



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA - UFSM
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**EFEITO *in vitro* DE *Paullinia cupana* NO METABOLISMO
OXIDATIVO DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS
EXPOSTOS AO CLORETO DE METILMERCÚRIO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mara Rejane Fantinel

Santa Maria, RS, Brasil
2012

**EFEITO *in vitro* DE *Paullinia cupana* NO METABOLISMO
OXIDATIVO DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS
EXPOSTOS AO CLORETO DE METILMERCÚRIO**

Mara Rejane Fantinel

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação de Ciências Biológicas, Área de concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

Santa Maria, RS, Brasil
2012

F216e Fantinel, Mara Rejane
Efeito *in vitro* de *Paullinia cupana* no metabolismo oxidativo de espermatozóides humanos expostos ao cloreto de metilmercúrio / por Mara Rejane Fantinel. – 2012.
87 f. ; il. ; 30 cm

Orientador: Ivana Beatrice Mânica da Cruz
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas : Bioquímica Toxicológica, RS, 2012

1. Mercúrio 2. Toxicidade 3. Guaraná 4. Espermatozóides 5. Infertilidade
I. Cruz, Ivana Beatrice Mânica da II. Título.

CDU 577.1

Ficha catalográfica elaborada por Cláudia Terezinha Branco Gallotti – CRB 10/1109
Biblioteca Central UFSM

©2012

Todos os direitos autorais reservados a Mara Rejane Fantinel. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua Olavo Bilac, 32/404, Santa Maria, RS, CEP 97015440,

Fone: (55) 99785974; Endereço eletrônico: marafantinel@hotmail.com

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA - UFSM
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**A comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado**

**EFEITO *in vitro* DE *Paullinia cupana* NO METABOLISMO OXIDATIVO
DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS EXPOSTOS AO CLORETO DE
METILMERCÚRIO**

Elaborada por
Mara Rejane Fantinel

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas

Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dr^a
(Presidente/Orientadora)

Maria Izabel Ugalde da Rocha, Dr^a (UFSM)

Daniela Bitencourt Leal, Dr^a (UFSM)

Guilherme Bresciani, Dr (UFSM)
(Suplente)

Santa Maria, 14 de fevereiro de 2012.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família e ao meu namorado, que incondicionalmente estão ao meu lado, e a quem amo com todo amor que possa existir em meu coração.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, não somente pelo dom da vida, mas principalmente por estar sempre iluminando e guiando meus passos.

À minha família que é meu porto-seguro, meu alicerce e que incondicionalmente está ao meu lado, me apoiando e compreendendo minha ausência. Vocês, meus amores estão sempre comigo aonde quer que eu vá, pois somos unidos pela alma e pelo coração. Amo muito, muito, muito vocês!!

Ao meu “namorado”, Carlos Eduardo...creio que os corações escolhem nossos amores, antes mesmo de sabermos dos defeitos e/ou qualidades destes. Assim, meu amor, meu companheiro e meu confidente, tenho muito a te agradecer, principalmente por ter me “aturado” durante longos dias de mau humor e ausência. Por tentar me fazer sorrir quando as lágrimas teimavam em rolar. Por estares ao meu lado nas minhas adversidades e nas minhas conquistas. Além de, é claro, ter me apoiado inteiramente na realização deste trabalho. Te amo!

À minha sogra e meu sobrinho (emprestado), Georgina e Gabriel, muito obrigada por todo apoio e carinho que me proporcionam.

Ao Prof. Dr. Matias Nunes, o qual não foi apenas um professor, e sim um mestre que desde os tempos da faculdade me indica caminhos. Muito obrigada por naquela tarde, no corredor da faculdade, me oferecer a oportunidade de fazer mestrado. Muito obrigada por mais uma vez estares me estendendo a mão! Muito obrigada por acreditares em mim!

À Prof^a. Dr^a. Ivana, minha orientadora, a qual das intermináveis discussões, tentativas, erros e acertos, me proporcionou três anos de convivência não só com o conhecimento, como também com pessoas maravilhosas da família do lab. de Biogenômica. Muito obrigada por acreditares e confiares em mim!

À família Biogenômica, não teria como citar os nomes de todos, por isso, fica aqui minha imensa gratidão pelas conversas, risadas, trocas de conhecimentos, cafezinho, chimarrão, enfim, pela convivência durante estes três anos, e mais alguns que virão!

Dizem que Deus colocou anjos desprovidos de asas, e a eles nomeou de amigos. Assim, vocês minhas amigas-irmãs, ou simplesmente anjos sem asas,

Ciberen, Renata, Cacinelí, Clarice e Graciele, muito obrigada pela amizade, pela compreensão, pelas conversas, conselhos e trocas de idéias. Muito obrigada por estarem sempre ao meu lado, por mais que estivessem longe, ou perto, comemorando minhas vitórias e me auxiliando em minhas dificuldades. Muito obrigada pela AMIZADE!

Às minhas colegas de laboratório, Thaís, Greice e Maria Fernanda, muito obrigada pelas trocas de idéias, auxílios e sugestões, muito obrigada por estes anos de coleguismo e trocas de experiências!

À minha segunda mãe, Tia Vera, e ao meu mano de coração, Léo, muito obrigada por todas as mensagens de carinho, torcida e apoio. Com certeza vocês foram escolhidos pelo meu coração, e são mais uns desses anjos, verdadeiros presentes de Deus.

Ao Prof.Dr. Euler Esteves Ribeiro e sua equipe da Universidade Abertada Terceira Idade da Universidade do Estado do Amazonas por todo apoio recebido.

Às minhas ICs, ou melhor, colegas, Eliza e Francine, sou grata pelas horas e dias de trabalho, expectativas, discussões e troca de informações. Desejo a vocês muito sucesso e que novas pesquisas e desafios venham à nós! Foi uma honra ter trabalhado ao lado de vocês.

Aos doadores, muito obrigada pelo auxílio, por terem me doado antes de qualquer coisa um pouco do tempo de vocês. Muito obrigada pela confiança e credibilidade em mim e em minha pesquisa.

À Prof^a. Dr^a. Maria Izabel, Prof^a. Dr^a. Daniela Bitencourt e ao Prof. Dr. Guilherme Bresciani por aceitarem meu convite para fazer parte da banca de avaliação da minha dissertação. Tenho certeza que suas críticas, comentários e/ou sugestões serão de grande valia para com este trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, pelos ensinamentos ao longo do mestrado, em especial à Prof^a. Dr^a. Vera Morsh, que me auxiliou nos momentos mais oportunos ao longo destes anos.

Agradeço a CAPES, pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que estiveram ao meu lado, todos os que não foram citados aqui, não por serem menos importantes, meu muito obrigado!

Posso ter defeitos, viver ansiosa e ficar irritada algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo e que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um "não". É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo.

(Fernando Pessoa)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITO *in vitro* DE *Paullinia cupana* NO METABOLISMO OXIDATIVO DE ESPERMATOZÓIDES HUMANOS EXPOSTOS AO CLORETO DE METILMERCÚRIO

AUTOR: Mara Rejane Fantinel
ORIENTADORA: Ivana Beatrice Mânica da Cruz
DATA E LOCAL DA DEFESA: Santa Maria, 14 de fevereiro, 2012.

Pesquisas sugerem que um dos mecanismos de toxicidade do metilmercúrio (MeHg) é a promoção de estresse oxidativo, responsável pela peroxidação lipídica de membranas celulares, bem como genotoxicidade. A exposição ao MeHg, têm diversos efeitos adversos no sistema reprodutor masculino, como deterioração na qualidade espermática, degeneração testicular e infertilidade. Uma vez que espermatozoides humanos são vulneráveis, torna-se relevante analisar a proteção antioxidante de plantas frente à exposição ao MeHg. Entre os suplementos alimentares brasileiros que possuem compostos bioativos está o guaraná (*Paullinia cupana*, Mart.), que é rico em cafeína, metaxantinas, catequinas e outros. Estudos prévios mostraram que o guaraná tem função antioxidante, antimutagênica e anticarcinogênica, e ainda, propriedades que poderiam ter efeito protetor sobre células espermáticas expostas ao MeHg. Portanto, foi realizada aqui uma investigação *in vitro* do papel protetor do guaraná (*Paullinia cupana*, Mart.) sobre a viabilidade e modulação do estresse oxidativo em espermatozoides humanos expostos a intoxicação por MeHg. Amostras de esperma humano foram coletadas, as células foram contadas, aliqüotadas e submetidas a quatro tratamentos: controle negativo (C); exposição ao MeHg (MeHg; 60 μ M); suplementação com extrato de guaraná (Gua, 10 mg/mL) e exposição ao MeHg suplementados com extrato de guaraná (MeHg-Gua). Durante o tratamento, as amostras foram mantidas a 37°C, 95% de CO₂. A viabilidade dos espermatozoides foi analisada por ensaio de redução MTT. A lipoperoxidação foi estimada pela determinação do derivado de ácido tiobarbitúrico de MDA (TBA-MDA), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi verificado pelo ensaio com diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína fluorimétrico (DCFH-DA ensaio). A carbonilação de proteínas e tiol foram avaliados por espectrofotometria. Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento com guaraná aumentou a viabilidade de células espermáticas expostas ao MeHg, bem como reduziu a lipoperoxidação, EROs e os níveis de carbonilação de proteínas. Desta forma, conclui-se que o extrato de guaraná mostrou efeito protetor sobre o esperma humano expostos ao MeHg *in vitro*.

Palavras-chave: mercúrio; toxicidade; guaraná; espermatozoides; infertilidade.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECT OF *Paullinia cupana* *in vitro* oxidative metabolism HUMAN SPERM EXPOSED TO CHLORIDE METHYLMERCURY

AUTHOR: Mara Rejane Fantinel
ADVISOR: Prof^a. Dr^a. Ivana Beatrice Mânica da Cruz
DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, 2012

Investigations suggests that methylmercury (MeHg) toxicity is related to oxidative stress promotion caused by lipid peroxidation of cell membranes as well as genotoxicity. The methylmercury (MeHg) exposition causes production of adverse effects as deterioration of semen quality, testicular degeneration, and male reproductive failure. Since human sperm is a vulnerable cell investigations analyzing the antioxidant protection of plant extracts on MeHg exposition is relevant. Among Brazilian food supplements we found guaraná (*Paullinia cupana*, Mart.) which is rich in caffeine, other metaxanthynes and catechins. Previous studies showed that guaraná present antioxidant, antimutagenic, anticarcinogenic properties that could exert protective effect of sperm cells exposed to MeHg. Therefore, an *in vitro* protective role of guaraná (*Paullinia cupana*, Mart.) viability and oxidative stress modulation of human sperm cells exposed to methylmercury intoxication was here in investigated. The human sperm cell collected from donators were counted, aliquoted and submitted to four treatments negative control (C), MeHg exposition (MeHg, 60 μ M); (3) Guaraná supplementation (Gua, 10 mg/mL) and MeHg exposition plus guaraná supplementation (MeHg-Gua). During the treatment exposition the samples were maintained at 37°C at 95% CO₂ incubation. The viability of spermatozoa was analyzed by MTT reduction assay. Lipoperoxidation was estimated by determination of the thiobarbituric acid derivative of MDA (TBA-MDA) using a sensitive high-performance liquid chromatographic (HPLC), reactive oxygen species (ROS) was verified by testing with fluorimetric 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay. Protein carbonylation and thiol were evaluated spectrophotometrically. The guaraná treatment increase the sperm viability exposed to MeHg as well as decreased the lipoperoxidation, ROS and protein carbonylation levels. Thus, we conclude that the guaraná showed *in vitro* protective effect of human sperm against MeHg exposition.

Key words: mercury, toxicity, guarana, sperm, infertility.

LISTA DE FIGURA

Artigo

Figure 1 - Viability of sperm cells by MTT assay

63

LISTA DE TABELA

Artigo

Table 1 - Comparison among human sperm oxidative metabolism biomarkers exposed to methylmercury (MeHg) and guaraná (*Paullinia cupana*) supplementation.

65

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT – Catalase

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DNPH – Dinucleotídio fosfato

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

G6PD – Glicose 6-fosfato desidrogenase

GPx – Glutaciona peroxidase

GPx5 – Glutaciona peroxidase 5

GSH – Glutaciona reduzida

H₂O – Água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

Hg – Mercúrio

Hg⁺ - mercúrio mercuroso

Hg⁺⁺ - mercúrio mercúrico

Hg⁰ – mercúrio elementar ou mercúrio metálico

HgCl₂ – Cloreto de mercúrio

MDA - Malondialdeído

MeHg – Metilmercúrio

MeHgCl₂ – Cloreto de metilmercúrio

NPSH – Tióis não-protéicos

OH⁺ - Radical hidroxila

PUFAs – Polyunsaturated fatty acid, ou ácidos graxos poliinsaturados

SH – Tióis protéicos

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual encontra-se no item ARTIGO CIENTÍFICO. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e representam à íntegra deste estudo.

