seja efetuada de acordo com as condições padronizadas e não ocorram diferenças entre os parâmetros estabelecidos. O período de abstinência ideal para obter melhores parâmetros seminais é entre três e cinco dias. (MENKVELD; KRUGER, 1997).

#### *7.1.5.3.1.1 Liquefação*

A análise da liquefação será realizada de acordo com o manual da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010).

Após alguns minutos da ejaculação, o material coletado à temperatura ambiente, começa a liquefazer, ficando mais fino. Este processo de liquefação será analisado dentro de 15 minutos, ou seja, em 15 minutos a amostra deve estar totalmente liquefeita (mais líquida). Se a liquefação não ocorrer no prazo de 60 minutos, a amostra será anormal.

#### *7.1.5.3.1.2 Viscosidade*

A análise da viscosidade será realizada de acordo com o manual da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010).

Após a liquefação, a viscosidade da amostra será estimada aspirando, suavemente, com auxílio de uma pipeta, permitindo que o sêmen caia por gravidade, e observando o comprimento do fio formado, que deve ter até 2 cm de comprimento.

#### *7.1.5.3.1.3 Aparência*

A análise da aparência seminal será realizada de acordo com o manual da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010).

A aparência será avaliada visualmente, onde a aparência é normal de cor opalescente.

#### *7.1.5.3.1.4 Volume*

A análise do volume seminal será realizada de acordo com o manual da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010).

O volume do sêmen é realizada principalmente pelas vesículas seminais e próstata, com uma pequena quantidade de glândulas bulbouretrais e epidídimo. A medida do volume será realizado com auxílio de uma pipeta descartável ou de vidro.

#### *7.1.5.3.1.5 pH*

A análise do pH será realizado de acordo com o manual da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010).

O pH seminal será medido após liquefação em tempo uniforme, de preferência após 30 minutos da coleta, uma vez que é influenciada pela perda de CO<sub>2</sub> que ocorre após a produção. Após, misturar bem a amostra seminal, espalhar uma gota de sêmen uniformemente sobre a fita de pH. Passados os segundos, é realizada a comparação da cor com a tira de calibração para determinar o pH (este deve ser inferior a 7,2).

#### *7.1.5.3.1.6 Concentração e Motilidade*

A análise da concentração e motilidade dos espermatozóides serão realizadas de acordo com o manual da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010).

A concentração será realizada com auxílio de microscópio óptico, com objetiva de 20x e uma magnificação de 200x. Para tal, será homogeneizado bem a amostra de sêmen, retirando-se uma alíquota de sêmen (5µL). Esta amostra coloca-se na câmara de Makler, e então acrescenta-se a laminula redonda, o que permite a obtenção de uma espessura constante do esperma de 10mm. Levar ao microscópio com objetiva de 20x. Focalizar o retículo com os espermatozóides e constar as cabeças dos mesmos em 10 quadradinhos (dos 100 do retículo). A seguir, adicionar seis zeros ao número de espermatozóides contados nos 10 quadradinhos. Este processo poderá ser repetido umas ou duas vezes e fazer a média no final.

Para análise da motilidade, será realizado imediatamente após contagem de espermatozóides (concentração). Caso seja necessário, será colocado a amostra na incubadora à 37 °C por 10 minutos para permitir que a temperatura se estabilize. Será

examinado no microscópio óptico em contraste de fase de 200 a 400 vezes de ampliação. Serão escolhidos campos aleatórios da lâmina, avaliando a motilidade dos espermatozóides. Com auxílio de um contador celular, será realizada a contagem espermática avaliando a motilidade, expressa em porcentagem de espermatozóides móveis. Serão classificados: grau A (motilidade progressiva rápida), grau B (motilidade progressiva lenta), grau C (motilidade não-progressiva) e grau D (imobilidade).

#### *7.1.5.3.1.7 Vitalidade*

A análise da vitalidade espermática será realizada de acordo com o manual da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010).

