

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EFEITO DO RESVERATROL E DO ÁCIDO ASCÓRBICO NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO

Márcia Esteves Silva Garcez

CAXIAS DO SUL
2011

MÁRCIA ESTEVES SILVA GARCEZ

**EFEITO DO RESVERATROL E DO ÁCIDO ASCÓRBICO NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia

Orientadora: Prof^ª Dr^a Mirian Salvador

Co-orientadores: Prof. Dr. Bernardo Erdtmann e Prof. Dr. Fábio Pasqualotto

**Caxias do Sul
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

G215e Garcez, Márcia Esteves Silva, 1970-

Efeito do resveratrol e do ácido ascórbico na criopreservação de
sêmen humano / Márcia Esteves Silva Garcez. - 2011.
xvii, 64 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, 2011.

Apresenta bibliografia.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Mirian Salvador; co-orientação: Prof. Dr.
Bernardo Erdtmann e Prof. Dr. Fábio Pasqualotto.

1. Sêmen - Criopreservação. 2. Resveratrol. 3. Ácido ascórbico.
I. Título.

CDU 2.ed.: 612.616:57.086.13

Índice para o catálogo sistemático:

- | | |
|----------------------------|-------------------|
| 1. Sêmen – Criopreservação | 612.616:57.086.13 |
| 2. Resveratrol | 547.565 |
| 3. Ácido ascórbico | 577.164.2 |

Catalogação na fonte elaborada pela Bibliotecária
Márcia Carvalho Rodrigues – CRB 10/1411

MÁRCIA ESTEVES SILVA GARCEZ

Efeito do resveratrol e do ácido ascórbico na criopreservação de sêmen humano

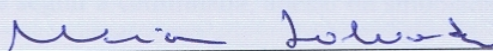
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mirian Salvador

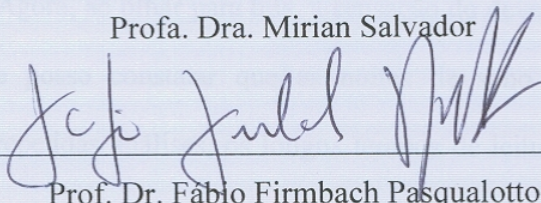
Co-orientadores: Prof. Dr. Bernardo Erdtmann

Prof. Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto

TESE APROVADA EM 16 DE DEZEMBRO DE 2011.

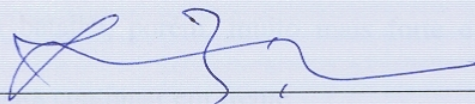


Profa. Dra. Mirian Salvador

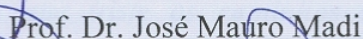


Prof. Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto

Prof. Dr. Bernardo Erdtmann



Profa. Dra. Temenouga Nikolova Guecheva



Profa. Dra. Suelen Osmarina Paesi

DURANTE ESTE TRABALHO...

As dificuldades não foram poucas...

Os desafios foram muitos...

Os obstáculos, muitas vezes, pareciam intransponíveis.

Muitas vezes me senti só, e, assim, o estive...

O desânimo quis contagiar, porém, a tenacidade foi mais forte,
fazendo-me seguir a caminhada, apesar da sinuosidade do caminho.

Agora, ao olhar para trás, a sensação do dever cumprido se faz presente e posso constatar que as noites de sono perdidas, o cansaço das repetidas análises, os longos tempos de leitura, digitação, discussão; a ansiedade em querer fazer e a angústia de muitas vezes não o conseguir, não foram em vão.

Aqui estou hoje, apesar de todos os percalços, como sobrevivente de uma longa batalha, porém, muito mais forte e hábil, com coragem suficiente para continuar em frente.

Como dizia *Mário Quintana*:

"Se as coisas são inatingíveis, isso não é motivo para não querê-las... que triste os caminhos sem a mágica presença das estrelas."

Dedicatória

*Ao meu companheiro de vida,
meu marido, João Luís,
Por todo o amor, superproteção,
Compreensão, companheirismo e ensinamentos...
Que me fizeram crescer e amadurecer.
E que assim me transformou em alguém de palavra.
Obrigado por me ensinar sobre a Verdade.
Obrigado por me amar desse tanto.
Obrigado por ser quem é.*

*Aos meus filhos José Antônio e Luís.
Meu coração está preso a vocês
Por uma corrente com elos tão fortes
Que jamais serão rompidos.
Seus exemplos de vida me estimularam
A buscar os meus objetivos
E nunca desistir.*

Amo vocês!

Agradecimentos

À Deus que me iluminou e me deu forças, que me ajudou a não desistir diante das barreiras, que me fez ser o que sou e chegar aonde eu cheguei. Obrigada, senhor pela possibilidade infinita de crescimento, que se manifesta a cada instante em minha vida.

À Prof^a. Dra. Mirian Salvador, minha orientadora, uma educadora no sentido da palavra. Agradecer é pouco, mas mesmo assim obrigada, primeiramente, por ter me oferecido a oportunidade de ingressar no mundo da pesquisa quando me aceitou em seu laboratório como orientanda para fazer Mestrado, sem nenhum conhecimento prévio. Minha base na ciência devo àquele laboratório. Em seguida, por ter confiado e acreditado na minha capacidade para desenvolver a ousada meta a que nos propomos para esta tese de doutorado e finalmente, por fornecer os subsídios necessários para a realização do projeto, ajudar a dirimir as dúvidas e quebrar as pedras que apareceram no caminho, pelo interesse constante com o meu bem-estar e por estar sempre disponível quando precisei dela. Apesar de um pouco distantes hoje, seus ensinamentos de vida estão mais vivos do que nunca em minha mente.

Aos co-orientadores deste trabalho, Prof. Dr. Bernardo Erdtmann e Prof. Dr. Fábio Pasqualoto pelo suporte técnico a este trabalho.

Aos Profs. Dr. Paulo Cará e Dra. Lenita Binelli Catan, (Ambulatório de Ginecologia - Departamento de Planejamento Familiar), e ao Dr. Abelardo Cavalcante (Setor de Urologia) por toda a paciência, atenção e suporte logístico para obtenção das amostras, ponto fundamental para a realização deste trabalho.

A todos os docentes e servidores do Instituto de Biotecnologia – UCS, pela amizade, colaboração, e por terem me ajudado sempre que recorri a eles, tendo participado também de minha formação. Muito obrigado a todos.

Aos pacientes que confiaram em mim e gentilmente doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

Aos meus alunos, passados e presentes.

Aos amigos, colegas e bolsistas de iniciação científica do laboratório de Antioxidantes e Estresse Oxidativo, por toda a colaboração no projeto e pelo convívio amistoso nos momentos bons e nos momentos maus.

À minha bolsista de iniciação científica, Cátia dos Santos, por todas as análises efetuadas. Este trabalho e eu devemos muito a você.

Para os meus pais, pelo dom da vida e por me inspirarem a ambicionar.

Ao meu irmão, Cláudio Jr, que me deu uma linda sobrinha-Borboleta: a Duda. Por toda a dedicação, esforço, braveza e bravura em sua iluminada missão... e, principalmente por me ensinar que um soldado é forjado no calor da batalha.

A Sarah – a sementinha mais esperta que germinou. Que me fez repensar meus valores e crenças. E que assim me deu um pouco de sabedoria. E me fazendo avó, me deu um senso maior de família. Obrigada por acrescentar razão e beleza aos meus dias.

A minha inesquecível avó, Dona Fina (em memória), exemplo de avó e figura de grande importância em minha formação e de quem sinto muitas saudades. Sua história de vida me fez acreditar que nossa existência pressupõe outra infinitamente superior. Obrigada por semear em mim a fé Mariana, hoje suporte de minha vida.

Aos meus avós e antepassados, por olharem e zelarem por mim.

Ao Programa de pós-graduação em Biotecnologia – UCS, que me forneceu conhecimentos, formou meu espírito crítico, me deu oportunidades e me ensinou uma pequenina, mas importantíssima coisa, o amor pela pesquisa.

A CNPq, CAPES e FAPERGS , pelo suporte financeiro.

A todos aqueles que não foram citados aqui, mas que contribuíram de alguma maneira para a conclusão desta tese. Muito obrigado a todos.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 Espermatogênese.....	5
2.2 Parâmetros seminais e espécies reativas	6
2.3 Antioxidantes seminais.....	11
2.4 Criopreservação de sêmen humano e danos causados por estresse oxidativo.....	12
2.5 Papel dos antioxidantes na prevenção de criodanos	18
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. RESULTADOS.....	25
4.1 CAPÍTULO 1	26
A influência das espécies reativas de oxigênio na infertilidade masculina/ <i>The influence of reactive oxygen species on male infertility</i>	
4.2 CAPÍTULO 2.....	36
<i>Effects of the supplement in-vitro of the resveratrol in the cryopreservation of human semen...</i>	
4.3 CAPÍTULO 3	41

<i>Addition of ascorbic acid to cryopreservation medium reduces lipid oxidative damages in semen of infertile men</i>	
4.4 CAPÍTULO 4	51
<i>Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen</i>	
5. DISCUSSÃO GERAL	55
6. CONCLUSÕES	65
7. PERSPECTIVAS	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
9. ANEXO	85
9.1 ANEXO I: Parâmetros seminais avaliados em sêmen fresco.....	86
9.2 ANEXO II: Dados séricos dos indivíduos férteis e inférteis.....	87
9.3 ANEXO III: Termo de consentimento livre e esclarecido.....	91
9.4 ANEXO IV: Ficha de informações do voluntário.....	97
9.5 ANEXO V: <i>Curriculum Lattes</i> da candidata.....	100

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Estrutura do resveratrol.....Página 24

Figura 2. Estrutura do ácido ascórbico.....Página 25

CAPÍTULO 2

Figura 1: Sperm motility in fertile (n=10) and infertile men (n=20) analyzed before and after cryopreservation with and without resveratrolPágina 3

CAPÍTULO 4

Figura 1: DNA damage frequency (Comet assay) in spermatozoa of fertile (A) and infertile men (B) analyzed before and after cryopreservation in the presence of ascorbic acid or resveratrolPágina 52

.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Concentration, motility, and morphology in sperm from fertile (n=10) and infertile (n=20) men.....Página 2

Tabela 2: Oxidative stress markers in samples of fertile (n=10) and infertile men (n=20) treated with resveratrol or not.....Página 3

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Oxidative stress markers (mean $\pm$ SD) in samples of infertile (n=20) and fertile men (n=10) treated with ascorbic acid (10.0 mM) or not..... Página 48

CAPÍTULO 4

Tabela 1: Semen characteristics of fertile and infertile men..... Página 51

Tabela 2: DNA damage index (Comet assay) in spermatozoa of fertile and infertile men analyzed before and after cryopreservation in the presence of ascorbic acid or resveratrolPágina 51

LISTA DE ABREVIATURAS

ART	técnicas de reprodução assistida
Cat	catalase
ER	espécies reativas
FSH	hormônio folículo estimulante
LH	hormônio luteinizante
LPO	peroxidação lipídica
MDA	malondialdeído
NADPH	nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
PMN	granulócitos polimorfonucleares
Sod	superóxido dismutase
TBARS	produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
WHO	World Health Organization
IVF	fertilização <i>in-vitro</i>
ICSI	injeção intracitoplasmática de espermatozóide

RESUMO

A criopreservação de sêmen humano é de grande importância para a medicina reprodutiva, porém esse processo pode causar danos ao espermatozóide devido, entre outros aspectos, à produção de espécies reativas de oxigênio, as quais podem lesar as biomoléculas. Tanto o resveratrol quanto o ácido ascórbico são compostos com reconhecida capacidade antioxidante, porém ainda pouco estudados em relação à prevenção de criodanos em espermatozóides humanos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi analisar marcadores de danos oxidativos e parâmetros seminais antes e após a criopreservação de sêmen humano em presença e ausência de resveratrol e ácido ascórbico. Foram analisadas amostras de sêmen de 20 homens inférteis e 10 doadores com fertilidade comprovada. Indivíduos com azoospermia (ausência de espermatozoides), leucocitospermia (aumento da contagem de leucócitos seminais) ou sob uso de suplementação antioxidante foram excluídos do estudo. Os marcadores de estresse oxidativo incluíram a avaliação dos produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a atividade das enzimas superóxido dismutase (Sod) e catalase (Cat). Os danos ao DNA foram quantificados pelo ensaio Cometa. Após a análise seminal padrão as amostras foram divididas em alíquotas, quais sejam: sem a adição de antioxidantes (controle), com 0,1 mM, 1,0 mM, e 10,0 mM de resveratrol e 10,0 mM de ácido ascórbico. Após uma hora de incubação as alíquotas foram criopreservadas em nitrogênio líquido a -196°C, empregando-se o TEST-Yolk buffer como agente crioprotetor. Paralelamente, foram

avaliados, ainda, os parâmetros séricos para TBARS, Sod, Cat e níveis de ácido úrico em homens inférteis e férteis. Os resultados mostraram que o uso de ácido ascórbico e resveratrol não causou nenhuma alteração na concentração e morfologia dos espermatozóides, porém nenhum dos antioxidantes foi capaz de prevenir a diminuição da motilidade induzida pelo processo de criopreservação. A criopreservação induziu uma diminuição na atividade da Sod em indivíduos inférteis e um aumento nos níveis de TBARS nas amostras de homens férteis e inférteis. Observou-se uma correlação negativa entre motilidade espermática e os valores de TBARS em homens inférteis, tanto em amostras pré-congelamento (-0,868, $p < 0,05$) quanto em amostras pós-congelamento (-0,897, $p < 0,05$). A adição de resveratrol às amostras, previamente ao processo de criopreservação, preveniu a diminuição da atividade da Sod em indivíduos inférteis e diminuiu os níveis de TBARS tanto em homens férteis como em inférteis. O ácido ascórbico foi capaz de minimizar os danos oxidativos a lipídios causados pela criopreservação, porém somente em sêmen de homens inférteis. Observou-se ainda que a criopreservação induziu um significativo aumento de danos ao DNA (principalmente dos tipos 2, 3 e 4) em homens férteis e inférteis. A adição de ácido ascórbico ao espermatozóide reduziu os danos ao DNA em homens inférteis, mas não em homens férteis. Por outro lado, o resveratrol foi capaz de reduzir os danos ao DNA tanto em homens férteis como em inférteis. Salienta-se, ainda, que o uso de 10,0mM de resveratrol foi capaz de evitar todos os danos ao DNA induzidos pela criopreservação em homens inférteis. Observou-se, também, que os indivíduos inférteis apresentaram níveis séricos mais elevados de TBARS, ácido úrico e atividade de Sod. Embora outros estudos sejam necessários, os dados apresentados neste trabalho indicam a possibilidade da utilização do resveratrol e ácido ascórbico em procedimentos de criopreservação de sêmen humano, principalmente naqueles onde a

motilidade não seja essencial para ocorrer a fecundação como, por exemplo, a ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozóide).