Os itens DISCUSSÃO E CONCLUSÕES, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS referem-se somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO desta dissertação.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Toxicologia do Mercúrio	19
2.1.1 Aspectos gerais.....	19
2.1.2 Impactos na saúde humana exposta ao mercúrio.....	21
2.1.3 Metilmercúrio.....	23
2.1.3.1 Metilação do mercúrio.....	23
2.1.3.2 Toxicidade do metilmercúrio.....	23
2.1.3.3 Estresse oxidativo e mercúrio.....	24
2.2 Agentes Antioxidantes	25
2.2.1 <i>Paullinia cupana</i>	26
2.3 Estresse oxidativo e infertilidade masculina	28
2.3.1 Papel fisiológico e origem das EROS no Sistema Reprodutivo Masculino.....	29
2.3.2 Origem de EROs nos espermatozoides.....	29
2.3.3 Vulnerabilidade dos espermatozóides ao estresse oxidativo.....	31
2.3.4 Desbalanço oxidativo: efeito do estresse oxidativo no sistema reprodutivo masculino.....	32
2.3.4.1 Peroxidação Lipídica.....	32
2.3.4.2 Motilidade e estresse oxidativo.....	34
2.3.4.3 Genotoxicidade dos espermatozoides via estresse oxidativo.....	34
2.3.4.4 Apoptose dos espermatozoides via estresse oxidativo.....	35
2.3.5 Papel dos compostos antioxidantes na produção e morfofisiologia do espermatozoide.....	35
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo Geral	37
3.2 Objetivos Específicos	37
ARTIGO CIENTÍFICO	38
Antioxidative potential of guaraná (<i>Paullinia cupana</i>) against methylmercury induced intoxication in spermatozoa <i>in vitro</i>	39
4 DISCUSSÃO	67
5 CONCLUSÃO	73
REFERENCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

O mercúrio (Hg) está entre os metais que apresentam grande toxicidade ao ser humano, provavelmente por desencadear um aumento no estresse oxidativo (VEIGA et al., 2002; BOUJBIHA et al., 2009). As concentrações tóxicas no sangue humano variam de 0,04-2,2 mg/mL, 0,4-22 ug/ml (TOXNET, 2011).

O vapor de mercúrio ou mercúrio elementar é a forma mais comumente encontrada no ambiente. Entretanto, quando este se combina com outras moléculas pode originar formas mais tóxicas. O mercúrio inorgânico, gerado a partir da combinação do vapor de mercúrio com cloro, oxigênio ou enxofre, é facilmente encontrado, como por exemplo, em amálgamas dentários. Já o metilmercúrio (MeHg), é originário da ligação covalente do vapor de mercúrio com moléculas que contenham carbono, é altamente tóxico e a contaminação por este derivado ocorre principalmente através da ingestão de peixes (BISINOTI e JARDIM, 2004; MIRANDA et al., 2007; BOUJBIHA et al., 2009).

A formação do MeHg se dá por um processo chamado de metilação. Esta reação ocorre quando o vapor de mercúrio solubiliza-se e entra em contato com bactérias e microorganismos aquáticos (água doce ou salgada) capazes de realizar a ligação de um grupo metila ao mercúrio (PINHEIRO et al., 2000; WASSERMAN et al., 2001; BISINOTI e JARDIM, 2004; MIRANDA et al., 2007). Sob esta forma, o MeHg entra na cadeia alimentar aquática, chegando aos seres humanos em concentrações elevadas devido a sua bioacumulação nos tecidos (BISINOTI e JARDIM, 2004; MIRANDA et al., 2007).

Nos seres humanos, o MeHg é absorvido lentamente no trato gastrointestinal (PINHEIRO et al., 2000). Uma vez absorvido, o metilmercúrio combina-se com grupos sulfidrilas (-SH) de algumas biomoléculas, inibindo sistemas enzimáticos (PINHEIRO et al., 2000; MIRANDA et al., 2007; BOUJBIHA et al., 2009; TOXNET, 2011), desencadeando assim, um estado de estresse oxidativo, principalmente, devido a um aumento de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na mitocôndria ocorrendo então, lipoperoxidação, bem como danos ao ácido desoxirribonucléico (DNA) e pela depleção dos grupos -SH de moléculas endógenas (BOUJBIHA et al., 2009).

Diversos estudos experimentais e epidemiológicos têm mostrado que a exposição ao mercúrio, particularmente ao MeHg, está associada a efeitos neurotóxicos (DOLBEC et al., 2000; MARTINS et al., 2009), danos no sistema imunológico (MOSZCZYN´SKI et al., 1998), ao sistema cardiovascular (VIRTANEN et al., 2007), causando também genotoxicidade (GROTTO et al., 2009). Além disso, um número crescente de estudos, envolvendo homens e animais, tem associado a intoxicação por mercúrio às disfunções reprodutivas masculinas, como por exemplo, espermatogênicas e esteroidogênese. Isto ocorre, principalmente pela ação dos compostos do mercúrio sobre as funções testiculares, incluindo a diminuição na produção dos níveis de hormônios andrógenos (RAO e SHARMA, 2001; BOUJBIHA et al., 2009; BLOOM et al., 2011; FOSATO DA SILVA et al., 2011) e a redução de componentes secretados pelo epidídimo, os quais são necessários para a maturação dos espermatozoides.

Além do MeHg outro composto com alto potencial de toxicidade é o cloreto de metilmercúrio (MeHgCl_2) que é um composto sólido branco, com alta solubilidade na água, o que o torna uma das formas mais tóxicas quando comparada com outros compostos de mercúrio. Anualmente, toneladas de MeHg_2 são liberadas na atmosfera a partir de processos industriais e da incineração do lixo (BOUJBIHA et al., 2009). Este composto também apresenta um grande impacto negativo à saúde humana (TAN et al., 2009) e tem sido associado a toxicidade ao sistema reprodutivo masculino.

A exposição ao mercúrio e seus derivados do sistema reprodutivo masculino, resulta em uma redução na motilidade espermática e na velocidade curvilínea e em ruptura acrossômica localizada na cabeça do espermatozóide, formando assim microvesículas de tamanho variado (ALABI et al., 1985; CASTELLINI et al., 2009). A exposição de camundongos ao MeHg também mostrou afetar o desempenho reprodutivo dos animais (RAO e SHARMA, 2001; CASTELLINI et al., 2009; BLOOM et al. 2011; FOSATO DA SILVA et al., 2011). Alterações morfológicas e diminuição na contagem de espermatozoides também foram observadas em macacos expostos ao MeHg (MOHAMED et al., 1987).

Um estudo, conduzido por Liu e colaboradores (2011), mostrou que a exposição de vermes nematodos (*Caenorhabditis elegans*) ao mercúrio na influenciou a morfogênese dos machos, interrompendo o desenvolvimento das

estruturas reprodutivas específicas e causando grande quantidade de estresse oxidativo. Este estudo sugeriu que o mercúrio seria capaz de induzir teratogênese nos machos via estresse oxidativo, já que o pré-tratamento com antioxidantes como a vitamina E preveniu tais alterações (LIU et al., 2011).

Embora, os efeitos do mercúrio sobre o sistema reprodutor masculino têm sido estudados, ainda há informações insuficientes sobre os mecanismos subjacentes a disfunção reprodutiva masculina relacionada (BOUJBIHA et al., 2009; CASTELLINI et al., 2009; BLOOM et al. 2011).

No Brasil, é inevitável falar de mercúrio sem associar a regiões de garimpo, principalmente na Amazônia. Isto porque a mineração artesanal na região amazônica é responsável por quase 50% da produção brasileira de ouro (FADINI e JARDIM, 2001). Por este motivo, segundo o Centro de Tecnologia Mineral vinculado ao Ministério de Ciência e Tecnologia (CETEM-MCT) a contaminação por mercúrio em áreas de garimpo de ouro na Amazônia chega a exceder em até 40 vezes os níveis estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Além disto, a Amazônia parece ser uma região rica em mercúrio natural o que amplia a área de exposição a este metal. Entretanto, pesquisas indicam que em áreas sem a influência direta da garimpagem, a intoxicação por mercúrio esta relacionada com partículas deste metal associado a óxidos de ferro, derivados de processos de queima florestal, erosão e lixiviação, agravados por desmatamentos que expõe o solo (MASCARENHAS, 2004). Além disso, valores elevados encontrados no Rio Negro têm origem à mobilização do metal acumulado durante anos nos solos argilosos, sendo liberados pela podzolização (De OLIVEIRA SANTOS, 2005).

Segundo a revisão sobre o tema, conduzida por Passos e Mergler (2008), das 34 pesquisas realizadas na última década sobre a intoxicação com mercúrio, 82% foram realizadas em comunidades da Amazônia. Entretanto, entre estas, algumas investigações começaram a destacar que, apesar dos níveis elevados de mercúrio, os efeitos tóxicos necessariamente não estavam presentes com igual intensidade. Tais resultados levaram a formulação da hipótese de que componentes presentes na dieta poderiam atuar diminuindo os efeitos tóxicos do mercúrio.

Alguns estudos têm utilizado suplementos alimentares e/ou fitoterápicos da biodiversidade brasileira para a melhoria da produção e da qualidade dos espermatozoides humanos. Entretanto, os custos e o tempo para as implantar

investigações pré-clínicas e clínicas, sem evidências anteriores de eficiência e segurança desses produtos fazem com que investigações *in vitro* sejam eleitas como estratégia metodológica para pesquisar o potencial efeito de compostos bioativos na biologia dos espermatozoides (LENZI et al., 1993; SULEIMAN et al., 1996).

Deste modo, o estudo aqui apresentado teve como perspectiva realizar investigações *in vitro* em espermatozoides humanos expostos ao MeHgCl_2 e um componente dietético amazônico. No caso, o suplemento alimentar a ser investigado é a espécie amazônica *Paullinia cupana*, popularmente conhecida como guaraná.

O guaraná é uma planta amazônica que foi domesticada a centenas de anos por populações pré-colombianas, em especial pelos índios Saterê-Maués. Seu consumo é popularmente associado a propriedades energéticas e medicinais (SMITH e ATROCH, 2010). Os compostos bioativos mais importantes deste fruto são a cafeína, teobromina, teofilina e catequinas (CARLSON et al., 1998). Tais compostos podem ser responsabilizados por efeitos como: antioxidantes (MATTEI et al., 1998, BASILE et al., 2005), antimicrobiano (FONSECA et al., 1994; BASILE et al., 2005; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007), antialérgico (JIPPO et al., 2009), inibidor da agregação plaquetária (HALLER et al., 2005; SUBBIAH e YUNKER, 2008); antiobesogênico (MORELLI e ZOOROB, 2000; BOOZER et al., 2001; BERUBÉ-PARENT et al., 2005; OPALA et al., 2006), antidepressivo (CAMPOS et al., 2005), anti-fadiga e melhora na cognição (HASKELL et al., 2007).

Adicionalmente, estudos prévios têm sugerido que o guaraná possui efeitos anti-mutagênicos e que atenuam a toxicidade de diferentes compostos (FUKUMASU et al., 2006a; FUKUMASU et al., 2006b; FUKUMASU et al., 2008; FUKUMASU et al., 2011), além de não apresentar toxicidade ao organismo humano (SANTA MARIA et al., 1998). Recentemente, Leite e colaboradores (2011) descreveram a proteção do guaraná ao dano testicular causado pela exposição ao cádmio.

Portanto, o potencial efeito protetor do guaraná em espermatozoides humanos frente a exposição ao MeHgCl_2 pode ser postulado como tema principal deste trabalho.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Toxicologia do Mercúrio

2.1.1 Aspectos gerais

Os metais pesados são quimicamente muito reativos e biocumulativos, ou seja, o organismo não é capaz de eliminá-los de modo eficiente. Alguns destes metais, tais como: cobalto, cobre, manganês, estrôncio e zinco são necessários em pequenas quantidades aos seres vivos para a realização de diversas funções metabólicas (KABATA-PENDIAS e PENDIAS, 1993). Outros metais, como mercúrio, alumínio, chumbo e cádmio, não possuem nenhuma função nos organismos e podem causar graves efeitos tóxicos nos organismos expostos a estes elementos (BRUINS et al., 2000).

Quando esses metais são lançados, como resíduos industriais, ou utilizados em garimpos, no solo, na água ou no ar, esses elementos podem ser absorvidos pelos vegetais e animais ao longo da cadeia alimentar provocando graves intoxicações em animais e no ser humano (MILLER, 1998).

A toxicidade decorrente da exposição a metais pesados pode ser devida ao deslocamento de metais essenciais de seus sítios de ligação ou devida a interações químicas com biomoléculas endógenas, como os -SH. Os efeitos tóxicos geralmente resultam da alteração na estrutura de ácidos nucleicos e proteínas, interferência com o processo de fosforilação oxidativa e balanço osmótico, além de favorecerem o aparecimento do estresse oxidativo (HUGHES e POOLE, 1989).

O acúmulo de metais pesados no organismo humano representa um risco significativo para a saúde, como, por exemplo, o mercúrio, levando a uma grande variedade de morbidades, como a anemia, o câncer, a insuficiência renal crônica, a hipertensão, a gota, a infertilidade masculina, a gengivite, entre outros (MILLER, 1998).

As primeiras referências históricas sobre a identificação e uso do mercúrio datam de aproximadamente do IV a.C., quando Aristóteles homenageou o romano Mercúrio, também conhecido como “mensageiro dos Deuses”, ao observar semelhanças entre o deus romano e as características químicas do metal líquido. Também chamou-o de prata líquida ou *hydrargyrum*, dando origem ao símbolo Hg. Ainda, Aristóteles e outros autores gregos como Plínio e Dioscorides descreveram aplicações medicinais como o tratamento de doenças de pele e fizeram referências ao uso de mercúrio na recuperação de metais nobres por meio de amálgamas. Além destes usos o mercúrio também foi utilizado pelas civilizações orientais como afrodisíaco, por volta de 500 a.C. (MIRANDA et al., 2007).

Quimicamente, o mercúrio pode ser obtido a partir da reação de ustulação do cinábrio, que consiste no aquecimento do composto com oxigênio, produzindo mercúrio e liberando dióxido de enxofre (SO₂) (CLARKSON e MAGOS, 2006). Embora hoje se saiba que é um composto extremamente tóxico, o mercúrio tem várias aplicações na agricultura como fungicida; na medicina como anti-séptico de aplicação tópica; e na indústria química como catalisador no preparo de cloreto de vinila. Além disso, devido suas propriedades químicas, tais como, alta densidade e baixa pressão gasosa, expansão uniforme de volume, alto ponto de ebulição e sua alta condutividade elétrica, é muito empregado em barômetros, termômetros, interruptores e lâmpadas ultravioletas e fluorescentes (ALESSIO et al., 2007; CLARKSON e MAGOS, 2006; CLARKSON et al., 2007).