Será utilizado o teste da eosina Y, que é um teste muito utilizado para análise da vitalidade qualificada. Para preparação dos reagentes: NaCl 0,9%, dissolvendo 0,9g de NaCl em 100ml de água purificada; eosina Y 0,5%, dissolver 0,5g de eosina Y em 100ml de 0,9% NaCl. Procedimentos da análise: Misturar bem a amostra de sêmen; retirar uma alíquota de 5 µL de sêmen e combinar com 5 µL de solução de eosina em uma lâmina de microscópio, misturar com uma ponteira; cobrir com lamínula e deixar por 30 segundos; analisar em microscópio óptico com contraste de fase de 200 a 400 vezes, as cabeças dos espermatozóides (coloridas de rosa); contar número de espermatozóides corados (mortos) e não corados (vital) com contador de células; avaliar 200 espermatozóides em cada lâmina, a fim de alcançar uma forma aceitável de baixa porcentagem de erro; calcular a média de espermatozóides vivos e mortos. O resultado final é expresso em porcentagem.

#### *7.1.5.3.1.8 Morfologia Espermática*

A análise da morfologia espermática será realizada de acordo com o manual da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010).

Após liquefação total do sêmen, será homogeneizado o sêmen com movimentos contínuos de leve rotação do frasco durante alguns minutos. Retirado uma pequena

quantidade desse material liquefeito sob a forma de uma pequena gota de esperma. O material é o colocado na extremidade de uma lâmina histológica limpa. A seguir, uma distensão é feita de forma semelhante à executada para estudo citológico do sangue, em película fina. O material distendido é seco durante dois a cinco minutos. A fixação do material será realizada com kit de coloração de Leishman. A solução de Leishman-estoque contém 2g de corante em pó para um litro de álcool metílico (solução 2/1.000). Para a preparação da solução de uso imediato será 100 ml da solução Leishman-estoque (2/1.000); 100 ml de água de pH 8 (em 300ml de água destilada, colocar seis gotas de hidróxido de sódio a 10%) e 100 ml de álcool metílico. Após, cobrir a lâmina com solução Leishman-estoque e deixar o corante agir aproximadamente 15 minutos. A seguir o corante será escorrido, e seu excesso retirado com algumas gotas de álcool metílico em uma lavagem rápida; depois, com muito cuidado lava-se delicadamente a lâmina em água corrente. A coloração final será azulada forte. Deixa-se secar, e estará pronta para análise em microscópio na objetiva de imersão com óleo antidissapador de fluorescência de alta qualidade (1000x).

## **8 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O resultado de todas as variáveis será avaliado para a realização da análise estatística. Para tal, realizar-se-á análise de variância para comparação múltipla entre os grupos (ANOVA) seguida do Teste de Tukey. Os valores serão considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

### **8.1 Questões Éticas**

Todos os procedimentos serão adequados às normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo e será realizado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

## **9 DIFUSÃO DO CONHECIMENTO GERADO**

Os resultados da pesquisa serão apresentados em encontros científicos, e publicados em periódicos.



## 11 ORÇAMENTO

<b>Material permanente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Custo</b>
Notebook	01	R\$ 2.000,00
Impressora	01	R\$ 400,00
TOTAL		R\$ 2.400,00

<i>Material de Consumo</i>	<i>Quantidade</i>	<b>Custo</b>
Folhas A4	500	R\$ 10,00
Tinta impressão	01	R\$ 50,00
Câmara de Makler	01	R\$ 2.000,00
Frascos de coleta seminal	200	R\$ 600,00
Tiras de pH	01 caixa	R\$ 500,00
Kits Enzimatico SOD RANDOX	02	R\$ 400,00
Luvas de procedimentos	01 caixa	R\$ 3.000,00
TOTAL		R\$ 6560,00

### CONTRAPARTIDA DO LABORATÓRIO\*

- Microscópio
- Reagentes
- Câmara de Makler
  
- Despesas com transportes dos sujeitos de pesquisa

\* Recursos sem custo para o autor da presente pesquisa.