ABSTRACT

Cryopreservation of human semen is very important in reproductive medicine, but it may cause damages to the spermatozoa, probably due to the production of reactive oxygen species (ROS), which may cause structural damage to the biomolecules. Resveratrol and ascorbic acid are important antioxidants, however, until now, there are only few studies about its use in cryopreservation process. Therefore, the aim of this study was to analyze the oxidative stress markers and seminal standard parameters before and after the cryopreservation of human semen with and without these antioxidants. Ejaculated semen from 20 infertile men and 10 fertile donors, with proven fertility, were examined. Individuals with azoospermia, leukocytospermia or under antioxidant supplementation were excluded from the study. Oxidative stress markers including the determination of the levels of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (Sod) and catalase (Cat). DNA damages were quantified by comet assay. After the evaluation of standard seminal assays, semen samples were divided into 5 aliquots, which were treated as follows: (a) without antioxidants; (b) with 0.1 mM of resveratrol; (c) with 1.0 mM of resveratrol; (d) with 10.0 mM of resveratrol and (e) with 10.0 mM of ascorbic acid. Samples were incubated for 1 hour and, then, they were cryopreserved in liquid nitrogen at -196°C. The TEST-Yolk buffer was used as cryoprotector agent in all the samples. Besides, it was evaluated, also, the seric values of TBARS, Sod, Cat and uric

acid both in infertile and fertile men. The results showed that the use of ascorbic acid or resveratrol did not change the concentration and morphology of the spermatozoids. However, none of the antioxidants were able to prevent the decrease in the mobility induced by the cryopreservation process. Cryopreservation causes a decrease in Sod activity in infertile men and an increase of TBARS levels, both in infertile and fertile men. It was observed a negative correlation between spermatozoa motility and TBARS levels in infertile men, both before ($-0,868$, $p<0,05$) and after ($-0,897$, $p<0,05$) the cryopreservation process. Resveratrol was able to avoid the decrease in Sod activity in infertile men and the increase in TBARS levels both in infertile and fertile men samples. Ascorbic acid was able to reduce the oxidative lipid damages induced by cryopreservation only in infertile men. It was also observed that the cryopreservation process induced a significant increase of DNA damages (mainly types 2, 3 and 4) in infertile and fertile men. The addition of ascorbic acid reduces DNA damages only in infertile men. On the other hand, resveratrol was capable to reduce DNA damages both in infertile and fertile men. In fact, the use of 10.0mM of resveratrol was able to avoid all the DNA damages induced by the cryopreservation in infertile men. Infertile men showed high seric levels of TBARS, uric acid and Sod activity than the fertile men. Although other studies are necessary, the data presented in this work suggests the possibility to use resveratrol and ascorbic acid in human cryopreservation procedures, both for fertile and infertile men, at least, for ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection), as it does not need motile sperm for achieving pregnancy.

1. INTRODUÇÃO

A infertilidade masculina é uma síndrome multifatorial que abrange uma grande variedade de desordens, que podem ser congênitas ou adquiridas (Agarwal *et al.*, 2008). Estudos têm indicado que alguns problemas de infertilidade poderiam ser superados através das técnicas de reprodução assistida (ART). ART inclui diversas técnicas, principalmente fertilização *in vitro* (IVF), injeção intracitoplasmática do espermatozóide (ICSI) ou inseminação artificial (AI). Todas estas técnicas requerem espermatozóides viáveis e com qualidade, disponíveis quando a concepção é requerida. A criopreservação de espermatozóides humanos tem sido extensivamente usada em programas de inseminação artificial. Embora esta técnica permita que os espermatozóides sejam obtidos e estocados imediatamente e indefinidamente, estudos têm mostrado que a qualidade do esperma diminui com o congelamento/descongelamento. Considerando que a maioria dos homens inférteis tem baixa qualidade e contagem espermática, a utilização da criopreservação pode causar uma diminuição ainda maior na qualidade do esperma. Apesar disso, a criopreservação de sêmen representa uma valiosa opção terapêutica no tratamento da infertilidade, sendo o congelamento indicado previamente em todos os tratamentos que podem colocar em risco a diminuição, perda temporária ou definitiva da fertilidade masculina (Tash *et al.*, 2003). No entanto, a excessiva geração de espécies reativas (ER) que ocorre neste processo pode lesar moléculas, incluindo o DNA (Li *et al.*, 2007; Agarwal *et al.*, 2008). Os danos ao DNA do espermatozóide, tanto nuclear quanto mitocondrial (mtDNA), podem ser transmitidos para a prole e levar ao aumento da incidência de abortos, anomalias fetais e defeitos de nascimento

(Desai *et al.*, 2009). Desta forma, a avaliação do dano ao DNA do espermatozóide pode ser uma ferramenta potencial para avaliação de amostras de sêmen antes de seu uso em técnicas de reprodução assistida (ART).

Tanto o resveratrol (Sierens *et al.*, 2002) como o ácido ascórbico (vitamina C) (Kefer *et al.*, 2009) são compostos com reconhecida ação antioxidante. A adição *in-vitro* de resveratrol ao sêmen de rã mostrou-se capaz de diminuir a lipoperoxidação dos espermatozóides (Sarlos *et al.*, 2002). Até o momento, porém, não existem dados sobre o efeito do resveratrol em criopreservação de sêmen humano.

Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os principais marcadores de estresse oxidativo (produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico e as atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase) e o índice de danos ao DNA (ensaio cometa), antes e depois do processo de criopreservação, no sêmen de homens inférteis e férteis tratados ou não com resveratrol ou ácido ascórbico. Além disso, realizou-se ainda, a dosagem sérica de marcadores de danos oxidativos e de ácido úrico nestes indivíduos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Espermatogênese

2.1 Espermatogênese

A espermatogênese é um processo elaborado de diferenciação celular, responsável pela produção do gameta masculino que ocorre no interior dos túbulos seminíferos, presentes nos testículos. Inicia-se ainda na vida embrionária, com a formação das células germinativas, que permanecem em estado de latência até a puberdade, quando, sob o efeito das gonadotropinas hipofisárias, dão início ao processo de amadurecimento das células germinativas, com a formação dos espermatozóides (Clermont *et al.*, 1995).

Os espermatozóides são células especializadas cuja função é fertilizar o ovócito. Eles apresentam três partes: a “cauda”, que é formada pelo flagelo, uma organela citoplasmática responsável pela motilidade espermática; a peça intermediária, uma região rica em mitocôndrias, que fornece energia aos movimentos flagelares; e a cabeça, onde se localiza o material genético e o acrossoma. O acrossoma é uma estrutura formada pelo aparelho de Golgi e constituída por enzimas, cuja função é auxiliar a penetração do espermatozóide na membrana externa do ovócito, evento necessário durante o processo de fertilização do ovócito (Amann, 1995).

Os espermatozóides necessitam sofrer modificações funcionais e estruturais para serem capazes de fertilizar os ovócitos. Habitualmente, o conjunto destas transformações é definido como “capacitação espermática” (Austin, 1952). Em geral, os espermatozóides capacitados são aqueles que apresentam reação acrossômica. Inicialmente, essas modificações ocorrem no nível molecular da membrana plasmática e resultam em alterações morfológicas

(reação acrossômica) e fisiológicas (hiperativação do flagelo). A reação acrossômica é caracterizada pela fusão entre a membrana plasmática e a acrossomal externa, resultando em formação de vesículas e permitindo a liberação de enzimas do conteúdo acrossômico. Os espermatozóides necessitam reagir com componentes dos ovócitos (células do *cumulus*, fluido folicular, zona pelúcida) para completar a reação acrossômica. O processo de capacitação depende de alterações da permeabilidade da membrana ligadas ao transporte dos íons cálcio (Myles,1995).

A fecundação (fertilização) é um processo que se inicia com o contato entre o espermatozóide e o ovócito e finda com a fusão do material genético contido nestes gametas. Este contato se dá especificamente entre receptores presentes na zona pelúcida do ovócito e ligantes localizados na membrana citoplasmática do espermatozóide. O complexo receptor-ligante induz a reação acrossômica, que consiste na liberação das enzimas contidas no acrossoma, as quais têm a função de formar uma passagem para o espermatozóide, através da zona pelúcida, até a membrana citoplasmática do ovócito (Myles, 1995).

2.2 Parâmetros seminais e espécies reativas

Tradicionalmente, o diagnóstico de infertilidade masculina depende de uma avaliação descritiva dos parâmetros do ejaculado, com ênfase na concentração, motilidade e morfologia dos espermatozóides. É necessário enfatizar que a análise seminal não é um teste de fertilidade. A avaliação de fertilidade é um fenômeno complexo multifatorial que envolve a avaliação do casal (WHO, 1999).

Acredita-se que, para acontecer a fertilização do gameta feminino pelo masculino, é necessário apenas um número mínimo de espermatozóides com movimentos progressivos e morfologicamente normais. Entretanto, talvez pelo fato de muitos pesquisadores acreditarem estar ocorrendo um fenômeno de diminuição da qualidade seminal em todo o mundo, as características seminais têm variado conforme as diversas edições publicadas pela

Organização Mundial da Saúde (OMS) (Andersen *et al.*, 2000).

Conforme estabelecido pela OMS, a morfologia espermática pode ser classificada como normal (oval), amorfa (grande e pequena, com algumas imperfeições), afilada, duplicada e imatura (WHO, 1999). Esse critério abre espaço para uma gama de classificações utilizadas por diversas instituições.

Para avaliar morfologia, os melhores laboratórios de reprodução humana têm utilizado geralmente o critério estrito de Kruger, segundo o qual o resultado superior a 14% é tido como normal, enquanto que valores inferiores a 4% são referidos como patológicos e resultados de formas normais entre 4% e 14% são considerados como limites inferiores da normalidade (Kruger *et al.*, 1988).

Experiências clínicas revelaram que não é apenas o número absoluto de espermatozoides que dá o prognóstico de fertilidade, mas também a sua capacidade funcional. Como resultado, testes *in vitro*, como, por exemplo, a penetração em óvulo de hamster, foram desenvolvidos para monitorar a capacidade funcional dessas células, avaliando seu potencial para movimento, penetração em muco cervical, capacitação, reconhecimento da zona pelúcida, reação acrossômica, fusão espermatozoide-ovócito e formação do pró-núcleo (Hallak *et al.*, 2000).

Um dos principais fatores responsáveis pela manutenção das características funcionais dos espermatozoides é o nível de danos oxidativos presentes nessas células. Assim como outras células que vivem em condições aeróbias, a produção de espécies reativas (ER) pelos espermatozoides origina-se principalmente da atividade metabólica normal (Agarwal *et al.*, 2006). Porém, um desequilíbrio entre a produção e a eliminação de ER leva a uma situação chamada 'estresse oxidativo', que é definido como um desequilíbrio entre moléculas pró-oxidativas e antioxidativas, com aumento de ER. Esse desequilíbrio pode levar a danos a lipídios, proteínas e DNA (Aitken *et al.*, 1999).

A geração de ER pelo espermatozóide pode ocorrer através de dois caminhos: (i) sistema oxidase nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), ao nível da membrana plasmática do espermatozóide (Aitken *et al.*, 1993), e (ii) oxidoreductase NADPH-dependente (diaforase), localizada na peça intermediária do espermatozóide e integrada à cadeia respiratória mitocondrial (Gavella & Lipovac, 1992). As ER mais comumente geradas no espermatozóide são: o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que rapidamente sofre dismutação enzimática originando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), formado a partir do H_2O_2 em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^{++}) denominada reação de Fenton. O radical hidroxila é reconhecido como uma das espécies iniciadoras da peroxidação lipídica (de Lamirande & Gagnon, 1999; Halliwell & Gutteridge, 1999; Nordberg & Arnér, 2001). O H_2O_2 é considerado mais tóxico que o $O_2^{\bullet-}$, por ser mais estável e atravessar rapidamente a membrana plasmática (Halliwell & Gutteridge, 2000; Nordberg & Arnér, 2001). Além dos espermatozóides, os leucócitos também são capazes de gerar ER, sendo considerados a principal fonte produtora de ER no plasma seminal. Existem muitas evidências que os granulócitos polimorfonucleares (PMN) são a principal fonte de produção de ER. De fato, apenas um PMN é capaz de produzir 1.000 a 10.000 vezes mais ER, quando comparado à produção de ER por qualquer tipo de espermatozóide (Potts *et al.*, 2000; Garrido *et al.*, 2004).