O ciclo biogeoquímico do mercúrio é muito complexo e envolve a inter-relação entre os sistemas atmosféricos, aquáticos e terrestres (MOREL et al., 1998). Existem dois ciclos que afetam o transporte e a distribuição do mercúrio: o global, que envolve a circulação atmosférica do mercúrio elementar, provenientes de fontes na crosta terrestre para os oceanos e, o local, que depende da metilação do mercúrio inorgânico proveniente principalmente de fontes antrópicas (MIRANDA et al., 2007).

2.1.2 Impactos na saúde humana exposta ao mercúrio

Pesquisas que envolvem a intoxicação por mercúrio tornaram-se mais evidentes a partir da década de 50, quando em Minamata, no Japão, instalou-se uma indústria de acetoaldeído (subproduto na fabricação de plásticos). Esta indústria, denominada “Chisso” lançava seus resíduos industriais na foz do rio de Minamata, que continha, principalmente grandes quantidades de metilmercúrio. O resultado foi o acúmulo de MeHg na fauna da Baía e do mar de Shiranui (EKINO et al., 2007). Em consequência, a população, que se alimentava de peixes, passou a apresentar diversos sintomas, principalmente neurológicos, tanto agudos quanto crônicos, incluindo: visão turva, perda auditiva, perturbações olfativas e gustativas, parestesia nas partes distais das extremidades e em volta dos lábios, neuropatia periférica e ataxia (EKINO et al., 2007).

Diversos experimentos com intoxicação experimental pelo mercúrio e seus derivados têm mostrado que a extensão dos danos ou disfunção resultantes é dependente do tempo, do meio de exposição e da concentração do metal (BOUJBIHA et al., 2009).

O mercúrio pode ser encontrado em três estágios de oxidação cada um com suas características tóxicas específicas: estado zero de oxidação (Hg^0), também chamado de mercúrio elementar ou metálico, existente na forma metálica líquida ou como vapor. E, nas formas inorgânicas, Mercúrio mercurioso (Hg^+) e Mercúrio mercúrico (Hg^{++}). O mercúrio mercúrico pode, ainda, realizar ligações covalentes com moléculas de carbono, dando origem ao mercúrio orgânico, o qual recebe nome de acordo com o número de carbonos ligados, portanto, podendo ser: metil, etil ou fenilmercúrio (BISINOTI e JARDIM, 2004; BOUJBIHA et al., 2009; CLIFTON, 2007; MIRANDA et al., 2007).

Após a absorção, o mercúrio elementar e o mercúrio orgânico (como MeHg) são amplamente distribuídos pelo tecido adiposo (BOUJBIHA et al., 2009; HOLMES e JAMES, 2009), podendo, acumular-se em outros tecidos e órgãos, já que na circulação sanguínea, o MeHg se liga a grupamentos sulfidríla, sendo transportado por aminoácidos carreadores atravessando a barreira hemato-encefálica, onde se acumula no sistema nervoso central. Ainda, é facilmente transferido através da

barreira placentária, devido a sua lipossolubilidade (BOUJBIHA et al., 2009; HOLMES e JAMES, 2009; MIRANDA et al., 2007; PINHEIRO et al., 2000; TOXNET, 2011). Em contrapartida, formas inorgânicas podem alcançar a maioria dos órgãos, no entanto, sua baixa lipofilicidade limita a capacidade de penetração nas barreiras hematoencefálica e placentária (HOLMES e JAMES, 2009; MIRANDA et al., 2007).

O mercúrio absorvido pode sofrer interconversão metabólica. O mercúrio elementar (Hg^0) pode ser oxidado para Hg^{2+} pela catalase (CAT) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HOLMES e JAMES, 2009). O MeHg também é convertido a mercúrio inorgânico através da ação da flora microbiana e pela produção de espécies reativas de oxigênio e pela interação com grupos sulfidril (BOUJBIHA et al., 2009; HOLMES e JAMES, 2009; MIRANDA et al., 2007; PINHEIRO et al., 2000). Como resultado, quantidades relativamente grandes de mercúrio, provenientes de formas metálicas ou orgânicas, podem se acumular no cérebro ou tecidos fetais, uma vez que estas formas podem facilmente atravessar as barreiras encefálica e placentária, mas tornam-se, então, imobilizadas, após conversão para o cátion inorgânico divalente (HOLMES e JAMES, 2009). O metabolismo do mercúrio sofre influências de acordo com o estado nutricional, interações medicamentosas, temperatura, flora bacteriana intestinal, genética e idade (BOUJBIHA et al., 2009; HOLMES e JAMES, 2009; MIRANDA et al., 2007; PINHEIRO et al., 2000).

Como a absorção está diretamente relacionada ao tipo mercúrio, a excreção também está da mesma forma relacionada. Assim, o mercúrio elementar é excretado como Hg^0 no ar expirado, suor e saliva, e como Hg^{2+} nas fezes e urina (BOUJBIHA et al., 2009; HOLMES e JAMES, 2009; MIRANDA et al., 2007; PINHEIRO et al., 2000). A excreção do MeHg ocorre como Hg^{2+} , principalmente nas fezes e urina, mas também no leite materno (LARINI et al., 1997).

Os principais efeitos adversos atribuídos à exposição ao mercúrio são: efeitos gastrointestinais, renais, músculo esqueléticos, hepáticos e, principalmente, neurológicos (DOLBEC et al., 2000; MARTINS et al., 2009). Entretanto, mais recentemente tem sido evidenciado que a exposição ao MeHg promove efeitos no sistema cardiovascular (GROTTO et al., 2009; MOSZCZYN´SKI et al., 1998; VIRTANEN et al., 2007) e alterações significativas nos sistemas reprodutores masculinos e femininos (GROTTO et al., 2009).

Os níveis de exposição individual ao mercúrio são geralmente detectados utilizando-se dois biomarcadores: análise das concentrações de mercúrio no cabelo da nuca e no sangue total (BUDTZ-JORGENSEN et al., 2004). Entre os compostos de mercúrio que possuem grande impacto na saúde o MeHg tem papel destacado.

2.1.3 Metilmercúrio

2.1.3.1 Metilação do mercúrio

A metilação do mercúrio ocorre pela transferência de um ou dois metilcarbânions (CH_3^-) ao mercúrio orgânico. De uma forma geral, vários fatores ambientais influenciam a forma e a disponibilidade do mercúrio para os microorganismos (principalmente bactérias sulfato redutoras) que realizam a metilação biótica. Dentre eles pode-se citar a interação química com complexos orgânicos e inorgânicos, pH, potencial redox e temperatura. Há ainda, a metilação abiótica que pode ser fotoquímica ou química. Quando a transalquilação (transferência de um grupamento metil) ocorre na presença de radiação ultravioleta, é chamada de fotoquímica, enquanto que, a metilação química pode ocorrer pela adição *in vitro* de metilcobalamina ou excretada por bactérias produzidas em laboratório (MIRANDA et al., 2007).

2.1.3.2 Toxicidade do metilmercúrio

Dentre as formas químicas do mercúrio, a que tem sido o principal foco das pesquisas é o MeHg. Devido à sua maior lipossolubilidade, torna-se uma neurotoxina, tendendo a se bioacumular, tornando-se assim, um risco à saúde humana. A contaminação humana ocorre pela ingestão de alimentos, principalmente peixes (BISINOTI e JARDIM, 2004; MICARONI et al., 2000; MIRANDA et al., 2007).

O MeHg nos seres humanos é considerado relativamente estável, após a absorção, sendo distribuído à todos os tecidos dos corpo, em um processo que dura aproximadamente seis dias, tendo um tempo de meia-vida biológico longo, em média de 44 a 80 dias. Já a sua excreção ocorre via leite materno, fezes e urina (BISINOTI e JARDIM, 2004; WHO, 1990).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda níveis inferiores a 0,5mg/kg no consumo semanal de 400g de peixe (BARBOSA et al., 2003; PINHEIRO et al., 2000). Entretanto, pesquisas apontam que os valores de mercúrio em peixes, na região amazônica excedem estes limites, como é o caso do Rio Madeira e regiões de garimpo, onde foram encontrados valores entre 0,09 e 1,15mg/kg e 0,33 a 2,30 mg/kg, respectivamente (BARBOSA et al., 2003; BISINOTI e JARDIM, 2004; DOREA et al., 1998; LACERDA et al., 1999; MAURICE-BOURGOIN et al., 2000).

Isto ocorre, segundo a literatura, porque os organismos aquáticos têm elevada capacidade de absorver compostos de mercúrio. Desta forma, os peixes absorvem o mercúrio com facilidade, acumulando-o em seus tecidos principalmente na forma de MeHg. Além disso, a metabolização do MeHg nestes organismos é extremamente lenta e o tempo de meia-vida muito longo, variando de um a três anos (BISINOTI e JARDIM, 2004; NASCIMENTO e CHASIN, 2001; PINHEIRO et al., 2000).

Na Amazônia, em consequência dos processos de garimpagem, há duas fontes de contaminação por mercúrio: (1) ocupacional, devido à inalação direta de vapor de mercúrio por garimpeiros e processadores de ouro e (2) pela dieta, a qual é a base de peixes, contaminados pela liberação e biometilação de mercúrio em sistemas aquáticos (BRABO et al., 2000; DE JESUS et al., 2001).

2.1.3.3 Estresse oxidativo e mercúrio

Como já descrito, o mercúrio orgânico, possui grande afinidade por grupamentos sulfidrílica de biomoléculas (CLARKSON, 1997). Deste modo, ele pode formar complexos com compostos ricos nestes grupos sulfidrílica. Este é o caso da

glutathione (ZALUPS, 2000), que é uma molécula que faz parte do grupo de enzimas antioxidantes que inclui a glutathione peroxidase (GPx). Esta enzima age no H_2O_2 catalisando esta molécula em água (H_2O). Como o mercúrio depleta a glutathione da célula ocorre acúmulo de H_2O_2 o que causa, por sua vez, um estado de estresse oxidativo crônico. Devido a isso, o estresse oxidativo é bastante observado em intoxicações pelo mercúrio (HUANG et al., 1996; HOFFMAN e HEINZ, 1998; EL-DEMERDASH, 2001). O H_2O_2 em excesso reage facilmente com outros íons metálicos como o ferro e o cobre, em uma reação denominada reação de Fenton formando o radical hidroxila (OH^\cdot). Este radical tem grande afinidade pelos ácidos nucleicos desencadeando efeitos genotóxicos sistêmicos que levam a quebras no DNA e ao acúmulo de mutações que podem tornar a célula disfuncional ou desencadear a sua morte via apoptose ou necrose. O mercúrio também influencia as taxas de lipoperoxidação celular (LUND et al., 1991; LUND et al., 1993).

Além de um aumento de radicais livres, diversas pesquisas têm associado a diminuição da atividade de enzimas antioxidantes ao mercúrio, principalmente a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) (BENOV et al., 1990). A exposição ao mercúrio também parece reduzir a quantidade de moléculas que participam do sistema antioxidante não enzimático, como a vitamina C (PEROTTONI et al., 2004) e a própria glutathione (GSH) (ZALUPS et al., 2000).

2.2 Agentes Antioxidantes

Os organismos aeróbios possuem dois sistemas de defesa antioxidantes: o sistema endógeno e o exógeno. O mecanismo endógeno de defesa celular, também chamado de mecanismo de defesa enzimático, ocorre através das enzimas SOD, que dismuta o superóxido em H_2O_2 . E por sua vez, é degradado pela CAT e/ou pela GPx em água (BENOV et al., 1990). Já o mecanismo de defesa exógeno, ou mecanismo de defesa não enzimático, ocorre através de reações químicas com compostos que também vão reagir com os radicais livres, neutralizando-os.

Os agentes antioxidantes possuem a função de remover os radicais livres, ou seja, possuem ação de “scavengers” de radicais livres (QUIG, 1998). Desta forma, a

utilização de agentes antioxidantes pode ser eficaz na prevenção de intoxicações causadas pela exposição ao mercúrio (SHARMA et al., 2005), que, como descrito anteriormente, promove a formação de radicais livres, tendo a capacidade, ainda, de gerar estresse oxidativo. Para tal, muitos mecanismos de defesa endógenos e exógenos estão envolvidos na tentativa de proteger o organismo contra os danos causados pelo estresse oxidativo (McCORD, 1993; PAPAS; 1996).

Entre os compostos presentes na dieta que possuem ação oxidante está a GSH (DENEKE e FANBURG, 1989), vitaminas, xantinas, flavonóides e outros polifenóis (FANG et al., 2002; RAO e SHARMA, 2001). Entre as xantinas a teobromina, a teofilina e a cafeína têm sido bastante estudadas por fazerem parte de compostos bioativos de plantas como o *Camelia sinensis*, popularmente conhecido como chá verde e a *Paullinia cupana*, ou guaraná.

Então, tendo em vista que a exposição ao mercúrio, além da formação de radicais livres, pode causar alterações nas defesas antioxidantes do organismo, a investigação sobre a suplementação de extratos de plantas com compostos bioativos antioxidantes podem preservar a integridade das membranas biológicas, minimizando os danos causados pelo estresse oxidativo.