## 12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A. Role of oxidative stress in male infertility and antioxidant supplementation. *Business Briefing; Uskidney and Urological Disease*, n. 7, p. 122-129, set. 2005.

ALMEIDA, T.; LOURENCO, M. L. Envelhecimento, amor e sexualidade: utopia ou realidade. *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.*, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, jan. 2007 .

ALVES L.C. et al. A influência das doenças crônicas na capacidade funcional dos idosos do Município de São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v. 23, n. 8, ago, 2007.

AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 29, n. 2, 2008.

AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. *Super-ICSI: Nova pesquisa confirma bons resultados*, v. 88, set. 2007.

BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. Impacts of Oxidative stress an antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*, n. 7, p. 1-7, set. 2011.

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D.A.; Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nature Reviews*, v. 5, p. 493-506, jun. 2006.

BERMEJO-BESCÓS, P.; PIÑERO-ESTRADA, E.; VILLAR DEL FRESNO, A.M. Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicology in Vitro*, v. 22, n. 6, p. 1496-1502, mai. 2008.

BONDE JP et al. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet*. v.352, n.10, p. 1172-1177, out. 1998.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide. *Biochem. J.* v. 134, n.3, p. 707-716, jul.1973.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. VII Lista dos novos ingredientes aprovados – Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos\\_ingredientes.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_ingredientes.htm)> 2008.

CHU, W.L.; LIM, Y.W.; RADHAKRISHNAN, A.K.; LIM, P.H.E. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 10, n. 126, p. 1-8, 2010.

DESAI, N. et al. Free radical theory of aging: implications in male fertility. *Urology*, v. 75, n.1, p. 9-14, jul. 2010.

DIPAK, K.; SUBHENDU M.; DIPTARKA R. Erratum to: Resveratrol and red wine, healthy heart and longevity. *Heart Fail Rev*, v.4, n. 16, p. 425-435, jul. 2011.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Review*, Washington, v. 82, p. 47-95, 2002.

EL-AGAMY, D.S. Comparative effects of curcumin and resveratrol on aXatoxin B1-induced liver injury in rats. *Arch Toxicol*, v. 84, n. 5, p. 389-396, jan. 2010.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 407-421, 1990.

ESTEVEZ, S.C.; AGARWAL, A. Novel concepts in male infertility. *International Brazil Journal Urology*, v. 37, n. 1, p. 5-15, jan./fev. 2011.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista Ass. Medica do Brasil*, n.1, v. 43, p. 61-68, ja./mar.1997.

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.

HENRIKSON, R. Microalga Spirulina: superalimento del futuro. Barcelona: Ediciones Urano S.A., 1994.

INFERT Instituto Fertilclínica de Reprodução Assistida. Avaliação do tratamento do stress oxidativo masculino. Disponível em <<http://www.infert.com.br/conteudo/tecnologias/avaliacao-tratamento-stress-oxidativo-masculino>>. Acesso em: mar. 2011.

JUNIOR, F. *Conheça o Super-ICSI*. CENTRO DE REPRODUÇÃO HUMANA. Disponível em <<http://www.crh.com.br/default.asp>>. Acesso em: 10 abr. 2008

JUNQUEIRA, V. B. et al. Aging and oxidative stress. *Mol. Aspects Med.*, n.1, p. 5-16, 2004.

KHAN, Z.; BHADOURIA, P.; BISEN, P.S.; Nutritional and therapeutic potential of Spirulina. *Curr Pharm Bioyechmol*, v.5, n. 6, p. 373-379, out. 2005.

KRUGER, T. F. et al. Avaliação Preditiva do Potencial Fertilizante do Espermatozóide. In: BADALOTTI, Mariangela; TELÖKEN, Claudio; PETRACCO, Alvaro (Org.). *Fertilidade e Infertilidade Humana*. Porto Alegre: Medsi, 1997. p. 452-453.

LARA, M. A.; SOARES, F. A. Envelhecimento humano e atividade sexual. *Revista Digital*, Buenos Aires, v. 14, n. 135, 2009. Disponível em <<http://www.efdeportes.com/efd135/envelhecimento-humano-e-atividade-sexual.htm>>. Acesso em: mar. 2011.