Muito embora na infertilidade masculina as ER sejam conhecidas principalmente por seus efeitos deletérios na função espermática, existem evidências suficientes para apoiar a hipótese de que concentrações baixas e controladas das mesmas têm uma importante função na fisiologia espermática, participando nos mecanismos de sinalização da transdução (Sikka, 1996) e, mais precisamente, na aquisição do potencial de fertilização (O'Flaherty *et al.*, 2005). Um aumento na concentração de $O_2^{\bullet-}$ é um dos primeiros passos necessários para que aconteçam a indução e desenvolvimento dos movimentos de hiperativação e o fenômeno de capacitação do espermatozóide (Miesel *et al.*, 1993). As ER facilitam a reação acrossômica por meio de um efeito estimulatório na fosfolipase A_2 presente no espermatozóide humano

(Riley *et al.*, 1991). Além disso, as ER auxiliam na ativação da fosforilação da tirosina, desempenhando papel importante na mediação da ligação do espermatozóide ao ovócito (Sharma & Agarwal, 1996).

Espermatozóides anormais geram maior quantidade de ER que os normais. A presença de excesso de citoplasma, ou retenção citoplasmática, pode ser o maior determinante da geração de ER pelo espermatozóide anormal (Gomez *et al.*, 1998; Ollero *et al.*, 2001). De acordo com Gil-Guzman *et al.* (2001), há uma variação significativa na produção de ER, sendo que a maior produção de ER ocorre em espermatozóides com morfologia anormal da cabeça e retenção citoplasmática e a menor em espermatozóides maduros e em células germinativas imaturas. A retenção citoplasmática é um fenótipo celular associado com a imaturidade devido à liberação do espermatozóide do epitélio germinativo (Huszar & Vigue, 1994; Huszar *et al.*, 1998), sendo sugerido por Aitken & Krausz (2001) que o defeito base talvez esteja numa incapacidade das células de Sertoli em remover de forma suficiente o citoplasma residual do espermatozóide antes que ele seja liberado desse epitélio. Acredita-se que a retenção de citoplasma residual pelo espermatozóide humano esteja correlacionada positivamente com a geração de ER por meio de mecanismos mediados pela enzima citosólica glicose-6-fosfato desidrogenase, que regula a taxa do influxo de glicose no ciclo das pentoses, o qual, por sua vez, controla a disponibilidade do NADPH intracelular (Sharma & Agarwal, 1996).

Efeitos diretos e indiretos das ER nos espermatozóides podem ser resumidos em três categorias distintas, que incluem: os ácidos ribonucleico (RNA) e desoxiribonucleico (DNA), em ambos os genomas nuclear e mitocondrial, a peroxidação lipídica, afetando primariamente a estrutura e a função da membrana celular e as proteínas (Alvarez *et al.*, 2002).

As bases do DNA e as ligações fosfodiéster são suscetíveis ao estresse oxidativo e a peroxidação dessas estruturas pode causar quebras e *cross-linkings* do DNA e resultar em interrupção da transcrição, tradução e replicação do DNA. Tem sido sugerido que o dano

genômico ao DNA do espermatozóide pode ser transmitido para a prole e levar ao aumento da incidência de abortos, anomalias fetais e defeitos de nascimento (Kodama *et al.*, 2001).

O espermatozóide é uma célula altamente diferenciada. Sua membrana plasmática sofre alteração lipídica (De Vries *et al.*, 2003) e demonstra polaridade e mobilidade lateral de glicolipídios sobre sua superfície (Gavella & Lipovac, 1994) durante o processo de capacitação espermática. A grande quantidade de fosfolipídios poli-insaturados na membrana plasmática, necessários para eventos de fusão da membrana associados à fertilização (Storey, 1997), e a pouca proteção antioxidante (Alvarez *et al.*, 1987) tornam os espermatozóides humanos altamente suscetíveis ao estresse oxidativo (Aitken & Baker, 2006; Aitken, 2006; Agarwal *et al.*, 2005). Esse processo desencadeia o fenômeno da peroxidação lipídica (LPO) (Garrido *et al.*, 2004; Kasperzyk *et al.*, 2008). Os espermatozóides humanos são particularmente vulneráveis a LPO pelo fato de suas membranas plasmáticas serem enriquecidas com grande conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados nos fosfolipídios, particularmente o ácido docosahexaenóico que possui seis ligações duplas (Khosrowbeygi & Zarghami, 2007; Tavilani *et al.*, 2007). Esses ácidos graxos poli-insaturados são essenciais para a fluidez da membrana plasmática que é requerida para que ocorra a fusão das membranas, evento associado à fertilização (Tavilani *et al.*, 2007). Com a LPO, existe uma perda na fluidez da membrana espermática, prejudicando o bom funcionamento do espermatozóide e a sua fusão com o ovócito (Aitken *et al.*, 1991). Além disso, a LPO prejudica a troca iônica realizada pela membrana do espermatozóide, danificando a motilidade espermática normal (Kobayashi, 1991).

Vários artigos têm confirmado que as ER, incluindo o H_2O_2 (Alvarez *et al.*, 1987; Aitken *et al.*, 1993; Oehninger *et al.*, 1995), $O_2^{\bullet-}$ (de Lamirande & Gagnon, 1993; de Lamirande *et al.*, 1998) e óxido nítrico (Zini *et al.*, 1999) têm efeito deletério sobre a motilidade do espermatozóide, a qual é largamente dependente de três fatores principais: regulação, integridade estrutural e fornecimento de energia. A regulação dos movimentos é

controlada pela peça-média, particularmente pela área flagelar, que é responsável pela hiperativação. Os lipídios saturados e não-saturados que fazem parte da constituição da peça-média são a primeira escolha para o ataque das ER (Ibrahim *et al.*, 2008). A média de movimentos do espermatozóide é largamente dependente da disponibilidade de suplemento de energia. Devido a esse fato, espermatozóides normalmente ativos usualmente têm mitocôndrias funcionando muito ativamente no interior da peça-média. Essas mitocôndrias por sua vez geram altas quantidades de radicais livres como subprodutos da geração de ATP. Para estar assegurada a constante geração de ATP, a integridade da estrutura externa e interna da organela deve ser mantida (Ibrahim *et al.*, 2008).

2.3 Antioxidantes seminais

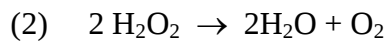
O organismo dispõe de substâncias denominadas 'antioxidantes' que neutralizam o excesso de ER (Jozwik *et al.*, 1997). Em condições normais, as células somáticas contêm substâncias antioxidantes em seu citoplasma, porém o espermatozóide, durante o período de maturação, perde a maioria de seu citoplasma e, com isso, perde parte dos antioxidantes endógenos, ficando mais vulnerável à ação de ER (Zini *et al.*, 2000). Felizmente, o plasma seminal é rico em antioxidantes, contribuindo dessa forma para o equilíbrio entre produção e neutralização das ER.

Entre as principais enzimas antioxidantes estão: a superóxido dismutase - Sod (EC 1.15.1.1), detectada no sêmen de diferentes espécies (Alvarez *et al.*, 1987; Meier *et al.*, 1990). Os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) são dismutados pela ação dessa enzima, produzindo H_2O_2 e oxigênio molecular (O_2) conforme a reação 1:



Outra enzima detectada também tanto no plasma seminal quanto no espermatozóide humano e que neutraliza as ações prejudiciais do excesso de ER é a catalase (Cat) (EC 1.11.1.6), a qual está presente no espermatozóide e no plasma seminal (Meier *et al.*, 1990;

Foot et al., 2000). Esta enzima é codificada por um gene presente no cromossomo 11, tendo a forma de um tetrâmero constituído por unidades idênticas, sendo que cada monômero contém um grupo prostético heme, ligado ao ferro em seu centro catalítico. A Cat atua removendo o H_2O_2 de acordo com a reação 2:



A atividade da catalase apresenta um K_m maior que a glutathione peroxidase para o H_2O_2 , por isso está implicada na detoxificação desta ER quando sua concentração é elevada, enquanto que a glutathione peroxidase atua em concentrações baixas do mesmo (Inoue, 1994).

O plasma seminal contém, ainda, um sistema antioxidante não-enzimático, constituído, principalmente, por altas concentrações de grupos tiol, ácidos ascórbico e úrico, glutathione e alfa-tocoferol (Potts et al., 2000). Outras substâncias não-enzimáticas no sêmen podem igualmente agir como neutralizadoras de ER, tais como a albumina, a hipotaurina, taurina e piruvato (Lewis et al., 1997; McCall, 1999).

Sob condições normais, esses antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos atuam para manter um baixo nível global de estresse oxidativo no sêmen, enquanto permitem os processos de sinalização celular e função espermática que são dependentes de condições oxidativas, concomitantemente, evitando danos celulares induzidos por oxidação. Em contraste, os efeitos patológicos do estresse oxidativo surgem quando os níveis de ER aumentam e/ou a capacidade do sistema de proteção antioxidante diminui, perturbando assim o delicado equilíbrio oxidante/antioxidante (Kefer et al., 2009).

2.4 Criopreservação de sêmen humano e danos causados por estresse oxidativo

A WHO define infertilidade como a inability de um casal em atingir a concepção ou levar uma gravidez a termo após um ano ou mais de relações sexuais regulares e na ausência de meios anti-contraceptivos (Isidore et al., 2005). A infertilidade é uma das maiores preocupações clínicas, afetando 15% de todos os casais em idade reprodutiva. Quando esse

dado é aplicado à população global, verifica-se que provavelmente 100 a 150 milhões de pessoas podem ter problemas relacionados à fertilidade, representando um ônus significativo para o sistema de saúde, e o fator masculino, incluindo a diminuição da qualidade do sêmen, é responsável por 30% desses casos (Sharlip *et al.*, 2002).

A criopreservação do sêmen humano tem sido largamente usada como um método vital para a preservação da fertilidade de homens antes de serem expostos a tratamentos como quimioterapia, radioterapia e/ou cirurgias que possam levar a falência testicular ou disfunção ejaculatória (Anger *et al.*, 2003; Tournaye *et al.*, 2004). O congelamento de espermatozóides antes do início do tratamento assegura indivíduos com “fertilidade garantida” e lhes permite gerar seus próprios filhos, através do uso de inseminação intra-uterina, fertilização convencional *in-vitro* (IVF) ou injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI).

Para o tratamento da infertilidade de casais, quando o companheiro não possui espermatozóides ou estes estão muito alterados, algumas vezes recorre-se ao uso de sêmen doado por outro homem. A Sociedade Americana para Medicina Reprodutiva determinou como obrigatório o cumprimento de um período de seis meses antes que a amostra criopreservada do doador seja autorizada para uso em reprodução assistida (The American Fertility Society, 1990). O uso de sêmen congelado permite o armazenamento do sêmen durante o período de quarentena enquanto os doadores são avaliados para doenças infecciosas como HIV e hepatite B antes da liberação do material para inseminação (Payne & Lamb, 2004).

A estocagem de sêmen criopreservado também é empregada para espermatozóides retirados de indivíduos azospérmicos após a extração de espermatozóide testicular ou da aspiração de espermatozóide percutânea epididimal, evitando assim repetir biopsias ou aspirações (Anger *et al.*, 2003).

A criopreservação tem sido largamente usada em procedimentos de ART, porém a excessiva geração de ER, que pode levar a uma situação de estresse oxidativo durante o

congelamento/descongelamento tem sido sugerida como o maior fator contribuinte por trás dos criodanos causados ao espermatozóide humano (Chi *et al.*, 2008; Thuwanut *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010). Esses danos ocorrem durante a preparação do espermatozóide e seu processamento para ART e podem diminuir a habilidade de fertilização do espermatozóide, em função da diminuição da motilidade e viabilidade (O'Connell *et al.*, 2002), da capacidade de penetração no muco cervical, por causar danos à estrutura do acrossoma (Esteves *et al.*, 2007), danos ao DNA (Chohan *et al.*, 2004) e apoptose no espermatozóide congelado/descongelado (Paash *et al.*, 2004).

Sabe-se que fosfolipídios, normalmente localizados na porção interna da membrana plasmática, movem-se para a porção externa durante o congelamento/descongelamento (Glander & Schaller, 1999; Schuffner *et al.*, 2001). Sob diferentes cenários biológicos, distúrbios da função da membrana estão associados à translocação da fosfatidilserina do folheto interno para o externo da membrana, fato aceito como uma determinação precoce de rompimento da integridade da membrana em células danificadas (Barroso *et al.*, 2006). Essa alteração da membrana é um dos eventos mais precoces de morte celular programada, que se denomina 'apoptose' (Vermes *et al.*, 1995; Barroso *et al.*, 2006).

O conteúdo fosfolipídico da membrana diminui após criopreservação, sendo mais pronunciadas as perdas da fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (Alvarez & Storey, 1992). A difusão lipídica através da membrana plasmática está bastante comprometida em espermatozóides humanos congelados/descongelados quando comparados com espermatozóides *a fresco* (James *et al.*, 1999). Um efeito possível durante a criopreservação é a perda da atividade da superóxido dismutase, provavelmente causada por lesões da membrana celular espermática (Wang *et al.*, 1997).