2.2.1 *Paullinia cupana*

Paullinia cupana, popularmente conhecida como guaraná, é uma planta amazônica que foi há centenas de anos domesticada pelos índios Saterê-Maués. O seu consumo é restrito às sementes. No caso, o fruto do guaraná é despulpado, as sementes são lavadas e posteriormente torradas a fogo brando. Após esse processo, são moídas e o pó produzido é consumido pela população em geral *in natura* ou sob a forma de produtos industrializados com destaque aos refrigerantes (SMITH e ATROCH, 2010). Apesar de ser consumido como planta medicinal pelos povos tradicionais, o guaraná que é produzido comercialmente exclusivamente no Brasil, é considerado e consumido como um alimento ou suplemento alimentar (BRASIL, 2011). Entretanto, estudos científicos apóiam a hipótese do guaraná ter propriedades bioativas na saúde humana.

Em termos químicos, o guaraná possui os seguintes compostos bioativos na sua composição: metil xantinas, tais como a cafeína (FOUNI et al., 2007), teobromina (BELLIARDO et al., 1985; SALVADORI et al., 1994), teofilina, taninos, saponinas, catequinas, epicatequinas, pró-antocianinas e outros compostos (SALVADORI et al., 1994; CARLSON e TOMPSON, 1998; SOMBRA et al., 2005; PELOZO et al., 2008).

A cafeína, presente no café, é a substância psicoativa mais consumida no mundo independente do sexo, idade ou etnia. A cafeína está presente em mais 63 espécies de plantas, e o guaraná possui três vezes mais cafeína que o café. Além disso, é completamente absorvida pelo trato gastrointestinal sendo distribuída para todos os tecidos corporais uma vez que tem a capacidade de atravessar as barreiras hemato-encefálica, testicular e placentária (ANDREWS et al., 2007).

A teofilina, encontrada principalmente no chá verde (*Cammelia sinensis*) permite o relaxamento da musculatura lisa dos brônquios, a estimulação do sistema nervoso central, a estimulação do músculo cardíaco e a diurese. A teobromina, presente também no guaraná, está presente em outros alimentos funcionais, como por exemplo, o cacau (*Teobroma cacao*), apresentando atividade vasodilatadora e sendo utilizada como anti-asmático e cardioestimulante. Estudos demonstram que doses, de guaraná inferiores a 40 mg/ml não tem efeito tóxico (SANTA MARIA et al., 1998). Mattei e colaboradores (1998), corroboram com esta idéia, a partir de estudos conduzidos em ratos.

A suplementação com guaraná age farmacologicamente sobre a modulação dos metabolismos: energético (SMITH e ATROCH, 2007), oxidativo-vascular, inflamatório, lipídico-glicêmico (FUKUMASU et al., 2008) e plaquetário (BYDLOWSKI et al., 1988)

Estudos prévios têm relatado efeitos antioxidantes do guaraná, como Mattei e colaboradores (1998) que averiguaram uma capacidade antioxidante próxima a 100% com doses de guaraná $\geq 3,3$ $\mu\text{g/ml}$. De acordo com o estudo de Basile e colaboradores (2005) o guaraná possui efeitos antioxidantes, uma vez que diminui a peroxidação lipídica causada por agentes pró-oxidantes. O guaraná também apresenta atividade anti-tumoral e anti-mutagênica (FUKUMASU et al., 2006a; FUKUMASO et al., 2008). Adicionalmente, na literatura também existem relatos da atividade quimiopreventiva do guaraná (FUKUMASO et al., 2006b), cardiotônica e

cardioprotetora (PONTIERI et al., 2007), antiagregante de plaquetas (BYDLOWSKI et al., 1988; BYDLOWSKI et al., 1991; SUBBIAH e YUNKER, 2008), energética (BEMPONG e HOUGHTON, 1992), anti-bacteriana (FONSECA et al., 1994; BASILE et al., 2005), melhoria cognitiva (ESPINOLA et al., 1997; KENNEDY et al., 2004; HASKELL et al., 2007; KENNEDY et al., 2007), antioxidante (MATTEI et al., 1998; BASILE et al., 2005; RAY et al., 2006; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007), anti-obesidade, termogênico e no aumento da taxa metabólica (ANDERSON et al., 2001; BOOZER et al., 2001; BERUBE-PARENT et al., 2005; ROBERTS et al., 2005; SUBBIAH e YUNKER, 2008), atividade gastroprotetoras (CAMPOS et al., 2003).

Smith e Atroch (2010) comentam que o guaraná possui um efeito energético e afrodisíaco. Esse efeito afrodisíaco é utilizado popularmente ainda que precise ser melhor estudado. Porém, ainda não é sabido se tal efeito afrodisíaco age somente na fisiologia da cópula ou também na qualidade da produção do sêmen. Uma vez que o guaraná apresenta um conjunto de compostos ativos que podem ter efeitos cito-fisiológicos em espermatozoides humanos investigações, sobre este tema são justificadas.

2.3 Estresse oxidativo e infertilidade masculina

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas produzidas no curso normal do metabolismo biológico aeróbio, possuindo múltiplas funções fisiológicas. Entretanto, por serem compostos químicos altamente reativos, o acúmulo de EROs, além das necessidades imediatas da célula, pode afetar a estrutura celular e sua integridade funcional, por reagirem quimicamente e causarem degradação oxidativa de moléculas críticas como o DNA, proteínas e lipídios (PAVANATO et al., 2003). Deste modo, o estresse oxidativo é definido como uma condição na qual ocorre um desequilíbrio entre as concentrações de espécies pró e antioxidantes (ARTEEL e SIES, 2001).

2.3.1 Papel fisiológico e origem das EROs no Sistema Reprodutivo Masculino

Embora as células possuam uma rede de defesa antioxidante complexa, células que demandam um alto gasto energético, como os espermatozoides, são muito vulneráveis ao ataque de EROs. Portanto, são altamente dependentes de mecanismos para neutralizar o excesso de EROs e reduzir o estresse oxidativo. Existe um corpo robusto de evidências que relacionam o estresse oxidativo com doenças crônicas não-transmissíveis, como, principalmente doenças neurológicas (CUI et al, 2004). Por este motivo fatores pró e anti-oxidantes são objetos de intensos estudos inclusive nas questões relacionadas a infertilidade masculina.

2.3.2 Origem de EROs nos espermatozoides

Apesar da fragilidade das células espermáticas ao ataque oxidativo, estas células também são potentes geradores de EROs. Tal ideia surgiu pela primeira vez com Tosic e Walton, em 1946. Pequenas quantidades de EROs são essenciais para a interação oócito-espermatozoide, participando de processos relacionados a capacitação do espermatozoide, motilidade, hipertivação e reação acrossômica (AGARWAL et al., 2004; AGARWAL et al., 2008; De LAMIRANDE e GAGNON, 1992; GRIVEAU e Le LANNOU, 1997; KODAMA et al., 1996).

Após a espermatogênese, as espermatídes transformam-se em espermatozóides via um processo denominado espermiogênese no qual parte do citoplasma é perdido (extrudado). O centríolo dá origem ao flagelo, as mitocôndrias multiplicam-se e formam a bateria mitocondrial na base do flagelo e o sistema de Golgi forma o acrossomo localizado na região da cabeça, acima do núcleo (YANAGIMACH, 2011). Estudos adicionais como realizado por Agarwal e colaboradores (2008) mostraram que a geração de EROs, pelas células espermáticas, pode ocorrer através de duas maneiras: (1) pelo sistema oxidase da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), que ocorre em nível da membrana plasmática e (2) pela atividade da enzima oxiredutase NADPH-

dependente em nível mitocondrial. Estes autores também observaram correlação entre a formação de EROs com retenção de citoplasma residual em espermatozoides. Esta retenção citoplasmática está relacionada a mecanismos mediados pela enzima citosólica glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD).

Biologicamente, as EROs são geradas durante o fenômeno de capacitação do qual o espermatozoide adquire a capacidade de fecundar o óvulo. Especificamente, a capacitação ocorre quando o espermatozoide já está no trato vaginal em um período de aproximadamente 6 horas. Tal fenômeno envolve um aumento maciço no estado de fosforilação da tirosina da cauda do espermatozoide, isto ocorre para facilitar uma mudança nas características de movimento, que passa a apresentar uma alta frequência e baixa amplitude e padrão de batimento flagelar simétrico (AITKEN e CURRY, 2011).

No estado de hiperativação, os flagelos movem-se em baixa frequência e alta amplitude, em ondas assimétricas capazes de gerar força de propulsão necessária para alcançar a tuba ovariana, onde formarão um depósito. Neste local, se ainda não ocorreu a liberação do oócito secundário pelo ovário, os espermatozoides ficam aguardando o sinal de que a ovulação ocorreu e o oócito está disponível para fecundação. Além disso, o estado de hiperativação também é necessário durante a fertilização, a fim de gerar o impulso necessário para que a cabeça do espermatozoide entre em contato com a zona pelúcida (AITKEN e CURRY, 2011; YANAGIMACHI, 2011).

A zona pelúcida é um envoltório glicoproteico secretado pelo ovócito que circunda este gameta. Quando a cabeça de um espermatozóide toca a zona pelúcida ocorre a reação acrossômica do qual, moléculas são liberadas do acrossomo localizado na cabeça do espermatozóide, o que modifica imediatamente a estrutura da zona pelúcida. Esta modificação faz com que esta camada fique impermeável ao restante dos espermatozóides evitando assim a poliespermia. O espermatozoide que reagiu com a zona pelúcida liga-se, então, à membrana plasmática do oócito secundário fundindo-se a mesma. Este processo permite que todo o material presente no interior do espermatozoide, incluindo o pró-núcleo entre para o interior do oócito (AITKEN e CURRY, 2011; YANAGIMACHI, 2011).

Concomitantemente, este processo estimula o término da meiose II formando assim o pró-núcleo feminino apto para se fundir com o pró-núcleo masculino

ocorrendo também à liberação do segundo corpúsculo polar (AITKEN e CURRY, 2011). Jin e colaboradores (2007), ao pesquisar camundongos geneticamente modificados, comprovaram que a falta de hiperativação dos espermatozoides leva à infertilidade.

2.3.3 Vulnerabilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo

Uma vez liberados do epitélio germinativo, os espermatozoides estão por conta própria, ou seja, perdem a proteção das células de Sertoli, as quais possuem altos níveis das enzimas antioxidantes, SOD e GPx (AITKEN e CURRY, 2011).

Além disso, a extrusão da maior parte do citoplasma dos espermatozoides humanos, pouco antes de serem liberados do epitélio germinativo descarta junto os compartimentos citoplasmáticos responsáveis pelo armazenamento de enzimas antioxidantes. Como consequência, as enzimas antioxidantes citosólicas não têm acesso à membrana celular que delimita a cabeça e a cauda dos espermatozoides, tornando-as vulneráveis (AITKEN e CURRY, 2011).

Todavia, o plasma seminal constituído por secreções que banham os espermatozoides no epidídimo são ricos em propriedades antioxidantes, contendo várias formas altamente específicas e únicas de glutathione peroxidase 5 (GPx5) e SOD extracelular. Além disto, este fluido é rico em antioxidantes não enzimáticos como o ácido úrico, vitamina C, tirosina e polifenóis (AITKEN, 2009; AITKEN e CURRY, 2011; VERNET et al., 2004). É necessário ressaltar que os espermatozoides não estão totalmente desprovidos de defesas antioxidantes internas, uma vez que contêm atividade da SOD detectável, um sistema de glutathione ativo e, possivelmente, pouca quantidade de CAT. Entretanto, a baixa concentração destes produtos faz com que tais defesas sejam facilmente extintas se ocorrer um aumento na produção de EROs que leve a um estresse oxidativo (AITKEN e CURRY, 2011).

2.3.4 Desbalanço oxidativo: efeito do estresse oxidativo no sistema reprodutivo masculino

As EROs representam uma categoria de moléculas, incluindo um conjunto de radicais (íon hidroxila, superóxido, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio) e não radicais (ozônio, oxigênio, peróxido lipídico e peróxido de hidrogênio) (AGARWAL et al., 2005).

Por serem moléculas desbalanceadas, reagem facilmente com outras moléculas e macromoléculas presentes no organismo. Lipídios, proteínas, ácidos nucléicos açúcares e todos os outros componentes celulares, são alvos das EROs (AGARWAL et al., 2008; AITKEN e CURRY, 2011). Todavia, a extensão dos danos induzidos por EROs depende da natureza e da quantidade de EROs envolvidas, além do tempo de exposição e de outros fatores que compõe o ambiente extracelular, como temperatura, íons e enzimas antioxidantes (AGARWAL et al., 2008). Entre as alterações associadas ao estresse oxidativo destacam-se a peroxidação lipídica das membranas.

2.3.4.1 Peroxidação Lipídica

A membrana plasmática das células, incluindo a dos espermatozoides é constituída predominantemente por fosfolipídios e proteínas em proporções variáveis e uma pequena fração de açúcares, na forma de oligossacarídeos. Os lipídios presentes na membrana celular pertencem predominantemente ao grupo dos fosfolipídios. Estas moléculas são formadas pela união de três grupos de moléculas menores: um álcool, geralmente o glicerol, duas moléculas de ácidos graxos e um grupo fosfato, que pode conter ou não uma segunda molécula de álcool. A estrutura das membranas deve-se, primariamente, a essa camada dupla de fosfolipídios. Esses lipídios são moléculas longas com uma extremidade hidrofílica (tem afinidade com a água) e a cadeia hidrofóbica (não tem afinidade com a água). O grupo fosfato está situado nas lâminas externas da estrutura trilaminar. A parte situada entre as

lâminas fosfatadas é composta pelas cadeias hidrofóbicas. As membranas das células dos animais possuem ainda colesterol (BORGES et al., 2011).