LARSEN L et al. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Human Reproduction*. v.15, n. 7, p.1562-1567, mai. 2000.

LUCHESE, Ana Lúcia Mauri. Super-ICSI. *Centro de Reprodução Humana Prof. Franco Junior*. 2008.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.33, n. 4, p. 183-193, out./dez. 2009.

MAEHLY, Y.A.C.; CHANCE, B. The assay of catalases and peroxidases. *Methods Biochem Anal*, n. 1, p. 357-424, out. 1954.

MARKLUND, S. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. Boca Raton, CRC Press. p. 243-247, 1985.

MARQUES M. et al. Capacidade Funcional: estudo prospectivo em idosos residentes em uma instituição de longa permanência. *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.*, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, Aug. 2010.

MENKEVELD, R.; KRUGER, T. Análise Seminal Básica. In: BADALOTTI, Mariangela; TELÖKEN, Claudio; PETRACCO, Alvaro (Org.). *Fertilidade e Infertilidade Humana*. Porto Alegre: Medsi, 1997. p. 417-423.

OHKAWA, H. et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 95, n. 2, p. 351-358, jun. 1979.

OROPEZA, M.A.J. et al. Effects of dietary *Spirulina* on vascular reactivity. *Journal of Medicinal Food*, v. 1, n.12, p. 15-20, fev. 2009.

PANDEY, Kanti Bhooshan; RIZVI, Syed Ibrahim. Resveratrol may protect plasma proteins from oxidation under conditions of oxidative stress in vitro. *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo, v. 21, n. 5, p. 495-501, mar. 2010.

PASQUALOTTO, Fábio Firmbach. Investigação e reprodução assistida no tratamento da infertilidade masculina. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 29, n. 2, Rio de Janeiro, fev. 2007.

PETRACCO, A. et al. In: BADALOTTI, Mariangela; TELÖKEN, Claudio; PETRACCO, Alvaro (Org.). *Fertilidade e Infertilidade Humana*. Porto Alegre: Medsi, 1997. p. 4-5.

RISMAN, Arnaldo. Sexualidade e Terceira Idade: uma visão histórico-cultural. *Textos Envelhecimento*, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, 2005.

SHARMA RK, AGARWAL A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, v. 48, p. 835-850, 1996.

SHEWEITA, Salah. A; TILMISANY Abdulkarim, M; AL-SAWAF, Hussein. Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Departament of Clinical Biochemistry*, v. 6, n.5, Madinah, out. 2005.

SHOWEL, M.G. et al. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 19, n.1, jan. 2011.

SLAMA R. et al. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Human Reproduction*. v. 17, n. 2, p. 503-515, fev. 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Envelhecimento Ativo: uma política de saúde. Brasília (DF): Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory manual for examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 5th ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 2010.

ZINAMAN M.J. et al. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *Journal of Andrology*, v.21, n. 1, p. Jan./fev.:145-153, 2000.

Apêndice C. Questionário aplicado antes da coleta biológica

## QUESTIONÁRIO

- 1) Idade: \_\_\_\_\_
- 2) Etnia: \_\_\_\_\_
- 3) Peso: \_\_\_\_\_
- 4) Fumante? ( ) sim ( ) não
- 5) Pratica atividade física? ( ) sim ( ) não
- 6) Quantas vezes por semana? ( ) 1, ( ) 2, ( ) 3 ou mais
- 7) Consome bebidas alcoólicas? ( ) sim ( ) não
- 8) Qual a frequência de bebida alcoólica?  
( ) 1x por semana, ( ) 2x semana, ( ) 3x ou mais
- 9) Possui filhos? ( ) sim ( ) não
- 10) Já realizou Fertilização *in vitro*? ( ) sim ( ) não
- 11) Esta tomando algum medicamento controlado? ( ) sim ( ) não  
Qual: \_\_\_\_\_