Além disso, a peroxidação lipídica resulta em perda da fluidez e prejuízo da função espermática (Aitken *et al.*, 1989; Aitken & Baker, 2006). Em estudos realizados para acessar a integridade do espermatozóide humano através de avaliação da membrana plasmática em

amostras criopreservadas/descongeladas verificou-se que os espermatozóides de homens férteis sempre apresentavam melhores resultados, em relação a homens inférteis, com respeito aos marcadores de funcionalidade da membrana plasmática e integridade de DNA (Duru *et al.*, 2000; Duru *et al.*, 2001; Schuffner *et al.*, 2001).

Durante a fase de iniciação da LPO ocorre acúmulo de hidroperóxidos lipídicos na membrana espermática, que se decompõe formando vários aldeídos, entre eles o malondialdeído (MDA). A medida do MDA e outros produtos resultantes da peroxidação lipídica tem sido usada como um indicador de dano oxidativo (Huszar & Vigue, 1994).

O ensaio de TBARS (produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico) é um método espectrofotométrico que mede a concentração dos produtos oriundos da peroxidação dos lipídios (Huszar & Vigue, 1994; Wang *et al.*, 1997; Dotan *et al.*, 2004; Sanocka & Kurpisz, 2004). Os resultados do ensaio do TBARS exibem uma excelente correlação com o grau de diminuição da função espermática em termos de motilidade e capacidade de fusão espermatozóide-ovócito (Saleh & Agarwal, 2002).

A criopreservação de espermatozóides pode causar, ainda, fragmentação do DNA (Thomson *et al.*, 2009). Estudos têm sugerido que o índice de fragmentação do DNA foi maior em homens com infertilidade idiopática que apresentavam parâmetros seminais anormais, do que em homens férteis (Donnelly *et al.*, 2001). Além disso, espermatozóides de homens inférteis têm uma alta frequência de anormalidades cromossomais, empacotamento do DNA deficiente, aumento de quebras duplas e maior suscetibilidade à indução de desnaturação por ácidos *in situ* que os espermatozóides de homens férteis (Desai *et al.*, 2009).

O foco na integridade genômica de gametas masculinos tem sido intensificado recentemente devido à preocupação crescente de que doenças genéticas possam ser transmitidas via ART, levando ao aumento da incidência de abortos, anomalias fetais e defeitos congênitos (Desai *et al.*, 2009).

Os espermatozóides não possuem enzimas funcionais de reparo de DNA, porém, após a fertilização, o ovócito pode reparar certo nível de danos ao DNA do espermatozóide (Genesca *et al.*, 1992), entretanto Ahmadi & Ng (1999) demonstraram que danos além de um certo nível resultam em uma baixa média de desenvolvimento embrionário e perda embrionária precoce. Diversos pesquisadores relataram uma redução no desenvolvimento embrionário após a fertilização com espermatozóides portadores de DNA danificado (Ahmadi & Ng, 1999; Morris *et al.*, 2002). Dados estatísticos têm embasado essa observação, os quais mostram que 85-90% dos casos de repetidas perdas fetais prematuras foram atribuídos a problemas genéticos (Singh *et al.*, 2003).

O advento da ICSI, que requer apenas um espermatozóide para a fertilização, é uma inestimável inovação no tratamento de homens com severa infertilidade, pois possibilitou a esses indivíduos, antes considerados previamente não-tratáveis pelas técnicas convencionais de ART, uma forma de estabelecer gravidez com seu próprio material genético. A consequência principal do uso dessa técnica tem sido a redução da significância do diagnóstico de parâmetros seminais como concentração, morfologia e motilidade espermática para esses indivíduos (Lewis *et al.*, 2008). Entretanto, a ICSI tem removido a maioria dos pontos de checagem celular, que previnem que espermatozóides imaturos ou de baixa qualidade tenham sucesso na fertilização do ovócito (Alvarez, 2006; Lewis *et al.*, 2008).

A integridade do DNA do espermatozóide é crucial para a correta transmissão da informação genética às futuras gerações (Tarozzi *et al.*, 2007). Os exames de sêmen de rotina, os quais medem a concentração de espermatozóides, percentagem de motilidade e morfologia, não identificam defeitos sutis na arquitetura da cromatina do espermatozóide. Para garantir a segurança da concepção, a medida da fragmentação do DNA do espermatozóide tem grande importância.

Até o presente, o ensaio cometa alcalino tem sido o teste mais comumente usado para medir a fragmentação do DNA na célula germinativa masculina. O ensaio cometa alcalino

provou ser um teste muito sensível para detectar níveis baixos dos danos de DNA em espermatozóides humanos (Duty *et al.*, 2001). É uma técnica rápida, simples e sensível, de baixo custo, que possui a habilidade de identificar quantitativamente quebras simples e duplas no DNA (Singh *et al.*, 1998; Ibrahim *et al.*, 2008). O ensaio cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar ou não em mutação. Nesta técnica células individuais são embebidas em agarose, lisadas *in-situ* na presença de detergente e álcali, submetidas a eletroforese e coradas com nitrato de prata para que se possa visualizar o seu DNA. Pequenos fragmentos de DNA migram para fora do núcleo e o número de quebras por célula pode ser estimado através da extensão da migração (Singh *et al.*, 1998).

O nível de fragmentação do DNA pode ser observado por um aumento da extensão da migração do DNA, formando a chamada 'cauda' do cometa. O nível de fragmentação pode ser avaliado através de um índice de danos que varia de zero (onde não se observa a presença de cometa, ou seja, não há presença de dano) até o grau 4 (presença de cometa com longa cauda, representativo de dano extenso ao DNA), ou seja, quanto maior o nível de dano, maior o número a ele atribuído (Morris *et al.*, 2002).

Estudos utilizando o ensaio cometa alcalino têm detectado danos no DNA em espermatozóides criopreservados de homens inférteis (Hammadeh *et al.*, 1999; Donnelly *et al.*, 2001). Evidências acumuladas sugerem que distúrbios na organização do material genômico no núcleo do espermatozóide estão negativamente correlacionados com o potencial de fertilidade do espermatozóide (Duty *et al.*, 2001).

A avaliação do percentual de dano ao DNA dos espermatozoides gerados nas gônadas dos pacientes em avaliação pode ser uma ferramenta em potencial para avaliação de amostras de sêmen antes de seu uso em ART. Testar a integridade do DNA pode ajudar a selecionar espermatozóides com DNA intacto ou com menos quantidade de danos para uso em concepção assistida, diminuindo custos e reduzindo problemas emocionais associados a

tentativas falhas de ART (Sharma *et al.*, 2004). A proteção do DNA tem importantes implicações no uso de espermatozóides doados congelados para inseminação. Isso é extremamente relevante para indivíduos os quais têm espermatozóides armazenados por longo tempo antes de submeterem-se a quimioterapia ou radioterapia.

2.5 Papel dos antioxidantes na prevenção de criodanos

Várias estratégias podem ser empregadas para obterem-se espermatozóides com uma boa integridade funcional e genômica após a criopreservação, sendo a suplementação antioxidante uma das alternativas viáveis. Consequentemente, uma variedade de meios crioprotetores, principalmente suplementados com antioxidantes, têm sido empregados como tentativa para superar os criodanos (Yoshimoto *et al.*, 2008). Tem sido especulado que a suplementação dos meios de criopreservação com antioxidantes poderia adicionar algum grau de proteção ao espermatozóide contra os criodanos induzidos por estresse oxidativo. Nesse sentido, alguns estudos têm avaliado a eficácia dos antioxidantes em melhorar a qualidade dos espermatozóides humanos criopreservados (Agarwal, 2004). Esses estudos não podem ser considerados numerosos, bem como não o são os antioxidantes testados para esse propósito.

A vitamina E é o principal antioxidante envolvido na interrupção das reações em cadeia da LPO, na membrana plasmática do espermatozóide humano (Bolle *et al.*, 2002). Estudos têm reportado sua eficácia em preservar a motilidade espermática durante a congelamento/descongelamento (Agarwal *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2009). Meios de criopreservação suplementados com uma combinação das vitaminas C e E foram associados a uma diminuição na produção de ER pelo espermatozóide (Agarwal, 2004).

A Sod e a Cat são antioxidantes enzimáticos que protegem o espermatozóide dos danos causados pelo ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio, respectivamente (Agarwal, 2004). A suplementação dos meios de criopreservação simultaneamente com ambas as enzimas, Sod e Cat, pode contribuir efetivamente para a prevenção da LPO da

membrana espermática (Rossi *et al.*, 2001). Li *et al.* (2007) mostraram que a suplementação com Cat em meios de criopreservação reduz os níveis de ER que induzem dano ao DNA do espermatozóide e melhora a qualidade do espermatozóide humano durante o processo de congelamento/descongelamento.

A suplementação dos meios de criopreservação com rebamipida, um antioxidante que inibe a ativação da NADPH-oxidase e da diaforase espermáticas responsáveis pelos sítios de produção de ER no espermatozóide humano, mostrou que a produção de ER e a LPO foram significativamente inibidas, resultando na preservação da motilidade espermática pós-descongelamento (Park *et al.*, 2003; Agarwal *et al.*, 2008).

A pentoxifilina, um inibidor da fosfodiesterase, tem sido utilizada para estimular a motilidade de espermatozóides humanos. Também tem sido postulado que a pentoxifilina tem habilidade para varrer ER. Utilizada em meios de criopreservação, não foi capaz de melhorar a motilidade pós-descongelamento, quando adicionada ao meio crioprotetor durante o congelamento (Esteves *et al.*, 1998; Stanic *et al.*, 2002; Esteves *et al.*, 2007). Entretanto, esse composto mostrou ser capaz de recuperar a motilidade desde que adicionada á amostra durante o processo de descongelamento (Stanic *et al.*, 2002).

A suplementação antioxidante tem mostrado render uma significante melhora na qualidade de espermatozóides criopreservados em alguns experimentos animais (Grossfeld *et al.*, 2008). Entretanto, as informações que existem sobre a utilização de antioxidantes para a crioproteção em espermatozóides humanos ainda são limitadas (Li *et al.*, 2010).

O resveratrol e o ácido ascórbico são compostos com reconhecida ação antioxidante (Sierens *et al.*, 2002; Agarwal, 2004). O resveratrol (trans-3, 4', 5-trihidroxiestilbeno) (Figura 1), é um composto encontrado em mais de 300 plantas comestíveis, sendo um dos mais importantes polifenóis encontrados no vinho tinto, estando presente em concentrações significativas (4-20 mg/mL) (Yoo *et al.*, 2006). Está associado a diversos efeitos benéficos, principalmente a diminuição de doenças relacionadas ao envelhecimento, incluindo

neurodegeneração, carcinogênese e arterioesclerose (Wilcox *et al.*, 2004). Kyselova *et al* (2003) suplementaram com resveratrol a água consumida por ratos e observaram que não houve alterações na espermatogênese, contagem espermática e qualidade do espermatozóide. A adição *in-vitro* de resveratrol ao sêmen de rã mostrou-se capaz de diminuir a lipoperoxidação dos espermatozoides (Sarlos *et al.*, 2002). No entanto, não há dados disponíveis sobre o efeito do resveratrol na criopreservação do sêmen humano.

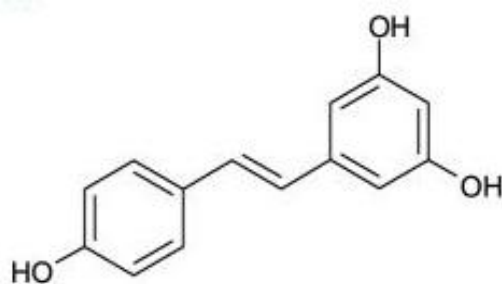


Figura 1. Estrutura do resveratrol (adaptado de Kyselova *et al.*, 2003)

O ácido ascórbico (L-ácido ascórbico) (Figura 2) é o principal antioxidante no líquido seminal dos homens férteis e contribui com até 65% de sua capacidade antioxidante (Agarwal, 2004).

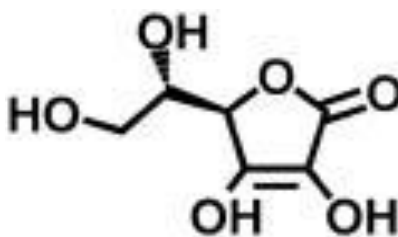


Figura 2. Estrutura da vitamina C (adaptado de Lohmann, 1984)

Esse é um potente doador de elétrons, capaz de reagir com o superóxido, peróxido e com radicais hidroxil para formar o ácido dehidro-ascórbico (Naouri *et al.*, 2008). A concentração de ácido ascórbico no líquido seminal é 10 vezes maior que no plasma (Agarwal & Ferreira, 2004). A correlação positiva entre os altos níveis de ácido ascórbico e a morfologia espermática normal sugere que a ácido ascórbico desempenhe um papel

importante como antioxidante. Ainda que o ácido ascórbico sozinho não possua a capacidade de neutralizar os radicais lipofílicos presentes no compartimento lipídico do espermatozóide, ele pode atuar de maneira sinérgica com a vitamina E para reduzir as ER (Askari *et al.*, 1994).

Até o momento, a literatura cita apenas dois trabalhos que mostram a utilização do ácido ascórbico como forma de evitar os danos oxidativos causados pelo congelamento/descongelamento, os quais mostraram resultados contraditórios em relação à eficácia desse antioxidante (Askari *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2007).