Portanto, as membranas celulares e intracelulares encontradas nos espermatozoides possuem grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), que são um importante alvo para a ação de radicais livres. Assim, o ataque das EROs na membrana plasmática gera uma cascata de reações químicas, chamadas de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação. Este ataque ocorre principalmente na presença de radicais livres como o peroxinitrito que é o produto da condensação dos radicais superóxido e óxido nítrico. Um dos subprodutos destas reações é o malondialdeído (MDA), que tem sido utilizado em vários ensaios bioquímicos para monitorar o grau de danos sofridos pela oxidação das membranas. Resultados mostraram uma alta correlação entre a deficiência na função espermática relacionada à fusão espermatozoide-oócito e a presença de lipoperoxidação (AGARWAL et al., 2005; AGARWAL et al., 2008). Além disso, a peroxidação lipídica está altamente correlacionada com problemas na motilidade dos espermatozoides (AGARWAL et al., 2008; SULEIMAN et al., 1996).

A fluidez da membrana de células espermáticas está relacionada ao ácido docosahexaenóico (DHA). Este é um PUFA mais comumente encontrado na membrana deste tipo celular. O DHA desempenha funções em atividades antiinflamatórias e na expressão de genes, bem como na fluidez da membrana (CONQUER et al., 2000; MUSKIET et al., 2004). Além disso, as concentrações do DHA são dependentes da ingestão alimentar, já que os seres humanos sintetizam este PUFA em pequenas quantidades (CONQUER et al., 2000; MUSKIET et al., 2004; WATHES et al., 2007). Ainda, as cadeias acil do DHA são particularmente suscetíveis ao ataque de EROs, levando à formação de MDA e 4-hidroxinonanal. Ambas as moléculas são tóxicas, podendo alterar significativamente proteínas e produzir mutações no DNA, bem como a motilidade destas células (WILLIAMS e FORD, 2005).

2.3.4.2 Motilidade e estresse oxidativo

Apesar de possuírem um papel importante na fecundação, o aumento na quantidade de EROs gera um estado de estresse oxidativo, o que parece estar associado com a diminuição da motilidade espermática (AGARWAL et al., 2008; ARMSTRONG et al., 1999; LENZI et AL., 1993). Porém, o exato mecanismo associado aos níveis aumentados de EROs e o decréscimo de motilidade ainda não são bem entendidos. Várias hipóteses são propostas para explicar esta associação. Uma delas sugere que o H_2O_2 pode difundir-se através da membrana plasmática até o interior das células e inibir a atividade de algumas enzimas como a G6PD. A G6PD é uma enzima que controla a via glicolítica e modula a produção do NADPH intracelular. Deste modo, o H_2O_2 poderia atuar na dinâmica da motilidade do espermatozóide através da inibição desta enzima (AGARWAL et al., 2008; AITKEN e CURRY, 2011; AITKEN e KOPPERS, 2011).

Outra hipótese sugere que uma série de eventos interrelacionados resulta em um decréscimo na fosforilação da proteína axonêmica do flagelo e imobilização espermática. Estes eventos estariam relacionados com a redução na fluidez da membrana que é necessária para que ocorra a fusão espermatozoide-oócito (AITKEN e CURRY, 2011; AITKEN e KOPPERS, 2011).

2.3.4.3 Genotoxicidade dos espermatozoides via estresse oxidativo

Segundo pesquisas, EROs causam danos no DNA, podendo ser reversíveis, quando pequenos ou irreversíveis quando extensos. Os danos extensos incluem modificação, exclusão, desnaturação e oxidação de bases nitrogenadas e rearranjos cromossômicos, além de alta frequência de quebras de fitas simples e duplas de DNA. Como consequência, as mutações genéticas tornam as células disfuncionais (AGARWAL et al., 2008; AITKEN e CURRY, 2011). Quando os efeitos são irreversíveis, o dano ao DNA pode induzir a apoptose celular ou levar à fragmentação do embrião (AGARWAL et al., 2008). Ainda, segundo Agarwal e

colaboradores (2008), danos no DNA do cromossomo Y, podem também causar deleções do mesmo, levando à infertilidade.

2.3.4.4 Apoptose dos espermatozoides via estresse oxidativo

A apoptose, caracterizada por um processo de morte celular programada, regulada pela própria célula, é um mecanismo importante na eliminação de células espermáticas anormais em consequência de alterações morfológicas e bioquímicas. Deste modo, o estresse oxidativo gerado pela presença de altos níveis de EROs nos espermatozoides danificam as membranas internas e externas das mitocôndrias e de outras organelas. Este dano pode induzir a liberação e ativação das caspases que são proteínas responsáveis pela indução da apoptose celular (AGARWAL et al., 2005; AGARWAL et al., 2008; AITKEN e KOPPERS, 2011).

2.3.5 Papel dos compostos antioxidantes na produção e morfofisiologia do espermatozoide

Além do papel dos agentes pró-oxidantes na produção e maturação do espermatozóide, investigações também têm se dedicado a averiguar o efeito de agentes antioxidantes nesse processo fisiológico. Um estudo randomizado, duplo-cego observou que a vitamina E administrada oralmente (300mg/dia) resulta em um decréscimo na lipoperoxidação das membranas dos espermatozóides, o que levou a uma melhor motilidade espermática (SULEIMAN et al., 1996).

Lenzie e colaboradores (1994) descreveram que a incubação *in vitro* de amostras de espermatozoide de homens inférteis por 24h em meio de cultura suplementado com moléculas de ação antioxidante como a coenzima Q10 aumentou a motilidade espermática. Além disso, relataram que a suplementação oral de 2-3g/dia de carnitina por dois meses, aumentou a concentração e a motilidade de células espermáticas humanas.

Outros estudos também indicaram que antioxidantes podem proteger espermatozoides de situações de estresse oxidativo, causado por congelamento. Recentemente, uma investigação com espermatozoides criopreservados mostrou que a suplementação no meio de armazenamento com resveratrol diminui os níveis de estresse oxidativo causados pelo congelamento, ainda que a motilidade não tenha sido afetada pelo tratamento (GARCEZ et al., 2010).

Com base nestes resultados estudos complementares investigando o papel de suplementos alimentares e/ou fitoterápicos na qualidade funcional dos espermatozoides humanos podem ser considerados relevantes, principalmente para o entendimento de aspectos bioquímicos toxicológicos relacionados à contaminação de metais pesados com o mercúrio.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito protetor *in vitro* do extrato hidro-alcoólico de *Paullinia cupana* em espermatozoides expostos ao cloreto de metilmercúrio.

3.2 Objetivos Específicos

Analisar células espermáticas *in vitro* expostas à ação tóxica do cloreto de metilmercúrio com e sem a presença do extrato hidroalcoólico de *Paullinia cupana* quanto:

- À viabilidade dos espermatozoides;
- Aos níveis de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas;
- À taxa de produção de radicais livres;

ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico, o qual encontra-se aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo. O artigo está disposto da mesma forma que foi submetido para publicação na Revista **Reproductive Toxicology**.

Antioxidative potential of guaraná (*Paullinia cupana*) against methylmercury induced intoxication in spermatozoa *in vitro*

Mara Rejane Fantinel¹, Eliza R Flores², Francine Cadoná¹, Clarice Pinheiro Mostardeiro³, Ademir Farias Morel⁴, Euler Esteves Ribeiro⁵, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,3*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria

² Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

³ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria

⁴ Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria

⁵ Universidade Aberta da Terceira Idade, Universidade do Estado do Amazonas

*Corresponding author: Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Adress: Av.Roraima 1000, Prédio 19, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria. Zip Code: 97.105-900
Phone: 55-55-32208163, Fax: 55-55-32208239
Email: ibmcruz@hotmail.com

Abstract

Introduction: The methylmercury (MeHg) exposition causes production of adverse effects as deterioration of semen quality, testicular degeneration, and male reproductive failure. The *in vitro* protective role of guaraná (*Paullinia cupana*, Mart.) viability and oxidative stress modulation of human sperm cells exposed to methyl mercury intoxication was investigated here. **Methods:** The human sperm cell collected from donators were counted, aliquoted and submitted a four treatments negative control (C), MeHg exposition (MeHg, 60 μ M); (3) Guaraná supplementation (Gua, 10 mg/mL) and MeHg exposition plus guaraná supplementation (MeHg-Gua). During the treatment exposition the samples were maintained at 37°C at 95% CO₂ incubation. **Results:** The guaraná treatment increase the sperm viability exposed to MeHg as well as decreased the lipoperoxidation, ROS and protein carbonylation levels. The guaraná showed *in vitro* protective effect of human sperm against MeHg exposition. However, if this results may be similar in *in vivo* conditions is an open question.

Key-words: human sperm, guaraná, *Paullinia cupana*, toxicity, Methylmercury, oxidative stress

1 Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are important mediators of normal sperm function and are involved in the induction and development of sperm hyperactivation, capacitation and acrosome reaction [1,2]. However, excessive production of ROS results in several cell morphological and functional alterations including lipid peroxidation and membrane damage leading to loss of motility [3], inactivation of glycolytic enzymes, damage to the acrosomal membranes [4] and DNA mutations that may become the sperm cell unable to fertilize the oocyte and to lead a persistent infertility [5].

Oxidative stress affects the sperm cells may be caused by heavy metals as mercury affecting the male reproductive function [6]. Mercury intoxication particularly methyl mercury (MeHg), a very toxic organic compound, has been associated with male reproductive toxicity in experimental animals and men. The MeHg exposition causes production of adverse effects as deterioration of semen quality, testicular degeneration, and reproductive failure [6].

Mercury compounds are mostly metabolized in the liver where they may suffer demethylation [7] or undergo conjugation reactions with glutathione (GSH) [8] and selenium (Se) [9]. MeHg react with selenium (Se) forming insoluble HgSe compounds. Some studies suggested that it is one of the processes by which Se can prevent mercury toxicity [10,11]. Therefore, Se is considered a natural MeHg and inorganic Hg antagonist that potently counteracts or eliminates symptoms of toxicity that would otherwise accompany high MeHg/Hg exposures [12,13].

The MeHg exposition may deplete the body reserves of selenium that is an essential element of several e asthioredoxin reductases and seleno-dependent

glutathione peroxidases (SeGPxs) enzymes that are involved in antioxidant process [11]. *In vitro* studies have shown that mercury compounds inhibit these enzymes by binding to their active site.

Since the glutathione peroxidases activity are essential for avoiding peroxidegenerated oxidative damage caused by H_2O_2 overproduction or accumulation. In sperm cells, despite the ROS including H_2O_2 are important mediators of normal sperm function elevate levels of these molecules causing sperm cell dysfunctions [14].

In these terms, complementary investigations have been performed to evaluated if antioxidant supplementation can decrease the toxic effect on sperm and reproductive cells caused by the MeHg exposition [15,16,17]. Many studies have shown improvements sperm quality with antioxidant treatment, and recent attention has been directed toward extracts of plants rich in natural antioxidant compounds used as medicinal plants [18,19].

In the Amazon region mercury is a public health concern associated with small scale mining and a natural mercury reserves found in this local [20]. Investigations suggest that some fruits rich in Se, as Brazilian nut seem to minimize the toxic MeHg effects [21]. However, the Amazon region is rich in a large number of edible fruits and vegetables that present different antioxidant compounds that could to help minimize the toxic effect of MeHg decreasing the H_2O_2 levels and of other ROS molecules produced from excess of H_2O_2 as hydroxyl radical (OH^+).

However, studies involving other Amazon fruits in cell sperm protection against MeHg are still scarce. Among these foods the potential protective role of guaraná (*Paullinia cupana*, Mart.) on sperm exposed to methyl mercury intoxication need to be studied. Guaraná is a plant rich in xanthenes mainly caffeine,

theobromine and theophylline as well as in catechins. Previous studies have proposed that catechins as well as caffeine presents antioxidant activity that confer some protection against dysfunctions and diseases related to oxidative stress [22,23].

Guaraná is broadly ingested in beverages that provide caffeine or energy boost, such as energy drinks and sports drinks [24,25]. Scientific evidences showed that guaraná has antioxidant activity [26,27,28,29], anti-tumoral properties [30,31,32] and antimicrobial activity [33,34]. An epidemiological investigation showed lower prevalence of metabolic cardiovascular risk factors and cardiovascular diseases, which area associated to elevate and chronic inflammatory and oxidative stress process in Amazon riverine elderly that habitually consumed guaraná when compared with elderly that no consume guaraná [29]. Despite the popular medicine preconize positive effects of guaraná on male reproductive system investigations about this question are scarces. In the literature we identified a previous study performed by Leite et al. [32] that evaluated the guaraná effect on attenuation of Wistar rat testis damage caused by cadmium exposition, a heavy metal molecule like Hg. The study showed that cadmium triggered massive cell death in the seminiferous epithelium and intertubular space and morphofunctional alteration in male reproductive cells. The pre-treatment with guaraná was effective in attenuate these alterations, morphological changes observed in Leydig cells from rats exposed to cadmium. Guaraná also reduced the inflammatory response, when compared to animals exclusively exposed to the metal.

In these terms, the study here in performed investigated if the guaraná extract present protective role on viability and oxidative stress modulation of human sperm cells exposed to methyl mercury in *in vitro* conditions.

2. Materials and Methods

2.1 Reagents

All the reagents were obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA) and Invitrogen Co. (USA) and Cultilab Co. (São Paulo, Brazil).