Ainda que o debate em relação ao valor dos antioxidantes na melhora dos parâmetros seminais permaneça (Chakroun *et al.*, 2004), a adição dessas moléculas ao meio poderia melhorar a viabilidade do espermatozóide e seu potencial de fertilização para o uso em procedimentos de ART (Messeguer *et al.*, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo analisar os parâmetros seminais e de estresse oxidativo após a utilização de resveratrol e ácido ascórbico na criopreservação de sêmen de homens inférteis e férteis. Além disso, foram avaliados os níveis séricos de ácido úrico, danos oxidativos á lipídios e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase em indivíduos inférteis e férteis.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a morfologia, motilidade e concentração espermática em indivíduos inférteis e férteis antes e após a criopreservação com e sem a adição dos antioxidantes resveratrol e ácido ascórbico.
2. Avaliar os níveis de estresse oxidativo (em espermatozóides) e a atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase (plasma seminal) em indivíduos inférteis e férteis antes e após a criopreservação com e sem a adição dos dois antioxidantes.
3. Quantificar os danos ao DNA de espermatozóides de indivíduos inférteis e férteis, através da aplicação do ensaio Cometa, antes e após a criopreservação com e sem os antioxidantes resveratrol e ácido ascórbico.

4. Analisar os níveis séricos de ácido úrico, dano oxidativo a lipídios e a atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase em indivíduos inférteis e férteis.

4. RESULTADOS

4.1. CAPÍTULO 1

“A influência das espécies reativas de oxigênio na infertilidade masculina”, publicado na revista Reprodução & Climatério (2007).

4.2 CAPÍTULO 2

“Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen”,
publicado na revista *Fertility & Sterility* (2010).

4.3 CAPÍTULO 3

“Addition of ascorbic acid to cryopreservation medium reduces oxidative damages in semen of infertile men”, artigo publicado pelo “JBRA ASSISTED REPRODUCTION (2011)”.

4.4 CAPÍTULO 4

“Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen”, artigo publicado pela revista *Cryobiology* (2010).

5. DISCUSSÃO GERAL

A criopreservação de espermatozóides revolucionou o campo da reprodução assistida. Pelo fato de ser uma célula pequena, existir usualmente em grande número, ser de fácil obtenção, conter pouco citoplasma e menos água que o ovócito e os embriões, o espermatozóide é uma célula ideal para o congelamento. Entretanto, a estrutura e a função dos espermatozóides sofrem criodanos durante o processo de congelamento/descongelamento. Como esses criodanos causados a espermatozóides humanos podem afetar características como morfologia, motilidade, viabilidade e integridade do DNA, a otimização dos protocolos de criopreservação é vital para o sucesso das tecnologias de reprodução assistida (Slowinska *et al.*, 2008). Dessa forma, o presente trabalho avaliou os efeitos da adição dos antioxidantes resveratrol e ácido ascórbico na prevenção de criodanos a espermatozóides de homens férteis e inférteis.

O resveratrol é uma fitoalexina muito estudada, com importante ação antioxidante, capaz de varrer ER e sequestrar metais, estando associado à redução de doenças cardiovasculares e do risco de câncer (Yoo *et al.*, 2006). No entanto, a literatura não disponibiliza estudos sobre a ação do resveratrol em espermatozóides humanos criopreservados. O ácido ascórbico, um dos primeiros antioxidantes estudados, contribui com até 65% da capacidade antioxidante do líquido seminal (Agarwal, 2004). Porém, até o momento, este antioxidante tem sido pouco estudado e tem mostrado efeitos controversos com relação a sua eficiência na prevenção de criodanos causados a espermatozóides humanos (Askari *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2007).

Nesta tese foram avaliados os parâmetros de estresse oxidativo e a análise seminal padrão antes e após a utilização de resveratrol (capítulo 2) e de ácido ascórbico (capítulo 3)

durante a criopreservação de sêmen de indivíduos férteis e inférteis. O capítulo 4 mostra o efeito da adição de resveratrol e de ácido ascórbico na prevenção aos danos ao DNA induzidos pela criopreservação de sêmen nesses indivíduos.

A avaliação dos parâmetros seminais dos grupos infértil e fértil previamente ao processo de criopreservação mostrou que o grupo de indivíduos inférteis apresentou valores significativamente diminuídos de concentração, motilidade e morfologia espermática, quando comparados aos doadores férteis (capítulos 2 e 3). Os demais parâmetros seminais avaliados (volume, tempo de liquefação, viscosidade, coloração, pH e contagem de leucócitos) não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos estudados (Anexo 1), corroborando resultados já existentes na literatura (Hallak *et al.*, 2000; Agarwal, 2004). O processo de criopreservação não induziu nenhuma alteração na concentração e morfologia em amostras de espermatozóides após descongelamento, com ou sem a adição dos antioxidantes estudados, porém uma significativa diminuição na motilidade espermática foi observada em ambos os grupos de indivíduos amostrados (Capítulo 2). A motilidade é um dos parâmetros fundamentais para a habilidade de fertilização do espermatozóide (Thurston *et al.*, 2002). A motilidade espermática no sêmen fresco também aparece significativamente diminuída no grupo infértil em comparação aos doadores férteis (Capítulo 2). A literatura relata a existência de uma redução significativa na percentagem de espermatozóides móveis após o processo de criopreservação e posterior descongelamento em comparação ao sêmen fresco (Hallak *et al.*, 2000; Thurston *et al.*, 2002), corroborando os dados obtidos neste trabalho. O processo de criopreservação está associado aos danos causados à membrana do espermatozóide durante a criopreservação. É possível que a fragilidade da membrana cause anormalidades, afetando a saída de íons essenciais para a manutenção da motilidade normal (Kobayashi, 1991) e, conseqüentemente, reduzindo a motilidade espermática nessas amostras. Foi possível observar também que ambos os grupos amostrados apresentaram uma diminuição significativa da

motilidade tanto nas alíquotas congeladas sem adição de antioxidantes quanto naquelas adicionadas de ácido ascórbico e resveratrol (nas três concentrações utilizadas) quando comparados aos respectivos controles de sêmen fresco (Capítulos 2 e 3).

O mecanismo exato de ação do resveratrol permanece por ser estudado, mas é conhecido que os polifenóis, incluindo o resveratrol, são hábeis em doar hidrogênio aos radicais livres, levando à formação de moléculas estáveis. Os polifenóis são também facilmente incorporados à dupla membrana lipídica, inibindo a formação de radicais lipídicos, promovendo a renovação da integridade da membrana, responsável por manter o equilíbrio iônico da célula. Entretanto, curiosamente, embora a adição do resveratrol tenha minimizado os danos oxidativos, esse composto não foi capaz de prevenir a perda de motilidade causada pela criopreservação. O resveratrol é um inibidor específico da COX1 (Kennedy *et al.*, 2003), enzima envolvida na síntese das prostaglandinas da série 2 (Mendonça *et al.*, 2000), as quais estão positivamente correlacionadas com a motilidade dos espermatozóides (Fayed, 1996), fato esse que poderia explicar, ao menos em parte, o fato de o resveratrol não ter prevenido a perda da motilidade observada neste trabalho.

A avaliação morfológica realizada mostrou que indivíduos inférteis apresentaram uma média significativamente maior ($2,00\% \pm 0,07$) de espermatozóides apresentando gota citoplasmática, quando comparados ao grupo controle ($0,90\% \pm 0,07$) (Capítulo 2). O vínculo entre a má qualidade dos espermatozóides e o aumento da geração de ER pode incluir a presença de um excesso de citoplasma residual. Os espermatozóides perdem o componente citoplasmático da célula durante sua maturação. Após essa liberação, qualquer citoplasma residual associado aos espermatozóides retém-se ao nível da peça média como uma massa citoplasmática irregular. Se esse citoplasma residual ocupar mais de um terço da cabeça do espermatozóide será denominado 'gota citoplasmática'. Nessas circunstâncias, acredita-se que os espermatozóides liberados são imaturos e deficientes funcionalmente. Evidências levam a

crer que a retenção de citoplasma residual pelo espermatozóide humano está correlacionada positivamente com a geração de espécies reativas de oxigênio, mediada pela enzima citosólica glicose-6-fosfato desidrogenase, a qual, por sua vez, controla a disponibilidade do NADPH intracelular (Sharma & Agarwal, 1996). Espermatozóides com gota citoplasmática produzem elevadas concentrações de espécies reativas (Zini *et al.*, 2000), resultando em diminuição da motilidade e da viabilidade e comprometimento da capacitação e da reação acrossômica (Aitken, 1999).

Em relação às defesas antioxidantes enzimáticas, observou-se neste trabalho que o processo de criopreservação foi capaz de modular a atividade das enzimas antioxidantes Sod e Cat (Capítulos 2 e 3). A Sod é a enzima mais importante na proteção do espermatozóide humano contra o estresse oxidativo (Garrido *et al.*, 2004). Os resultados apresentados neste estudo mostraram que a atividade da Sod foi significativamente diminuída com o processo de criopreservação do sêmen de indivíduos inférteis (Capítulos 2 e 3), dando suporte à ideia de que um efeito importante da criopreservação é a diminuição da atividade dessa enzima. Pode-se supor, ainda, que tenha ocorrido perda de moléculas de Sod das células que sofreram lesão de membrana celular, conforme já descrito na literatura (Alvarez & Storey, 1992; Wang *et al.*, 1997), o que tornaria essas células mais suscetíveis aos danos peroxidativos após o descongelamento.

Os doadores férteis não apresentaram nenhuma alteração na atividade de Sod após a criopreservação, entretanto um grande aumento (ao redor de 10 vezes) foi observado na atividade de Cat em amostras descongeladas. Este aumento também pode ser observado nos indivíduos inférteis (em torno de 2,3 vezes) sugerindo que durante o processo de criopreservação o peróxido de hidrogênio é a principal ER produzida, como descrito anteriormente (Wang *et al.*, 1997), e que os indivíduos inférteis têm sistemas de varredura defeituosos ou inadequados, fato esse que poderia levar a uma deficiente detoxificação do

peróxido de hidrogênio produzido pelos espermatozóides desses indivíduos, diminuindo significativamente o potencial fertilizante do espermatozóide.

Em doadores férteis, a adição de resveratrol e ácido ascórbico não alterou as atividades das enzimas Sod e Cat. Entretanto, em homens inférteis, um aumento na atividade de Sod foi observado nas amostras tratadas com os dois antioxidantes testados, quando comparadas aos respectivos controles pós-congelamento, mostrando que esses antioxidantes poderiam diminuir a perda da atividade dessa enzima após o congelamento, conforme já relatado na literatura (Lasso *et al.*, 1994).

O processamento do sêmen visando à criopreservação expõe a célula germinativa masculina a uma maior concentração de oxigênio, fato que poderia causar um aumento na produção de ER estabelecendo o processo de estresse oxidativo (Wang *et al.*, 1997; Halliwell & Gutteridge, 2000). Pelo seu alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados em suas membranas celulares, os espermatozóides humanos são altamente suscetíveis ao estresse oxidativo (Kodama *et al.*, 2001; Garrido *et al.*, 2004). Alkan *et al.* (1997) sugerem que a LPO da membrana espermática possa ser um dos mecanismos-chave envolvidos na patofisiologia da infertilidade masculina, que afeta um em cada seis casais na Europa durante sua idade reprodutiva, sendo a disfunção espermática uma das causas mais comuns. Um estudo prospectivo demonstrou que homens com altos níveis de ER apresentavam uma probabilidade sete vezes menor de estabelecer gravidez, quando comparados àqueles com baixa geração dessas espécies, sendo o dano oxidativo ao espermatozóide a maior causa de disfunção espermática naqueles indivíduos (Aitken *et al.*, 1991).

Observou-se neste trabalho que indivíduos inférteis apresentaram altos níveis de danos lipídicos em amostras pré-congelamento quando comparados a doadores férteis (Capítulos 2 e 3). Observaram-se, ainda, níveis basais maiores de LPO após a criopreservação sem a adição de antioxidantes em homens inférteis quando comparados aos doadores férteis, o que está de

acordo com estudos anteriormente publicados (Bell *et al.*, 1993; Schuffner *et al.*, 2001). Sabe-se que o sêmen de indivíduos inférteis apresenta-se, previamente à criopreservação, com uma qualidade seminal inferior à encontrada nos doadores férteis, provavelmente pela produção aumentada de ER no sêmen (Bell *et al.*, 1993; Schuffner *et al.*, 2001), que seria intensificada pelos procedimentos de preparação para criopreservação e pelo processo de congelamento em si levando aos criodanos observados nos espermatozóides de tais indivíduos.

As amostras de homens férteis e inférteis estudadas neste trabalho apresentaram níveis significativamente aumentados de TBARS após a criopreservação em comparação com as respectivas amostras de sêmen fresco (Capítulos 2 e 3), ratificando dados já relatados na literatura (Schuffner *et al.*, 2001). Relatos prévios têm descrito danos ao espermatozóide humano associados com a lipoperoxidação da membrana (Chen *et al.*, 1997; Twigg *et al.*, 1998; Potts *et al.*, 2000) e estresse oxidativo (Hughes *et al.*, 1996; McKelvey-Martin *et al.*, 1997; Aitken *et al.*, 1999; Lopes *et al.*, 1998; Twigg *et al.*, 1998; Donnelly *et al.*, 1999). Acredita-se que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) seria a ER de maior toxicidade ao espermatozóide por iniciar o processo de LPO (Agarwal *et al.*, 2005; Aitken & Baker, 2006; Aitken, 2006), afetando primariamente a estrutura e a função da membrana celular (Twigg *et al.*, 1998; Zalata *et al.*, 1998; Storey *et al.*, 1998) e levando a graves disfunções dessas células, incluindo capacitação prejudicada e defeitos morfológicos na peça média (Kodama *et al.*, 2001). Concentrações moderadas de H_2O_2 não afetam a viabilidade dos espermatozóides, porém os imobilizam, geralmente por esgotamento do ATP intracelular e diminuição na fosforilação das proteínas do axonema. Altas concentrações de H_2O_2 podem induzir peroxidação lipídica e morte celular (Agarwal & Ferreira, 2004).

A adição de resveratrol nas três concentrações utilizadas (0,1, 1,0 e 10,0 mM) foi capaz de prevenir os danos lipídicos induzidos pela criopreservação tanto em indivíduos férteis como inférteis. No entanto, esse efeito não foi dose-dependente, na faixa de

concentração estudada (Capítulo 2). Já o ácido ascórbico foi capaz de minimizar os danos causados por LPO somente no sêmen de homens inférteis (Capítulo 3). A exata razão pela qual o ácido ascórbico não foi capaz de prevenir os danos lipídicos em homens férteis permanece por ser investigada. Em controvérsia com dados anteriormente relatados que afirmam que a LPO em amostras criopreservadas não é inibida pela adição de antioxidantes, como o ácido ascórbico (Askari *et al.*, 1994 , Lasso *et al.*, 1994), nossos resultados sugerem que a utilização tanto de resveratrol quanto de ácido ascórbico em meios de criopreservação poderia ser recomendada com o objetivo de diminuir os níveis de LPO em espermatozóides criopreservados de homens inférteis e férteis (Capítulos 2 e 3). Em nosso estudo observou-se uma correlação negativa entre a motilidade espermática das alíquotas pré-congelamento e os níveis de TBARS, tanto nos controles pré (-0,676, $p \leq 0,05$) quanto pós-congelamento (-0,623, $p \leq 0,05$) (Capítulo 2). A motilidade espermática do controle pós-congelamento também mostrou correlação inversa com os níveis de TBARS dos controles pré (-0,348, $p \leq 0,05$) e pós-congelamento (-0,379, $p \leq 0,05$) (Capítulo 2). Esses achados sugerem que os danos oxidativos a lipídios estejam associados à diminuição da motilidade espermática e, conseqüentemente, à capacidade do homem em estabelecer gravidez. Observou-se, ainda, que indivíduos inférteis apresentaram níveis séricos de ácido úrico, TBARS e atividade de Sod maiores do que observado para os homens férteis, mostrando, pela primeira vez, que esses indivíduos apresentam um desequilíbrio oxidativo a nível sistêmico e não apenas restrito aos fluídos seminais. As exatas implicações desse achado permanecem, ainda, por serem investigadas.

Além dos efeitos causados à membrana espermática, a LPO pode também levar a danos ao DNA da célula germinativa masculina, incluindo *cross-linking* da cromatina, alterações de bases e quebras de fita (Twigg *et al.*, 1998). Na era da ART, a integridade do DNA do espermatozóide é essencial para a correta transmissão do material genético paterno

para o ovócito, mas os exames de rotina do sêmen, os quais avaliam concentração espermática, percentagem de motilidade e morfologia, não identificam defeitos sutis na arquitetura da cromatina do espermatozóide (Lewis & Agbaje, 2008). Dessa forma, a análise convencional de sêmen tem se mostrado de baixo valor prognóstico. Avanços recentes em biologia reprodutiva têm proposto a avaliação da integridade do DNA como uma importante ferramenta de avaliação para verificar a presença de quebras simples do DNA, anormalidades numéricas no cromossomo e alterações na regulação do genoma paterno (Shansi *et al.*, 2009). Por esses motivos, o foco na integridade genômica do gameta masculino tem se intensificado devido à preocupação crescente de que doenças genéticas possam ser transmitidas via ART. Assim, durante a última década, foram desenvolvidos testes que possibilitam avaliar a qualidade do DNA do espermatozóide, como o Ensaio Cometa utilizado neste trabalho.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a criopreservação de sêmen humano aumenta a fragmentação do DNA do espermatozóide humano induzindo um significativo aumento de danos ao DNA (principalmente tipos 2, 3 e 4) em homens férteis e inférteis (Capítulo 4), corroborando relatos da literatura (Taylor *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2007; Askari *et al.*, 1994). Acredita-se que os danos ao DNA de espermatozoides humanos induzidos por criopreservação são predominantemente mediados por um aumento de estresse oxidativo durante o congelamento (Thomson *et al.*, 2009). Foi possível observar também (Capítulo 4) que os danos ao DNA de espermatozoides foram maiores em homens inférteis do que em homens férteis, o que tem sido fortemente associado a numerosos indicadores da saúde reprodutiva (Li *et al.*, 2007).

A adição de ácido ascórbico ao espermatozóide reduziu os danos ao DNA em homens inférteis, mas não em homens férteis. Por outro lado, o resveratrol foi capaz de reduzir os danos ao DNA tanto em homens férteis como em inférteis. O uso de 10,0 mM de resveratrol foi capaz de evitar completamente os danos ao DNA induzidos pela criopreservação em

homens inférteis (Capítulo 4). Na verdade, tanto o ácido ascórbico quanto o resveratrol apresentam atividade varredora de radicais livres (Sierens *et al.*, 2002; Agarwal, 2004) e esse é o mecanismo provável pelo qual tais compostos protegem o DNA do espermatozóide.

Em resumo, este trabalho mostrou que o grupo de indivíduos inférteis apresentou uma diminuição nas defesas antioxidantes enzimáticas e altos níveis de danos lipídicos em amostras pré e pós-congelamento quando comparadas às amostras dos controles férteis, mostrando que os espermatozóides desse grupo são mais vulneráveis aos danos oxidativos causados por seu congelamento e posterior descongelamento. Com relação aos antioxidantes resveratrol e ácido ascórbico, verificou-se que eles foram eficazes em minimizar danos oxidativos a biomoléculas induzidos pela criopreservação, embora não tenham sido capazes de recuperar a motilidade espermática perdida durante o congelamento. Sabe-se, no entanto, que, com o advento da técnica de ICSI, a motilidade não é mais um requisito fundamental para a fertilização do ovócito, podendo-se, dessa forma, utilizar esses antioxidantes sem prejuízo ao sucesso da fertilização. Dessa forma, poder-se-ia considerar a suplementação dos meios de criopreservação de sêmen humano com resveratrol e ácido ascórbico para situações onde é preferível ter uma célula com menor motilidade, porém com menores índices de danos oxidativos em proteínas e DNA.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

1. A análise seminal padrão mostrou que o grupo de indivíduos inférteis apresentou, em sêmen fresco, morfologia anormal e baixos níveis de motilidade e concentração espermáticas, quando comparados aos doadores férteis. Os demais parâmetros seminais avaliados (volume, tempo de liquefação, viscosidade, coloração, pH, e contagem de leucócitos) não mostraram diferenças significativas entre os dois grupos amostrados. O processo de criopreservação não causou alterações na concentração e morfologia espermáticas, entretanto, observou-se uma redução na motilidade espermática em ambos os grupos amostrados.
2. A adição de ácido ascórbico e resveratrol ao meio de criopreservação não induziu nenhuma alteração na concentração e morfologia dos espermatozóides, tanto de doadores férteis como de indivíduos inférteis. Observou-se, no entanto, que nenhum dos dois antioxidantes foi capaz de prevenir a diminuição de motilidade induzida pelo processo de criopreservação.
3. Os indivíduos inférteis apresentaram altos níveis de danos lipídicos em amostras de sêmen fresco (pré-congelamento), quando comparados aos doadores férteis. O processo de congelamento induziu um aumento dos níveis de danos lipídicos, tanto em indivíduos inférteis quanto nos doadores férteis. Estes danos foram significativamente maiores em indivíduos inférteis.

4. A adição de resveratrol ao meio de criopreservação preveniu os danos lipídicos induzidos pela criopreservação, tanto nos doadores férteis como nos indivíduos inférteis. A adição de ácido ascórbico ao meio de criopreservação reduziu os danos lipídicos apenas em indivíduos inférteis.

5. Os indivíduos inférteis mostraram diminuição na atividade das enzimas antioxidantes Sod e Cat em amostras de sêmen fresco (pré-congelamento), quando comparados aos doadores férteis. O processo de criopreservação induziu diminuição na atividade da Sod nos indivíduos inférteis, fato que não foi observado no grupo de doadores férteis. Observou-se, ainda, um aumento na atividade da Cat, principalmente nos doadores férteis.

6. A adição dos antioxidantes resveratrol e ácido ascórbico não alterou as atividades das enzimas Sod e Cat em doadores férteis. Entretanto, em indivíduos inférteis, observou-se um aumento na atividade de Sod.

7. A criopreservação induziu um aumento significativo de danos ao DNA em espermatozóides de homens férteis e inférteis. A adição de ácido ascórbico reduziu os danos ao DNA causados pelo processo de criopreservação apenas em doadores férteis. A adição de resveratrol 10.0mM foi capaz de evitar, completamente, os danos ao DNA induzidos pela criopreservação, tanto em indivíduos inférteis quanto nos doadores férteis.

8. Indivíduos inférteis mostraram níveis séricos de ácido úrico, TBARS e atividade de Sod maiores do que observado para os homens férteis.

7. PERSPECTIVAS

Como continuidade deste trabalho, pretende-se:

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de ácido ascórbico na motilidade espermática de indivíduos inférteis e férteis, e verificar se o ácido ascórbico, é capaz de inibir a enzima cicloxigenase-1 (COX1), envolvida na manutenção da motilidade espermática.
- Estudar o efeito da suplementação *in-vivo* com antioxidantes na melhora dos parâmetros oxidativos seminais e séricos de homens inférteis.
- Testar diferentes antioxidantes naturais e sintéticos com o objetivo de diminuir o dano oxidativo e evitar a perda de motilidade associada ao processo de congelamento-descongelamento.
- Testar outros marcadores de danos oxidativos como glutathione, atividade das enzimas glutathione peroxidase e oxidase e marcadores de apoptose espermática.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal, A. (2004). Role of antioxidants in the treatment of men infertility: an overview of the literature. **Reprod Biomed Online**, 8: 616-627.

Agarwal, A., Makker ,K., Sharma ,R. (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. **Am J Reprod Immunol**; 59:2–11.

Ahmadi, A. and Ng, S.C. (1999). Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. **J Exp Zool**, 284: 696-704.

Aitken, R.J. (1999). The Amoroso Lecture. The human spermatozoon—a cell in crisis?. **J Reprod Fertil**, 115:1–7.

Aitken, R.J.; Buckingham, D.; Harkiss, D. (1993). Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. **J Reprod & Fert**, 97, 441-450.

Alvarez, J. G., Sharma, R. K.; Ollero, M., Saleh, R., Lopez, M. C., Thomas, A. J., Jr.; Evenson, D. P., Agarwal, A. (2002). Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. **Fertil Steril**, 78: 319-329.

- Alvarez, J.G. and Storey, B.T. (1992). Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. **J Androl**; 13:232-241.
- Amann, R.P. (1995). What is semen: how does semen analysis assist in understanding the reproductive status of the male? *In*: Robaire, B.; Pryor, J.L. & Trasler, J.M. (eds.) **Handbook of Andrology**. São Francisco: American Society of Andrology.
- Andersen, A.G.; Jensen, T.K.; Carlsen, E.; Jorgensen, N.; Andersson, A.M.; Krarup, T.; Keiding, N.; Skakkebaek, N.E. (2000). High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. **Hum Reprod**, 15(2): 366-72.
- Anger, J.T.; Gilbert, B.R.; Goldstein, M. (2003). Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. **J Urol**, 170:1079-1084.
- Austin, C.R. (1952). The capacitation of the mammalian sperm. **Nature**, 170: 326.
- Bannister, J.V. and Calabrese, L. (1987). Assays for superoxide dismutase. **Methods Biochem Anal**, 32:279-312.
- Barroso, G.; Taylor, S.; Morshedi, M.; Manzur, F.; Gavino, F.; Oehninger, S. (2006). Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. **Fertil Steril**;85:149-154.
- Bolle, P.; Evandri, M.G.; Saso, L. (2002). The controversial efficacy of vitamin E for human male infertility. **Contracepcion**, 65, 313-315.

- Bell, M.; Sikka, S.C.; Rajasekaran, M.; Hellstron, W.J.G. (1993). Time course study of hydrogen peroxide induced changes in the lipid peroxidation of human sperm membranes. **Assist Reprod Tech Androl**, 5:144-150.
- Chi, H.J.; Kim, J.H.; Ryu, C.S., Lee, J.Y.; Park, J.S; Chung, D.Y.; Choi, S.Y., Kim, M.H.; Chun, E.K.; Roh, S.I. (2008). Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation médium against oxidative stress in human spermatozoa. **Hum Reprod**, 23: 1023-1028.
- Chakroun, N.F.; Théron, P.; Couturier, M.; Liméa, G.; Legrand, A.; Jouannet, P.; Auger, J. (2004). Human sperm lipid content is modified after migration into human cervical mucus. **Mol Hum Reprod**, 10:2, 137-142.
- Chohan, K.R.; Griffin, J.T.; Carrell, D.T. (2006). Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. **Andrology**, 36:321-326.
- Clermont, Y.; Rambourg, A.; Hermo, L. (1995). Trans-Golgi network (TGN) of different cell types: three-dimensional structural characteristics and variability. **Anat Rec**, 242(3):289-301.
- de Vries, K.J.; Wiedmer, T.; Sims, P.J.; Gadella, B.M. (2003). Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. **Biol Reprod**, 68(6):2122-34.