2.2 Study design and subjects

A *ex vivo* protocol was initially performed to evaluate the protective effect of guaraná extract on human spermatozoa cells exposed to MeHg intoxication. Three different guaraná extract concentrations (1, 5 and 10 mg/mL) were tested here. The choice of its concentrations was based in previous studies that showed no cellular toxicity of guaraná extracts in these concentrations as well as increase in viability of fibroblast cells (NIH-3T3 cells) exposed to other prooxidant compounds as sodium nitroprusside [18,35]. Based in Rao and Gangadharan (2008) with some modifications, initially we tested two MeHg concentrations (30 and 60 μ M) in two different times of sperm exposition (two and four hours). From these results (data not shown) we exposed the human sperm cells at 60 μ M of MeHg concentration during 2 hours that present a visible intoxication pattern evaluated by effect on human cell viability. The human sperm cell collected from donor were counted, aliquoted and submitted a four treatments groups: (1) negative control without MeHg and Guaraná supplementation (C); (2) positive control, with MeHg exposition; (3) Guaraná supplementation (Gua) and MeHg exposition plus guaraná supplementation (MeHg-Gua). The guaraná concentration that presented the better sperm protective effect

against MeHg exposition was used to evaluate oxidative biomarkers that could be modulated by guaraná supplementation. During the treatment exposition the samples were maintained at 37°C with 95% CO₂ incubation. All tests were performed in triplicate and at least, in with repetitions in two or more repetitions performed in different days.

2.3 Samples collection

Since this is an exploratory investigation, the *in vitro* protocols were performed using sperm cells just from two young fertile men donators to avoid result bias caused by genetic and environmental variability present in large samples of subjects. The study was approved by the Institutional Review Board of the Universidade Federal de Santa Maria (RS, Brasil, process number: 23081.015838/2011-10). All individuals gave written informed consent for the study procedures and the use of their clinical and biological data for research purposes after recruitment. Semen samples were collected and immediately transferred to Biogenômica Lab, Universidade Federal de Santa Maria. Semen was collect in an individual room especially used for this purpose, by masturbation into a glass sterile disposable container. All men had been asked to abstain from ejaculation for at least 72 h before semen was collected. The samples were placed in CO₂ incubation at 37°C for 30 min so that seminal liquefaction could be performed before evaluating sperm parameters. All semen analyses were performed manually within 1 h after the sample had been collected. Sperm concentration was evaluated according to the World Health Organization's (WHO) recommendations. All assays were performed by researchers with extensive training and substantial experience in sperm analysis. In this study the human sperm quality patterns as sperm motility and morphology were not evaluated

since the main objective was to first evaluate the guaraná effect on sperm viability exposed to MeHg and the guaraná potential antioxidant effect as a causal mechanisms involved in the results obtained here.

The sperm samples were initially count to estimate the sperm concentration using formol saline 2.9% [36]. The sperm samples viability were also evaluated using trypan blue dye exclusion assay (1:1). Both analyses were performed in a Neubauer's chamber (Haemocytometer), and only semen samples with initial > 70% spermatozoa viability were used to test protocols. All experiments were performed with 2×10^8 /mL sperm cell concentration in a Tris modified medium [37].

2.4 Guaraná extract

The guaraná powder using in sperm treatments was kindly supplied by EMBRAPA, Amazonia Ocidental (Agropecuary Research Brazilian Enterprise). The guaraná powder was stored in dry conditions at $\pm 4^\circ\text{C}$ and was protected from light until the extract preparations to perform the chemical analyses of main bioactive compounds and production of capsules used in the volunteer's treatment. To determine the bioactive compounds present in guaraná powder was produced a hydro-alcoholic extract based on the small solubility of guaraná powder from the standard means of alcohol and water (70:30) to 100 mL of extraction fluid prepared at a concentration of 300 mg/mL. After 21 days of extraction, the preparation was centrifuged at 3000 rpm for 10 min, and the supernatant was isolated. The resulting solution was lyophilised to determine xanthine and catechin compositions as well as in experimental procedures. The main bioactive compounds presented in guaraná extract were determined by the chromatographic analysis performed on a HPLC system based on UV absorbance at 272 nm. A 150 mm \times 4.6 mm. ODS-3 column (5-

µm particle size) was used for the separation as described in Carlson and Thompson [38]. The total concentration of bioactive compounds in guaraná extract was 1.2% of caffeine, 0.6% of theobromine and theophylline and 0.4% of catechins.

2.5 Cell viability assay

The cytotoxicity effects of MeHg on the viability of spermatozoa exposed or not exposed to guaraná supplementation were analyzed by MTT reduction assay [39,40]. Briefly, the samples of treatments were harvested and added to microtubes. Cells were stained for 2 hours at 37°C with 10 µL/well MTT (3-[4,5dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolic bromide) reagent at 10% concentration and 5 mg/mL in DPBS. Then, 100 µL of DMSO was added per well to solubilize the purple formazan crystals produced. The absorbance of each well was measured at 570 nm and 630 nm with a fluorimeter. The results were expressed as the average percentage of concentration compared to the control.

2.6 Oxidative biomarkers assays

From the cytotoxicity results we perform a complementary protocol using guaraná concentration that presented best protective effect against MeHg to evaluate its effect on sperm oxidative metabolism. In this protocol biochemical oxidative biomarkers were evaluated among the treatments: lipoperoxidation, protein carbonylation, ROS production, thiols (protein and non-protein) levels and total polyphenols levels.

2.6.1 Lipid peroxidation

Malondialdehyde (MDA) is a by-product of enzymatic eicosanoid formation and an end-product of nonenzymatic peroxidation of polyunsaturated fatty acids with three or more bisallylic double bonds. The determination of the thiobarbituric acid derivative of MDA (TBA-MDA) is a widely used method for estimating overall lipid peroxidation that in this study was determined using a sensitive high-performance liquid chromatographic (HPLC) method with spectrofluorimetric detection. The determination of the amount of total free-pure MDA (f-ptMDA) by HPLC [34,41,42], was performed with an aliquot of sperm cells (1 ml) washed twice with 1 mL of saline solution and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The pellet obtained was collected (200 μ L) and transferred to a plastic tube (2 mL). The sample was mixed with H_3PO_4 (0.44 M), 40 μ L of NaOH (3M) and H_2O_2 (twice distilled, 0.40 mL) and the mixture was heated in a boiling-water bath for 60 min. After, H_3PO_4 (200 μ L) and thiobarbituric acid (TBA, 200 μ L) were added in the sample and incubate 90° C in a water bath for 45 min. The sample was removed from the bath and cooling on ice. 80 μ L of sulfato sodium dodecyl (SDS) was added and mixed with sample. 500 μ L of n-butanol was added and shaken using a mixer for 1 min. After this procedure the sample was centrifuged at 4° C, 3000 rpm for 10 minutes. The supernatant of samples were filtered (filter number 13) and injected into HPLC equipment. The flow rate was 0.8 mL min⁻¹. Fluorimetric detection was performed with excitation at 527 nm and emission at 551 nm. The peak of the MDA-TBA adduct was calibrated with a TEP standard solution processed in exactly the same way as sperm cell samples.

2.6.2 Protein carbonylation analysis

Protein carbonyls were spectrophotometrically measured according to the method previously described [43]. Results were expressed as nanomoles of carbonyl groups per mg protein.

2.6.3 ROS production assay

The effect guaraná treatments on ROS production by freezing sperm was measured using DCFH-DA oxidation assay. Intracellular ROS production was detected in sample cells using the non-fluorescent cell permeating compound 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). DCFH-DA is hydrolyzed by intracellular esterases to DCFH, which is trapped within the cell. This non-fluorescent molecule is then oxidized to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) by cellular oxidants. The sample cells from different treatments were treated with DCFH-DA (10 μ M) for 60 min at 37 °C. The fluorescence was measured at an excitation of 485 nm and an emission of 520 nm. The calibration curve was performed with standard DCF (0–1mM), and the level of ROS production was calculated as nmol DCF formed/mg protein [44].

2.6.4 Total Thiols analysis

Total sperm cell SH groups (TSH) is the sum of protein SH groups (PSH) and low molecular weight thiols. SH was determined spectrophotometrically with the use deoxyribonucleotide phosphate (DNTP). Ellman [45] with some modifications. To determine NPSH, the sperm cells were washed with saline solution (NaCl 0.9%, 1:1

dilution) and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The supernatant was discarded. Triton (0.01%, 1:1) was well as 1mL of 20% trichloroacetic acid (TCA). The samples were centrifuged again at 3000 rpm for 10 min. After the centrifugation, the supernatant was collected and used to determine the free-SH groups (NPSH) levels by spectrophotometry. For SH determination, samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The 50 μ L pellet was removed and added 1250 μ L 0.1M Tris buffer, 150 μ L and 50 μ L of water DNTB. In addition, a blank was measured for each sample, excluding DNTB. After 15 min, the samples were read in spectrophotometer at 412 nm.

2.6.5 Total polyphenols

Total polyphenols found in sperm homogenate from different treatments were spectrophotometrically determined by reading the absorbance at 750 nm (Folin–Ciocalteu method) and using gallic acid as a standard, as described by Chandra and de Mejia [46]. Total phenol concentrations of sperm samples were determined after a procedure of acid extraction/hydrolysis and protein precipitation with 0.75 mol L⁻¹ metaphosphoric acid (MPA). For hydrolyzing the conjugated forms of polyphenols, hydrochloride acid was added to the sample, followed by sodium hydroxide in methanol. This step breaks the links of polyphenols with lipids and provides a first extraction of polyphenols. MPA was used in this procedure for removing plasma proteins. The final extraction of polyphenols was performed by adding a 1:1 (v/v) solution of acetone:water. The results were expressed as the gallic acid equivalent (GAE) in mg L⁻¹.

2.7 Statistics

All analyses were carried out using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). The comparison among treatments was performed using One-way analysis of variance followed by a *post hoc* Duncan's test. All p values were two-tailed. The alpha value was set to $p \leq 0.05$ to determine statistical relevance.

3 Results

3.1 Sperm viability

The MeHg exposition decreased significantly the sperm viability when compared to control group ($p=0.001$). However, in the presence of guaraná supplementation the viability increases in a guaraná extract concentration-dependent matter (Figure 1). The viability ranged 4-10 times more higher than MeHg treatment when the guaraná was supplemented in the three different concentrations in sperm medium.

Figure 1 here

3.2 Oxidative biomarkers

From the results obtained in sperm cell viability analysis additional investigations evaluating the oxidative biomarkers modulation in human sperm cells exposed to MeHg and treated with guaraná at 10 mg/mL concentration were analyzed.

The lipoperoxidation among sperm cells no exposed and exposed to MeHg was similar after 2 h treatment. Despite we did not observe significant differences between control and MeHg treatments. The guaraná supplementation showed protective effect since decreased significantly the lipoperoxidation. The results obtained are summarized in Table 1.

Table 1 here

The ROS production was also influenced by the human sperm cells treatments. Whereas MeHg and control groups presented higher ROS production the guaraná supplementation decreased significantly the levels of molecules. ROS levels comparison between control and guaraná groups showed 6.8 times more ROS in the not treated (control and MeHg groups) than guaraná treated sperm cells. ROS levels comparison between sperm cells exposed to MeHg with and without guaraná supplementation also showed 6.3 times more ROS in the cells with MeHg treatment.

Protein carbonylation showed higher concentration in control group whereas the MeHg group presented intermediary values and the treatments that received guaraná supplementation lower values. The thiols proteic and non proteic did not present significant differences among the four treatments tested here.

The total polyphenols were evaluated among all for treatments. As expected when is made supplementation with some antioxidant compound such as guaraná extract, the groups supplemented with guaraná presented higher polyphenol levels than control and MeHg groups.

4 Discussion

We described here a protective effect of guaraná extract against *in vitro* MeHg cytotoxicity and oxidative stress of human sperm cells. These results are in consonance with previous *in vitro* and *in vivo* studies that suggested negative effect of inorganic or organic forms of mercury including MeHg on sperm cells and reproductive organs of experimental animal [1,6,8].

One of the main mechanisms responsible for the toxicity of mercury forms including MeHg studied here is the induction of oxidative stress [47]. The ROS that is most damaging to human spermatozoa is hydrogen peroxide (H_2O_2). It was demonstrated that H_2O_2 is most toxic to spermatozoa leading to inhibition of sperm movement and decrease in energy production decreasing the viability [48].

The decrease in sperm cell viability observed from MeHg exposition of sperm cell in the present study could be triggered by significant and cell alterations. Evidences showed that sperm defective cells have a tendency to default to an apoptotic pathway associated with motility loss, caspase activation, phosphatidylserine exteriorization and the activation of free radical generation by the mitochondria. The latter induces lipid peroxidation and oxidative DNA damage, which then leads to DNA fragmentation and cell death. In health conditions the physical architecture of spermatozoa prevents any nucleases activated as a result of this apoptotic process from gaining access to the nuclear DNA and inducing its fragmentation. It is for this reason that a majority of the DNA damage encountered in human spermatozoa seems to be oxidative [49].

Due the potential sperm cell damage caused by oxidative stress investigation about the effects of natural compounds and dietary components as antioxidants has attracted a growing scientific interest [50]. Many studies have shown that protective

effects against oxidative stress damage and an improvement of the overall functional parameters of spermatozoa can be provided by supplementing sperm preparation media with antioxidants such as vitamin E, catalase (CAT), ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) [7,8,51,52]. However, the number of studies investigating antioxidant protective effects from dietary source on sperm cells exposed to MeHg is still scarce.

Our results, at least indicate that extracts from fruits and vegetables habitually consumed by populations exposed to mercury contamination could minimize the toxic effects of this metal. The hypothesis of food protective effects against mercury contamination, especially MeHg are previously investigated by authors as Grotto et al [35] that evaluated a possible protective effect of fish oil against oxidative damage promoted by MeHg sub-chronically exposed rats. Reduced glutathione peroxidase and catalase enzyme activity and reduced glutathione levels were observed in MeHg-exposed animals compared to controls. However, the protection found in the study seems probably related to the anti-inflammatory effects of fish oil. Foods rich in selenium as Brazilian nut could help to minimize the toxic effect of MeHg exposition [12].

However, foods rich on other antioxidant compounds could also minimize the MeHg toxicological effects. Our data corroborate this hypothesis suggesting that guaraná extract have a positive influence on sperm cell cytotoxicity and if its effects are related to differential oxidative stress modulation in its cells.

The increase in sperm cell viability observed in cell sperm treated with guaraná extract could be related to decrease in cell alterations that lead to sperm apoptosis or necrosis. However, complementary investigations need to be performed

to evaluate if the guaraná extract protect the sperm DNA against oxidative stress related to MeHg exposition from similar protocols performed here.

The ROS levels and lipid peroxidation modulation probably contribute as causal mechanism related to guaraná protection against human sperm cell MeHg exposition. Lipid peroxidation is the process of oxidative degradation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and its occurrence in biological membranes causes impaired membrane function, structural integrity, decrease in membrane fluidity and inactivation of a several membrane bound enzymes [53]. Several studies [54,55] has suggested a strong correlation between mercury-induced toxicity and the induction of lipoperoxidation including in rat tests [56]. The peroxidation of PUFAs in membrane lipids is considered to be mechanism to arrest sperm functions. As a consequence of lipid peroxidation, PUFAs in plasma membranes undergo degradation by a chain reaction and ultimately lead to the production of cytotoxic aldehydes including malondiealdehyde [57].

On the other hand, previous investigations also described protective effect of antioxidant compound on lipid peroxidation caused by mercury compound male reproductive cells exposition [14,58]. Therefore, is plausible to suggest that guaraná decrease the human sperm cell lipoperoxidation against MeHg. This important since the mammalian spermatozoa are rich in PUFAs and are thus very susceptible to ROS attack. Some studies as performed by De Lamirande and Gagnon [58] showed occurrence of rapid loss of intracellular ATP, causing axonemal damage and an increase in mid piece morphology defects, with deleterious effects on sperm capacitation and the acrosome reaction.

Since the guaraná treatments did not present differential modulation of thiol groups (SH and NPSH) probably its antioxidant activity is related to H₂O₂ and other ROS compounds scavenger produced from MeHg exposition.

The guaraná antioxidant effect probably is related to main bioactive compound present in its composition: caffeine, theobromine, theophylline and catechins. Caffeine (1,3,7-trimethylxantine) is a naturally occurring alkaloid that is present not only in coffee but also in seeds, citrus fruits, olive oil, tea, and cocoa beverages [59]. Previous studies suggest that caffeine presents an antioxidant activity has an excellent OH[•] scavenging activity [60].

Caffeine has been used as chemical activator to improve the sperm competence and *in vitro* fertilization (IVF) success in animals as rhesus monkey and baboons [61] and induces Cs ram sperm hyperactivation independent of cAMP-dependent protein kinase [62].

Catechin also present in guaraná extract include the epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is a known green tea polyphenol that exhibits an important antioxidant activity. The study performed to evaluate the effect of antioxidants on boar spermatozoa during sorting and storage observed that the EGCG plus superoxide dismutase in association with seminal plasma was effective in exerting some compensatory protection against detrimental effect of storage on sorted semen [63]. However, studies as performed by Spinaci et al. [64] suggested that high EGCG concentrations could affect negatively *in vitro* maturation and fertilization in pig. These results suggested that the catechin concentration have influence on sperm effects. However, we did not find previous studies evaluating the effect of catechin on sperm or reproductive organs exposed to MeHg.

5 Conclusions

In conclusion, the guaraná supplementation showed a protective and antioxidant effect on viability and oxidative stress of human cell sperm exposed to MeHg. These guaraná effects probably decreasing the H₂O₂ and other ROS compound levels produced by MeHg exposition.

Acknowledgments

The authors are grateful to Mr. Carlos Eduardo Silveira dos Santos to help assistance to perform the study protocols. This work was supported by the Grants and Fellowships from research Brazilian agencies: CAPES, CNPq, FAPERGS and FAPEAM.

References

- [1] A. Agarwal, K.P. Nallella, S.S. Allamaneni, T.M. Said, Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *RBMOnline*. 8 (2004) 616–627.
- [2] R.J. Aitken, B.J. Curry, Redox Regulation of Human Sperm Function: From the Physiological Control of Sperm Capacitation to the Etiology of Infertility and DNA Damage in the Germ Line. *ARS*. 14 (2011) 367-381. AITKEN e CURRY, 2011
- [3] Alvarez and Storey, 1982 J.G. Alvarez, B.T. Storey, Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: Its effect on sperm motility. *Biol. Reprod.* 27 (1982) 1102-1108.
- [4] J.G. Alvarez, B.T. Storey, Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* 30 (1984) 833-841.
- [5] E. Gil-Guzman, M. Ollero, M. C. Lopez, R. K. Sharma, J.G. Alvarez, A.J. Thomas Jr, A. Agarwal, Differential production of reactive oxygen species by subsets of

human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod.* 16 (2001) 1922–1930.

[6] E.W. Wong, C.Y. Cheng, Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends Pharmacol Sci.* 32 (2011) 290-299.

[7] N.K. Mottet, M.E. Vahter, J.S. Charleston, L.T. Friberg, Metabolism of methylmercury in the brain and its toxicological significance. In: Sigel, A., Sigel, H. (Eds.), *Metal ions in biological systems: Mercury and its effects on environment and biology.* Dekker, New York. 34 (1997) 371–403.

[8] T.W. Clarkson, L. Magos, The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 36 (2006) 609–662.

[9] M.A.K. Khan, F. Wang, Mercury-Selenium compounds and their toxicological significance: toward a molecular understanding of the mercury-selenium antagonism. *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (2009) 1567–1577.

[10] J. Parziek, I. Ostadalova, J. Kalouskva, A. Babichy, J. Benes, The detoxifying effects of selenium. Interrelation between compounds of selenium and certain metals. In: Mertz, W., Cornatzer, W.E. (Eds.), *Newer trace elements in nutrition.* Dekker, New York, pp. (1971) 85–122.

[11] C.M.L. Carvalho, J. Lu, X. Zhang, E.S.J. Arnér, A. Holmgren, Effects of selenite and chelating agents on mammalian thioredoxin reductase inhibited by mercury: implications for treatment of mercury poisoning. *FASEB J.* 25 (2011) 370–381.

[12] N.V. Ralston, L.J. Raymond, Dietary selenium's protective effects against methylmercury toxicity. *Toxicology.* 278 (2010) 112-123.

[13] M.J. Berry, N.V. Ralston, Mercury toxicity and the mitigating role of selenium. *Ecohealth.* 5 (2008) 456-459.

[14] R.J. Aitken, Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction Fertility and Development.* 7(1995) 659–668.

[15] M.V. Rao, B. Gangadharan, Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. *Toxicol In Vitro.* 22 (2008) 935-942.

[16] M.V. Rao, P.S. Sharma, Protective effect of vitamin E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice. *Reprod Toxicol.* 15 (2001) 705-712.

[17] F.M. Uckun, X.P. Liu, O.J. D'Cruz, Human sperm immobilizing of activity aminophenyl arsenic acid and its N-substituted quinazoline, pyrimidine, and purine derivatives: protective effect of glutathione. *Reprod Toxicol.* 16 (2002) 57-64.

[18] H. de Lazlo, P.S. Henshaw, . Plant materials used by primitive people to affect fertility. *Science.* 119 (1954) 626–631.

- [19] Z. Chen, C.P. Yin, J.H. Liu, J.G. Fang, W.Q. Wang, Extract of *Acanthopanax senticosus* improves sperm motility of asthenospermia patients in vitro. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 13 (2007) 21–23.
- [20] L. Maurice-Bourgoin, I. Quiroga, J. Chincheros, P. Courau, Mercury distribution in waters and fishes of the upper Madeira rivers and mercury exposure in riparian Amazonian populations. *Sci Total Environ*. 260 (2000) 73-86.
- [21] M. Lemire, M. Fillion, F. Barbosa Jr, J.R. Guimarães, D. Mergler, Elevated levels of selenium in the typical diet of Amazonian riverside populations. *Sci Total Environ*. 408 (2010) 4076-4084.
- [22] J.R. León-Carmona, A. Galano, Is caffeine a good scavenger of oxygenated free radicals? *J Phys Chem B*. 115 (2011) 4538-4546.
- [23] B.N. Singh, S. Shankar, R.K. Srivastava, Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol*. 82 (2011) 1807-1821.
- [24] K.W. Andrews, A. Schweitzer, C. Zhao, J.M. Holden, J.M. Roseland, M. Brandt, J.T. Dwyer, M.F. Picciano, L.G. Saldanha, K.D. Fisher, E. Yetley, J.M. Betz, L. Douglass, The caffeine contents of dietary supplements commonly purchased in the US: analysis of 53 products with caffeine-containing ingredients. *Anal. Bioanal. Chem*. 389 (2007) 231-239.
- [25] J.P. Higgins, T.D. Tuttle, C.L. Higgins, Energy beverages: content and safety. *Mayo Clin. Proc*. 85 (2010) 1033-1041.
- [26] R. Mattei, R.F. Dias, E.B. Espínola, E.A. Carlini, S.B. Barros, Guaraná (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidants activity in vitro. *J. Ethnopharmacol*. 60 (1988) 111-116.
- [27] D.O. Kennedy, C.F. Haskell, K.A. Wesnes, A.B. Scholey, Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with *Panax ginseng*. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 79 (2004) 401-411.
- [28] F.O. Jimoh, M. O. Sofidiya, A.J. Afolayan, Antioxidant properties of the methanol extracts from the leaves of *Paulliniapinnata*. *J Med Food*. 10 (2007) 707-711.
- [29] C. Costa Krewer, E.E. Ribeiro, E.A. Ribeiro, R.N. Moresco, M.I. Ugalde Marques da Rocha, G.F. Santos Montagner, M.M. Machado, K. Viegas, E. Brito, I.B. Cruz, Habitual Intake of Guaraná and Metabolic Morbidities: An Epidemiological Study of an Elderly Amazonian Population. *Phytother Res*. doi: 10.1002/ptr.3437 (2011).
- [30] H. Fukumasu, T.C. da Silva, J.L. Avanzo, C.E. de Lima, I.I. Mackowiak, A. Atroch, A. de Souza Spinos, F.S. Moreno, M.L. Dagli, Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Letters*. 233 (2006) 158-164.

- [31] H. Fukumasu, J.L. Avanzo, M.K. Nagamine, J.A. Barbuto, K.V. Rao, M.L. Dagli, *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 41 (2008) 305-310.
- [32] R.P. Leite, R.S. Wada, J.C. Monteiro, F.S. Predes, H. Dolder, Protective Effect of Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) Pre-treatment on Cadmium-Induced Damages in Adult Wistar Testis. *Biol. Trace. Elem. Res*. 141 (2011) 262-274.
- [33] C.E. Pinheiro, S.S. de Oliveira, S.M. da Silva, M.I. Poletto, C.F. Pinheiro, Effect of guaraná and *Stévia rebaudiana bertonii* (leaves) extracts, and stevioside, on the fermentation and synthesis of extracellular insoluble polysaccharides of dental plaque. *Rev. Odontol. USP*. 1 (1987) 9-13.
- [34] E. Yamaguti-Sasaki, L.A. Ito, V. C. Canteli, T.M. Ushirobira, T. Ueda-Nakamura, B.P. Dias Filho, C.V. Nakamura, J.C. de Mello, Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. *Molecules*. 12 (2007) 1950-1963.
- [35] L.B. Bittencourt, D.C. Machado, M.M. Machado, G.F.F. dos Santos, T.D. Algarve, D.R. Marinowic, E.E. Ribeiro, F.A.A. Soares, M.L. Athayde, I.B.M. da Cruz, The *in vitro* protective effects of guaraná (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. *Phytochemistry*. In press (2011).
- [36] J.L. Hancock, The morphology of boar spermatozoa. *J. Roy. Microsc. Soc*. 76 (1957) 84-97.
- [37] S.J. Roberts, *Veterinary obstetrics and genital diseases*, Theriogenology, Michigan, Na Arbor Edwards Brothers, 1986.
- [38] M. Carlson, R.D. Thompson, Liquid chromatographic determination of methylxanthines and catechins in herbal preparations containing guaraná. *J. AOAC Int*. 81 (1988) 691-701.
- [39] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods*. 65 (1983) 55–63.
- [40] S. Krishna, S.A. Boren, E. A. Balas, Healthcare via Cell Phones: A Systematic Review. *Mary Ann Liebert, Inc*. 15 (2009) 231-241.
- [41] D. Grotto, L.D. Santa Maria, S. Boeira, J. Valentini, M.F. Charão, A.M. Moroa, P.C. Nascimento, V.J. Pomblum, S.C. Garcia, Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography–visible detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 43 (2007) 619–624.
- [42] D. Grotto, J. Valentini, S. Boeira, C. Paniz, L. Santa Maria, J. Vicentini, A. Moro, M. Charão, S.C. Garcia, Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo – malondialdeído. *Quimica Nova*. 31 (2008) 275-279.