- Dotan, Y., Lichtenberg, D.; Pinchuk, I. (2004). Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Prog Lipid Res**, 3: 1–28.
- de Lamirande, E. and Gagnon, C. (1999). The dark and bright sides of reactive oxygen species on sperm function. Gagnon, C., ed. The **Male gamete: from Basic to Clinical Applications**. Vienna, IL, USA, Cache River Press, 455-468.
- de Lamirande, E. and Gagnon, C. (1993). A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. **Int J Androl**, 16:21-5.
- de Lamirande, E.; Tsai, C.; Harakat, A.; Gagnon, C. (1998). Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. **J Androl**; 19: 585–94.
- Desai, N.; Sharma, R.; Makker, K.; Sabanegh, E.; Agarwal, A. (2009). Physiologic and pathologic levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. **Fertil Steril**, 92(5):1626-31.
- Donnelly, E.T.; Steele, E.K.; MacClure, M.; Lewis, S.E.M. (2001). Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. **Hum Reprod**; 16, 1191-1199.
- Durak, I.; Yalçın, S.; Burak Cimen, M.Y.; Büyükoçak, S.; Kaçmaz, M.; Öztürk, H.S. (1999). Effects of smoking on plasma and erythrocyte antioxidant defense systems. **J Toxicol Environ Health A**, 56(6):373-8.

- Duru, N.K., Morshedi, M., Oehninger, S. (2000). Effects of Hydrogen Peroxide on DNA and Plasma Membrane Integrity of Human Spermatozoa. **Fertil Steril**, 74, 1200-1207.
- Duru, N.K.; Morshedi, M.; Oehninger, S. (2001). Effects of H₂O₂ on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. **Fertil Steril**, 74 : 1200-7.
- Esteves, S.C.; Spaine, D.M.; Cedenho, A.P. (2007). Effects of pentoxifylline treatment before freezing on motility, viability and acrosome status of poor quality human spermatozoa cryopreserved by the liquid nitrogen vapor method. **Braz J Med Biol Res**, 40(7):985-92.
- Esteves, S.C.; Sharma, R.K.; Thomas Jr A.L.; Agarwal, A. (1998). Cryopreservation of human spermatozoa with pentoxifylline improves the post-thaw agonist-induced acrosome reaction rate. **Hum Reprod**, 13:3384-9.
- Gavella, M. and Lipovac, V. (1994). Effect of pentoxifylline on experimentally induced lipid peroxidation in human spermatozoa. **Int J Androl**, 17(6):308-13.
- Gavella, M. and Lipovac, V. (1992). Pentoxifylline-mediated reduction of superoxide anion production by human spermatozoa. **Andrology** 24:37-39.
- Genesca, A.; Caballin, M.R.; Miro, R.; Benet, J.; Germ, J.R.; Egoscue, J. (1992). Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. **Human Genet**; 89:181-186.

- Glander, H.J. and Schaller, J. (1999). Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cry storage. **Mol Hum Reprod**; 5:109-115.
- Gomez, E.; Irvine, D.S.; Aitken, R.J. (1998). Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. **Int J Androl**; 21:81–94.
- Garrido, N.; Messeguer, M.; Simon, C.; Pellicer, A.; Remohi, J. (2004). Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. **Asian J Androl**. 6: 59-65.
- Grossfeld, R.; Sieg, B.; Struckmann, C.; Frenzel, A.; Maxwell, W.M.; Rath, D. (2008). New aspects of boarsemen freezing strategies. **Theriogenology**; 70:1225-1233.
- Hallak, J.; Mahran, A.; Chae, J.; Agarwal, A. (2000). Poor semen quality from patients with malignancies does not rule out sperm banking. **Urol Res**, 28:281-284.
- Hammadeh, M.E.; Askari, A.S.; Georg, T.; Rosenbaum, P.; Schmidt, W. (1999). Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. **Int J Androl**, 22:155–162.

- Hughes, C.M.; Lewis, S.E. M.; McKelvey-Martin, V.J.; Thompson, W. (1996). A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay; **Mol Hum Reprod.** 2:613-619.
- Huszar, G.; Sbracia, M.; Vigue, L.; Miller, D.J.; Shur, B.D. (1998). Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. **Biol Reprod**; 56: 1020-4.
- Huszar, G. and Vigue, L. (1994). Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. **J Androl**,15(1):71-7.
- Inoue, M. (1994). Protective mechanism against reactive oxygen species. En: The Liver. **Biology and Pathobiology**. Ed. I.M. Arias, J.L. Boyer, N. Fausto, W.B. Jacoby, D.A. Schachter & D.A. Shafritz. Raven Press, Nova York, 443-460.
- Jozwik, M.; Jozwik, M.; Kuczynski, W.; Szamatowicz, M. (1997). Nonenzymatic antioxidant activity of human seminal plasma. **Fertil Steril**, 68: 154-7.
- Kasperczyk, A.; Kasperczyk, S.; Horak, S.; Ostalowska, A.; Grucka-Mamczar, E.; Romuk, E. (2008). Assessment of semen function and lipid peroxidation among lead exposed men. **Toxicol Appl Pharmacol**; 228:378-384.

- Khosrowbeygi, A. and Zarghami, N. (2007). Levels of oxidative stress biomarkers in seminal plasma and their relationship with seminal parameters. **BMC Clin Pathol**; 7:6.
- Kodama, H.; Yamaguchi, R.; Fukuda, J.; Kasai, H.; Tanaka, T. (2001). Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. **Fertil Steril**, 68 (3):519-24.
- Kyselova, V.; Peknicova, J.; Buckiova, D.; Boubelik, M. (2003). Effects of p-nonylphenol and resveratrol on body and organ weight and in vivo fertility of outbred CD-1 mice. **Reprod Biol Endocrinol**, 1(1):30.
- Lasso, J.L.; Noiles, E.E.; Alvarez, J.G.; Storey, B.T. (1994). Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. **J Androl**, 15: 255-65.
- Lewis, S.E.M. and Agbaje, I.M. (2008). Using the alkaline comet assay in prognostic tests for male infertility and assisted reproductive technology outcomes. **Mutagenesis**, 23:163-170.
- Li, Z.; Lin, Q.; Liu, R.; Xiao, W.; Liu, W. (2010). Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. **J Androl**; 31(5):437-44.
- McKelvey-Martin, V.J.; Melia, N.; Walsh, I.K.; Johnston, S.R.; Hughes, C.M.; Lewis, S.E.M. (1997). Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel

electrophoresis assay in human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder and human sperm and male infertility. **Mutat Res**; 375:93-104.

Meseguer, M.; Garrido, N.; Simón, C.; Pellicer, A.; Remohí, J. (2004). Concentration of glutathione and expression of glutathione peroxidases 1 and 4 in fresh sperm provide a forecast of the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *J Androl*; 25(5): 773-80.

Morris, I.D.; Ilott, S.; Dixon, L.; Brisson, D.R. (2002). The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. **Hum Reprod**, 17:990-998.

Myles, D.G. (1995) How does the spermatozoon make its way to the egg and how does fertilization take place? In: Robaire, B.; Pryor, J.L. & Trasler, J.M. (eds.) **Handbook of Andrology**. São Francisco: American Society of Andrology.

Nordberg, J. and Arnér, E.S.J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**. 31/11: 1287-1312.

Naouri, M.; Ghasemzadeh, A.M.; Farzadi, L.; Shahnazi, V.; Novin, M.G. (2008). Vitamins C, E and lipid peroxidation levels in sperm and seminal plasma of

asthenoteratozoospermic and normozoospermic men. **Iranian J reprod Med**, 6:1-5.

Oehninger, S.; Acosta, A.A.; Morshedi, M.; Veeck, L.; Swanson, R.J.; Simmons, K.; Rosenwaks, Z. (1995). Corrective measures and pregnancy outcome in in vitro fertilization in patients with severe sperm morphology abnormalities. **Fertil Steril**, 50(2): 283-7.

O'Connell, M.; McClure, N.; Lewis, S.E. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Hum Reprod**, 17:704-709.

O'Flaherty, C.; Beconi, M.; Beorlegui, N. (2005). Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. **Andrologia**, 29:269-275.

Payne, M.A. and Lamb, E.J. (2004). Use of frozen semen to avoid human immunodeficiency virus type 1 transmission by donor insemination: a cost-effectiveness analysis. **Fertil Steril**, 81:80-92.

Sanocka, D. and Kurpysz, M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. **Reprod Biol Endocrinol**, 2:12-19.

Shamsi, M.B.; Kumar, R.; Dada, R. (2009). Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. **Indian J Med Res**, 127:115–23.

- Sarlos, P.; Molnar, A.; Kokai, M.; Gabor, G.; Ratky, J. (2002). Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Vet Hung**, 50(2):235-45.
- Sierens, J.; Hartley, J.A.; Campbell, M.J.; Leathen, A.J.; Woodside, J.V. (2002). In vitro isoflavone supplementation reduces hydrogen peroxide-induced DNA damage in sperm. **Teratog Carcinog Mutagen**, 22(3):227-34.
- Singh, N.P.; Muller C.H.; Berger, R.E. (2003). Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. **Fertil Ster**, 80:1420–30.
- Schuffner, A.; Morshedi, M.; Oehninger, S. (2001). Cryopreservation of fractionated, highly motile human spermatozoa: effect on membrane phosphatidylserine externalization and lipid peroxidation. **Hum Reprod**, 16(10):2148-53.
- Tarozzi, N.; Bizzaro, D.; Flamigni, C.; Borini, A. (2007). Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. **Reprod Biomed Online**, 14:746–57.
- Tavilani, H.; Doosti, M.; Nourmohammadi, I.; Mahjub, H.; Vaisiraygani, A.; Salimi, S. (2007). Lipid composition of spermatozoa in normozoospermic and asthenozoospermic males. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**.77:45-50.
- Thuwanut, P.; Chatdarong, K.; Techakumphu, M.; Axnér, E. (2008). The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. **Theriogenology**, 70:233-240.

- Tournaye, H.; Goossens, E.; Verheyen, G.; Frederickx, V.; De Block, G.; Devroey, P.; Van Steirteghem, A. (2004). Preserving the reproductive potential of men and boys with cancer: current concepts and future prospects. **Hum Reprod Update**, 10:525-532.
- Yoshimoto, T.; Nakamura, S.; Yamauchi, S.; Muto, N.; Nakada, T.; Ashizawa, K.; Tatemoto, H. (2008). Improvement of the post-thaw qualities of Okinawan native pig spermatozoa frozen in a extender supplemented with ascorbic acid 2-O-alpha-glucoside. **Cryobiology**, 57:30-36.
- Ibrahim, S.F.; Osman, K.; Das, S.; Othman, A.M.; Majid, N.A.; Rahman, M.P. (2008). A study of the antioxidant effect of alpha lipoic acids on sperm quality. **Clinics (Sao Paulo)**, 63(4):545-50.
- James, P.S.; Wolfe, C.A.; Mackie, A.; Ladha, S.; Prentice, A.; Jones, R. (1999). Lipid dynamics in the plasma membrane of fresh and cryopreserved human spermatozoa. **Hum Reprod**, 14(7):1827-32.
- Lewis, S.E.; Agbaje, I.; Alvarez, J. (2008). Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. **Syst Biol Reprod Med**, 54(3):111-25.
- Lohmann, W.; Pagel, D.; Penka, V. (1984). Structure of ascorbic acid and its biological function. Determination of the conformation of ascorbic acid and isoascorbic acid by infrared and ultraviolet investigations. **Eur J Biochem**, 138(3):479-80.

- Ollero, M.; Gil-Guzman, E.; Lopez, M.C.; Sharma, R.K.; Agarwal, A.; Larson, K.; Evenson, D.; Thomas, A.J. Jr; Alvarez, J.G. (2001). Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. **Hum Reprod**, 16(9):1912-21.
- Paasch, U.; Sharma, R.K.; Gupta, A.K; Grunewald, S.; Mascha, E.J.; Thomas, A.J. Jr; Glander, H.J.; Agarwal, A. (2004). Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. **Biol Reprod**, 71(6):1828-37.
- Park, E.S.; Kim, S.D.; Lee, M.H.; Lee, H.S.; Lee, I.S.; Sung, J.K.; Yoon, Y.S. (2003). Protective effects of N-acetylcysteine and selenium against doxorubicin toxicity in rats. **J Vet Sci**, 4(2):129-36.
- Rossi, T.; Mazzilli, F.; Delfino, M.; Dondero, F. (2001). Improved human sperm recovery using superoxide dismutase and catalase supplementation in semen cryopreservation procedure. **Cell Tissue Bank**, 2(1):9-13.
- Sharlip, I.D.; Jarow, J.P.; Belker, A.M.; Lipshultz, L.I.; Sigman, M.; Thomas, A.J.; Schlegel, P.N.; Howards, S.S.; Nehra, A.; Damewood, M.D.; Overstreet, J.W.; Sadovsky, R. (2002). Best practice policies for male infertility. **Fertil Steril**, 77(5):873-82.
- Stanic, P.; Sonicki, Z; Suchanek, E. (2002). Effect of pentoxifylline on motility and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. **Int J Androl**, 25(3):186-90.

- Tash, J.A.; Applegarth, L.D.; Kerr, S.M.; Fins, J.J.; Rosenwaks, Z.; Schlegel, P.N. (2003) Postmortem sperm retrieval: the effect of instituting guidelines. **J Urol**, 170(5):1922-5.
- Thomson, L.K.; Fleming, S.D.; Aitken, R.J.; De Iuliis, G.N.; Zieschang, J.A.; Clark, A.M. (2009). Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. **Hum Reprod**, 24(9):2061-70.
- Thurston, L.M.; Watson, P.F.; Holt, W.V. (2002). Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation? **Cryo Letters**, 23(4):255-62.
- Yoo, K.M.; Kim, S.; Moon, B.K.; Kim, S.S.; Kim, K.T.; Kim, S.Y.; Choi, S.Y. (2006). Potent inhibitory effects of resveratrol derivatives on progression of prostate cancer cells. **Arch Pharm (Weinheim)**, 339(5):238-41.

ANEXOS

ANEXO I

PARÂMETROS SEMINAIS AVALIADOS EM SÊMEN FRESCO

Tabela 1. Parâmetros seminais avaliados em homens férteis (n= 10) e inférteis (n= 20) previamente ao processo de criopreservação

N°	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO SÊMEN								MORFOLOGIA ESPERMÁTICA	
	MICROSCÓPICA					MACROSCÓPICA			OMS (%)	Kruger (%)
	Volume (mL)	Liq. (min)	Vis.	Cor	pH	Motilidade (%)	Concentração (x10 ⁶ cel)	Teste de Endtz		
Férteis										
01	3,00	30,00	normal	normal	7,5	57,00	67,00	negativo	31,00	15,00
02	2,20	30,00	normal	normal	7,5	50,00	49,30	negativo	33,00	16,00
03	3,00	30,00	normal	normal	7,5	65,58	40,66	negativo	31,00	15,00
04	5,00	30,00	normal	normal	7,5	88,42	38,66	negativo	36,00	15,00
05	2,20	30,00	normal	normal	7,5	55,23	54,00	negativo	32,00	17,00
06	3,10	30,00	normal	normal	7,5	73,89	76,78	negativo	44,00	15,00
07	2,60	30,00	normal	normal	7,5	65,00	86,66	negativo	36,00	23,00
08	2,40	30,00	normal	normal	7,5	73,60	69,33	negativo	40,00	24,00
09	3,15	30,00	normal	normal	7,5	82,33	74,88	negativo	39,00	19,00
10	2,80	30,00	normal	normal	7,5	66,00	53,00	negativo	37,00	18,00
Md	2,95 ± 0,08	30,00	normal	normal	7,5	67,70 ± 1,21	61,03 ± 1,62	negativo	35,90 ± 0,43	17,70 ± 0,34
Inférteis										
11	1,60	30,00	normal	normal	7,5	12,50	18,00	negativo	13,00	05,00
12	4,60	30,00	normal	normal	7,5	21,00	22,66	negativo	10,00	03,00
13	2,30	30,00	normal	normal	7,5	54,20	79,33	negativo	16,00	09,00
14	4,00	30,00	normal	normal	7,5	88,42	95,00	negativo	20,00	08,00
15	2,50	30,00	normal	normal	7,5	73,98	73,00	negativo	11,00	02,00
16	3,50	30,00	normal	normal	7,5	37,50	16,00	negativo	15,00	05,00
17	3,90	30,00	m. au.	normal	7,5	53,00	50,66	negativo	23,00	13,00
18	1,80	30,00	normal	normal	7,5	61,00	97,60	negativo	27,00	11,00
19	1,30	30,00	normal	normal	7,5	46,00	66,33	negativo	09,00	03,00
20	1,60	30,00	m. au.	normal	7,5	42,00	21,00	negativo	17,00	07,00
21	3,10	30,00	normal	normal	7,5	37,00	19,66	negativo	14,00	05,00
22	1,90	30,00	normal	normal	7,5	38,00	48,33	negativo	19,00	13,00
23	2,90	30,00	normal	normal	7,5	53,00	50,66	negativo	23,00	13,00
24	2,50	30,00	normal	normal	7,5	33,00	07,00	negativo	03,00	01,00

25	4,10	30,00	normal	normal	7,5	19,00	17,96	negativo	03,00	01,00
26	2,00	30,00	normal	normal	7,5	54,87	41,00	negativo	13,00	04,00
27	2,00	30,00	normal	normal	7,5	37,60	44,00	negativo	10,00	07,00
28	1,90	30,00	normal	normal	7,5	47,36	38,00	negativo	15,00	06,00
29	1,40	30,00	m. au.	normal	7,5	41,66	80,50	negativo	19,00	08,00
30	4,90	30,00	normal	normal	7,5	48,06	25,66	negativo	06,00	03,00
Md	2,69 ± 0,06	30,00	normal	normal	7,5	44,96 ± 0,89	45,62 ± 1,40	negativo	14,30 ± 0,33	6,35 ± 0,20

ANEXO II

ANÁLISES SÉRICAS EM HOMENS FÉRTEIS E INFÉRTEIS

Tabela 2. Valores médios dos produtos de reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), atividade das enzimas superóxido dismutase (Sod) e catalase (Cat), e níveis de ácido úrico avaliados em soro de homens férteis (n=10) e inférteis (n=20)

Nº	TBARS (nmol/mL)	Sod (USod/g de proteína)	Cat (UCat/mg de proteína)	ácido úrico (mg/dL)
Férteis				
01	3,40 ± 1,09	3,40 ± 0,19	2,90 ± 0,12	2,60 ± 0,01
02	4,10 ± 0,57	1,80 ± 0,57	3,40 ± 0,07	3,10 ± 0,03
03	2,50 ± 1,85	0,70 ± 1,85	4,90 ± 0,41	3,20 ± 0,01
04	1,90 ± 1,06	1,60 ± 1,06	0,70 ± 1,94	2,60 ± 0,03
05	2,30 ± 0,34	1,00 ± 0,34	1,60 ± 0,27	2,60 ± 0,05
06	1,70 ± 1,01	1,10 ± 0,32	0,90 ± 0,56	3,20 ± 0,02
07	1,50 ± 0,41	1,70 ± 2,18	1,01 ± 0,70	3,50 ± 0,03
08	2,36 ± 0,09	1,10 ± 0,62	2,10 ± 0,43	4,00 ± 0,04
09	2,30 ± 1,67	2,10 ± 1,36	1,20 ± 0,54	3,80 ± 0,01
10	3,10 ± 0,89	3,00 ± 0,59	3,30 ± 1,36	3,10 ± 0,01
Md	2,52 ± 0,80	1,75 ± 0,88	2,20 ± 1,38	3,17 ± 0,67
Inférteis				
11	5,78 ± 0,03	4,79 ± 0,00	2,33 ± 0,10	5,60 ± 0,02
12	4,64 ± 0,09	1,38 ± 0,00	1,02 ± 0,30	5,80 ± 0,01
13	3,43 ± 0,06	1,70 ± 0,07	0,30 ± 0,03	5,50 ± 0,02
14	6,29 ± 0,06	0,86 ± 0,02	1,07 ± 0,18	4,80 ± 0,03
15	9,77 ± 0,29	2,98 ± 0,07	1,90 ± 0,55	6,40 ± 0,04

16	5,60 ± 0,00	0,87 ± 0,02	1,75 ± 0,16	4,90 ± 0,02
17	4,20 ± 1,04	2,20 ± 1,12	1,80 ± 0,06	5,00 ± 0,01
18	5,00 ± 0,25	1,70 ± 0,09	2,10 ± 1,00	6,30 ± 0,01
19	2,50 ± 1,05	1,20 ± 0,12	3,10 ± 0,15	6,20 ± 0,02
20	1,70 ± 0,52	1,40 ± 0,05	1,00 ± 0,21	5,80 ± 0,01
21	5,00 ± 1,07	3,10 ± 0,12	4,50 ± 0,06	5,10 ± 0,02
22	3,00 ± 0,23	4,30 ± 0,14	3,10 ± 0,07	4,60 ± 0,01
23	3,90 ± 1,02	3,90 ± 1,01	2,90 ± 0,04	5,90 ± 0,03
24	6,30 ± 1,61	5,70 ± 0,07	3,60 ± 0,11	4,50 ± 0,03
25	5,80 ± 1,12	5,10 ± 0,43	1,80 ± 0,02	5,70 ± 0,01
26	5,00 ± 0,94	1,80 ± 0,11	2,70 ± 0,04	4,30 ± 0,05
27	4,50 ± 0,83	3,50 ± 0,47	4,10 ± 0,16	4,80 ± 0,02
28	4,70 ± 0,31	2,10 ± 0,07	1,06 ± 0,23	5,90 ± 0,03
29	8,00 ± 0,05	1,70 ± 0,10	1,80 ± 0,17	5,60 ± 0,02
30	6,30 ± 0,09	2,80 ± 1,11	3,40 ± 0,08	4,30 ± 0,01
Md	5,07 ± 1,84*	2,65 ± 1,46*	2,27 ± 1,13	5,35 ± 0,49*

Valores seguidos por * diferem significativamente do grupo fértil (grupo controle) pelo teste T para amostras independentes ($p \leq 0,05$).

Valores de referência: ácido úrico: 2,5 a 7,0 mg/dL

Observação: O ensaio do TBARS foi realizado segundo Durak et al., 1999; o ensaio de Sod foi o descrito por Bannister & Calabrese, 1987; o ensaio de Cat foi realizado segundo Aebi, 1984 e a determinação do ácido úrico foi realizada através do kit “Ácido úrico”(LABTEST).

ANEXO III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA:

1.1 Título

“COMPARAÇÃO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DO RESVERATROL E DO ÁCIDO ASCÓRBICO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO”.

1.2 Unidades executoras

Laboratório de estresse oxidativo e antioxidantes-INBI/UCS

Clínica Conception- Caxias do Sul

1.3 Coordenação

Prof.^a Dra.Mirian Salvador (INBI e DCBM /UCS)

1.4 Colaboração

Prof . Dr. Bernardo Erdtman (UCS)

Prof. Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto (UCS)

1.5 Endereços para contato

Prof.^a Dra. Mirian Salvador.

Instituto de Biotecnologia/UCS.

Rua Francisco Getúlio Vargas, nº 1.130. CEP: 95079-560

Fone/Fax: (054) 3218-2293.

E-mail: msalvado@ucs.br

Dr. Bernardo Erdtmam

Instituto de Biotecnologia/UCS

Rua Francisco Getúlio Vargas, nº 1.130, CEP 95079-560

Fone/Fax: (054) 3218-2664

e-mail: erdtmann@redemeta.com.br

Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto

Instituto de Biotecnologia/UCS

Rua Francisco Getúlio Vargas, nº 1.130, CEP 95079-560

Fone/Fax: (054) 3218-2664

e-mail: fabio@conception-rs.com.br

Msc. Márcia Esteves Garcez

Instituto de Biotecnologia/UCS

Rua Francisco Getúlio Vargas, nº 1.130, CEP 95079-560

Fone/Fax: (054) 3218-2664

e-mail: marciagarcez@ymail.com

2. INFORMAÇÕES AO VOLUNTÁRIO

2.1 Participação no projeto

O voluntário participará deste projeto através da doação de amostras de sêmen e sangue para realização de análises bioquímicas e morfológicas. Também será solicitado o preenchimento de um questionário (conforme modelo em anexo).

2.2 Duração da atividade

Aproximadamente 30 minutos.

2.3 Riscos e desconfortos

a) Coleta de sangue

Não há riscos para o voluntário participante do projeto. O desconforto previsto resume-se à retirada de uma amostra de, aproximadamente, 10 ml de sangue venoso do braço direito ou esquerdo, feita por profissional capacitado. Eventualmente poderão ocorrer dor e hematomas na região da picada da agulha.

b) Coleta de sêmen

Não há riscos para o voluntário participante do projeto. O desconforto previsto está relacionado com os aspectos emocionais da coleta do material.

2.4 Benefícios esperados

O resultado das análises será comunicado ao voluntário, que ficará ciente dos resultados obtidos.

2.5 Critérios de confidencialidade, privacidade e anonimato

Todas as análises serão realizadas de forma confidencial, não sendo identificado o voluntário. As publicações não incluirão qualquer referência ao nome do doador ou outros dados que possam identificá-lo.

2.6 Destino do material biológico coletado

Após a realização das análises as amostras de sêmen e sangue serão descartadas, não podendo ser utilizadas para outros fins.

2.7 Interrupção da participação

A qualquer momento o voluntário, se for de sua vontade, poderá interromper sua participação no projeto de pesquisa, bastando para tanto informar à coordenação do projeto.

3. TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu,, após ler este documento e uma vez esclarecida a minha participação no projeto de pesquisa aqui referido, concordo em:

- a) responder adequadamente ao questionário em anexo;
- b) doar uma amostra de sêmen obtida por meio de masturbação, e uma amostra de sangue venoso, coletada por pessoa tecnicamente habilitada, com material totalmente descartável, as quais serão utilizadas para realização de análises bioquímicas e morfológicas.

Assinatura do voluntário:

Assinatura do coordenador do projeto:

Local e data:

ANEXO IV

ENTREVISTA REALIZADA COM OS PARTICIPANTES DO ESTUDO

FICHA DE INFORMAÇÕES DO VOLUNTÁRIO

1) N.º das amostras:

a) sêmen:

b) soro:

2) Data da coleta:

3) Nome:

4) Idade:

5) Peso:

6) Endereço:

7) Está fazendo uso de algum tipo de medicação?

a) () Sim b) () Não

c) Qual?

d) É de uso contínuo?

8) Faz uso de complementos vitamínicos?

a) () Sim b) () Não

c) Quais?

9) Fumante?

a) () Sim b) () Não c) () ex fumante

d) No caso de ser fumante, fuma quantos cigarros por dia?

10) Têm hábito de tomar chimarrão? Quantas vezes ao dia?

a) () Sim, vezes ao dia. b) () Não

11) Consome café diariamente?

a) () Sim, xícaras. b) () Não

Obs:

Data:

Assinatura do responsável pela entrevista:

ANEXO V

CURRICULO LATTES DA CANDIDATA