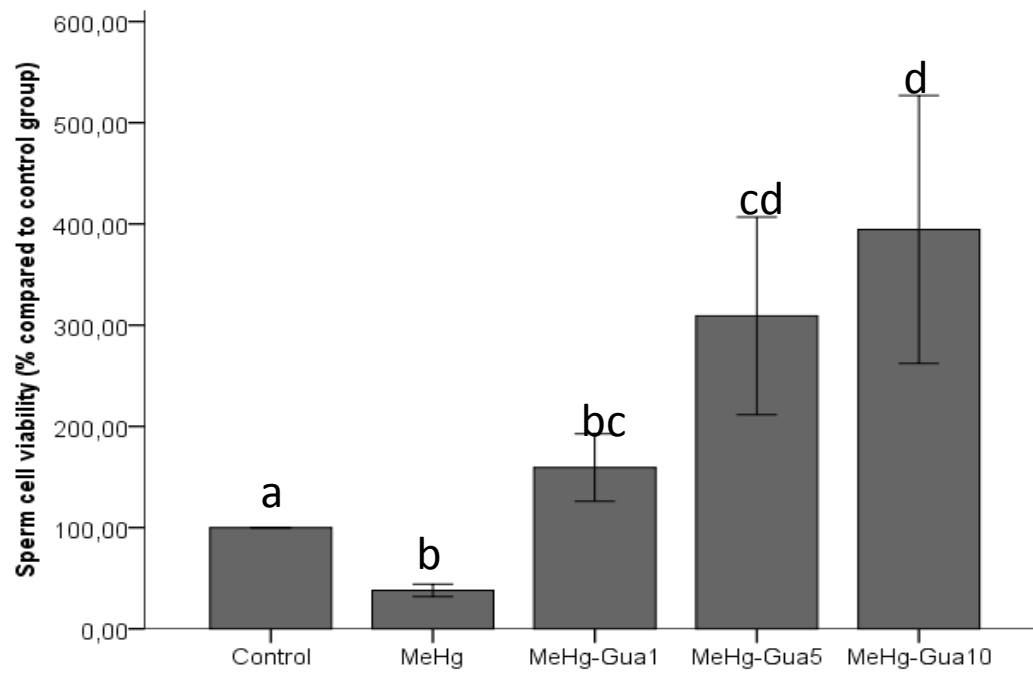
- [43] R. L. Levine, C. N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A. G. Lenz, B. W. Ahn, S. Shaltiel, E. R. Stadtman. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186 (1990) 464-78.
- [44] D.R. Wallace, S.L. Dodson, A. Nath, R.M. Booze, Delta opioid agonists attenuate TAT(1-72)-induced oxidative stress in SK-N-SH cells. *Neurotoxic.* 27 (2006) 101-106.
- [45] G.L. ELLMAN, Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 82 (1959) 70-77.
- [46] S. Chandra, E.G. de Mejia, Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 3583–3589.
- [47] P. Grover, B.S. Banu, K.D. Devi, S. Begum, In vivo genotoxic effects of mercuric chloride in rat peripheral blood leucocytes using comet assay. *Toxicology*, 167 (2001) 191–197.
- [48] J.S. Armstrong, M. Rajsekharan, W. Chamulitrat, P. Gatti, W.J. Hellstrom, S.C. Sikka, Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Rad Biol Med.* 26 (1999) 869–880.
- [49] R.J. Aitken, A.J. Koppers, Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl.* 13 (2011) 36-42.
- [50] F. Ben Abdallah, N. Zribi, L. Ammar-Keskes, Antioxidative potential of quercetin against hydrogen peroxide induced oxidative stress spermatozoa in vitro. *Andrologia.* 43 (2011) 261-265.
- [51] H.J. Chi, J.H. Kim, C.S. Ryu, J.Y. Lee, J.S. Park, D.Y. Chung, S.Y. Choi, M.H. Kim, E.K. Chun, S.I. Roh, Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 23 (2008) 1023–1028.
- [52] F. Ben Abdallah, H. Fetoui, N. Zribi, F. Fakfakh, L. Ammar-Keskes, Antioxidant supplementation *in vitro* improve rat sperm parameters and enhance antioxidant enzyme activities against dimethoate-induced sperm damages. *Andrologia.* doi: 10.1111/j.1439-0272.2011.01177.x. [Epub ahead of print]. (2011)
- [53] M. Valko, H. Morris, M.T.D. Cronin, Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*, 12 (2005) 1161–1208.
- [54] G. Sener, O. Sehirli, A. Tozan, A. Velioglu-Ovunc, N. Gedik, G.Z. Omurtag, *Ginkgo biloba* extract protects against mercury(II)-induced oxidative tissue damage in rats. *Food Chem Toxicol*, 45 (2007), 543–550.

- [55] M.K. Sharma, A. Sharma, A. Kumar, M. Kumar, *Spirulina fusiformis* provides protection against mercuric chloride induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Food Chem Tox*, 45 (2007) 2412–2419.
- [56] M.A. Boujbiha, K. Hamden, F. Guerhazi, A. Bouslama, A. Omezzine, A. Kammoun, A. El Feki, Testicular toxicity in mercuric chloride treated rats: association with oxidative stress. *Reprod Toxicol*. 28 (2009) 81-89.
- [57] G. Şener, A. Özer Şehirli, G. Ayanog˘lu-Dlger, Melatonin Protects Against Mercury(II)-Induced Oxidative Tissue Damage in Rats. 93 (2003) 290-296.
- [58] E. De Lamirande, C. Gagnon, Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes; and II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *Journal of Andrology*. 13 (1992) 368–386.
- [59] S. Nafisi, F. Manouchehri, H.-A. Tajmir-Riahi, M. Varavipour, Structural features of DNA interaction with caffeine and theophylline. *J. Mol. Struct*. 875 (2008) 392-399.
- [60] J.R. León-Carmona, A. Galano, Is caffeine a good scavenger of oxygenated free radicals? *J Phys Chem B*. 115 (2011) 4538-4546.
- [61] A. Nyachieo, C. Spiessens, D.C. Chai, N.M. Kiulia, J.M. Mwenda, T.M. D'Hooghe, Separate and combined effects of caffeine and dbcAMP on olive baboon (*Papio anubis*) sperm. *J Med Primatol*. 39 (2010) 137-142.
- [62] C. Cols, J.A. Cebrin-Prez, T. Muo-Blanco, Caffeine induces ram sperm hyperactivation independent of cAMP-dependent protein kinase. *Int J Androl*. 33 (2010)187-197.
- [63] C. Vallorani, M. Spinaci, D. Bucci, C. Tamanini, G. Galeati, Effects of antioxidants on boar spermatozoa during sorting and storage. *Anim Reprod Sci*. 122 (2010) 58-65.
- [64] M. Spinaci, S. Volpe, M. De Ambrogi, C. Tamanini, G. Galeati, Effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on in vitro maturation and fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology*. 69 (2008) 877-885.

Legends

Figure 1 - **Viability of sperm cells by MTT assay.** Samples divided into five treatments: negative control (only sperm), (60 μ M) MeHg, (60 μ M) MeHg + 1mg/mL Gua; (60 μ M) MeHg + 5mg/mL Gua, (60 μ M) MeHg + 10mg/mL Gua. All samples were at a cell concentration of 2X10⁸ cells/mL.

Figure 1



Legends

Table 1 – Comparison among human sperm oxidative metabolism biomarkers exposed to methyl Mercury (MeHg) and guaraná (*Paullinia cupana*) supplementation

Table 1

Variables	Control	MeHg	Guaraná	MeHg plus Guaraná	p
	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE	
Lipoperoxidation	89±6,5 ^a	82±9 ^a	18,5± 1,31 ^b	40,13± 5,03 ^b	0.0001
DCFH	33,1±2,5 ^a	31,3±1,3 ^a	5,4±0,6 ^b	4,6±0,6 ^b	0.0001
Protein carbonylation	3,14±0,31 ^a	1,66±0,12 ^b	0,74±0,09 ^c	0,73±0,11 ^c	0.0001
NPSH	0,07±0,01 ^a	0,09±0,00 ^a	0,04±0,00 ^a	0,02±0,03 ^a	0.104
SH	6,5±2,7 ^a	4,51±1,9 ^a	0,9±0,4 ^a	1,32±0,6 ^a	0.085
Total polyphenols	1,1±0,08 ^a	1,31±0,1 ^a	1,5±0,06 ^b	1,6±0,14 ^b	0.014

SE= standard error; MDAL-HPLC (μmol/L), Protein carbonylation (nmol/mg), DCFH (%); NPSH (nmol NP-SH/mL); SH (nmol P-SH/mL); Total polyphenols (mg/L). Different letters indicated statistical differences compared by Anova One-Way followed by Duncan test (p<0,05).

4 DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado que o aumento de mortalidade e estresse oxidativo de espermatozoides humanos expostos *in vitro* ao MeHg é minimizado quando ocorre suplementação com extrato de guaraná. Estes resultados são relevantes uma vez que sugerem que compostos bioativos presentes no guaraná, que é um fruto amazônico, podem minimizar a toxicidade do mercúrio nas células reprodutivas humanas.

Muitos grupos de pesquisas têm voltado seus estudos aos danos causados em seres humanos pela exposição ao MeHg. Devido a diversos mecanismos propostos para explicar a toxicidade decorrente da exposição por mercúrio, no entanto nenhum destes mecanismos está totalmente esclarecido. Dentre estes mecanismos, parece que o estresse oxidativo tem um papel relevante na toxicidade do MeHg às células. Tal estresse parece ser desencadeado pela alta afinidade química do MeHg por grupamentos tióis, presentes em muitas moléculas, tais como glutathione, cisteína, metalotioneína e albumina (CLARKSON, 1997), as quais são bases para o transporte, ligação, detoxificação, metabolismo e distribuição de MeHg nos sistemas biológicos (AGARWAL e SALEH, 2002). Entretanto, com a exposição crônica e aumentada das células ao MeHg, pode haver depleção destas moléculas do organismo, principalmente a glutathione, o que irá desencadear alterações metabólicas negativas que levam ao estresse oxidativo.

No caso, o estresse oxidativo ocorre pois a glutathione é uma molécula que faz parte de um conjunto de enzimas que inclui a glutathione peroxidase. Tal enzima tem como principal função catalisar o H_2O_2 em água. Este radical é formado a partir do sistema enzimático antioxidante em que a enzima SOD dismuta o radical superóxido em H_2O_2 . Os níveis elevados de H_2O_2 são altamente prejudiciais às células porque tendem a se ligar com metais presentes no citoplasma como o ferro e o zinco em um processo conhecido como reação de Fenton. O principal produto da reação de Fenton é a formação do radical hidroxila que, por sua vez tem alta afinidade por moléculas de ácidos nucleicos, em especial o DNA causando quebras e mutações. Danos no material genético podem desencadear apoptose celular (morte celular programada) ou mutações que podem levar a disfunções celulares, a problemas

genéticos no embrião, caso a célula afetada for um gameta, ou ao câncer. Além disto, o aumento da H_2O_2 também aumenta os níveis de peroxidação lipídica que atacam a membrana celular de células somáticas e gaméticas (HUANG et al., 1996; LUND et al., 1991; LUND et al., 1993).

Dietrich e colaboradores (2010), que observaram resultados similares quando expuseram espermatozoides a diferentes concentrações de cádmio e de mercúrio. Ainda, Silva e colaboradores (2011) complementaram esta ideia, ao averiguar que animais expostos ao MeHg apresentaram diminuição na produção de células espermáticas e nos níveis de testosterona, condição esta que levou a infertilidade, corroborando investigações prévias como a de Boujbiha e colaboradores (2009) observaram que espermatozoides de ratos Wistar diminuía sua motilidade quando na exposição a diferentes concentrações de MeHg.

O impacto da exposição do MeHg nas células espermáticas também está associado a menor eficiência antioxidante destas células e a alta produção energética. Espermatozoides são células que demandam um alto gasto energético, por isso, geram altas quantidades de EROs. Além disso, espermatozoides necessitam de pequenas quantidades de EROs desde o processo de extrusão até a fecundação. No entanto, altas concentrações destas moléculas desbalanceadas, causam muitos danos, que podem ser presenciados até mesmo antes da formação completa dos espermatozoides, na espermiogênese. Ainda, Agarwal e colaboradores (2008) observaram a correlação entre a formação de EROS com retenção de citoplasma residual em espermatozoides. Esta retenção citoplasmática está relacionada a mecanismos mediados pela enzima citosólica glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), que está envolvida na regulação de NADPH. No caso, a excessiva produção destas moléculas está relacionada com níveis de EROS.

Desta forma, por serem praticamente desprovidos de enzimas antioxidantes, os espermatozoides tornam-se vulneráveis ao ataque das EROs (AITKEN e CURRY, 2011). Embora, pequenas quantidades EROs sejam essenciais para os espermatozoides, sabe-se que o desequilíbrio causado pelo excesso de EROs, adicionalmente pela diminuição de potencial antioxidante, gera o estresse oxidativo (AITKEN e CURRY, 2011). Assim, células espermáticas tornam-se um alvo fácil a lipoperoxidação, já que a membrana que recobre estas células é formada principalmente por PUFA's (AGARWAL et al., 2008; AITKEN e CURRY, 2011).

Especificamente, antioxidantes tem um papel crucial na manutenção da homeostase celular, agindo como sequestradores (*scavengers*) de EROs. Desta forma, o efeito da suplementação de compostos nutricionais antioxidantes no estresse oxidativo de espermatozoides está sendo cada vez mais investigado (GARCEZ et al., 2010; GROTTTO et al., 2010; LEITE et al., 2011; RAO e SHARMA, 2001). O presente trabalho inclui-se neste grupo de estudo já que investigou a utilização do extrato hidroalcoólico de *Paullinia cupana* (guaraná) como agente protetor a danos oxidativos gerados pela exposição *in vitro* de células espermáticas ao MeHg.

Os resultados aqui descritos estão em concordância com estudos prévios publicados na literatura, que sugerem ter o MeHg efeitos negativos sobre células espermáticas e órgãos reprodutivos de animais experimentais (AGARWAL et al., 2004; BOUJBIHA et al., 2009; CLARKSON e MAGOS, 2006; DIETRICH et al., 2010; SILVA et al., 2011). Assim, acredita-se que a diminuição da viabilidade de células espermáticas expostas ao MeHg observada no presente estudo pode ter sido causada por alterações significativas ou que levaram a apoptose ou a necrose celular.

A hipótese dos alimentos possuírem efeitos contra a contaminação por mercúrio foram também previamente investigadas por autores como Grotto e colaboradores (2011), que avaliaram um possível efeito protetor do óleo de peixe em ratos contra danos oxidativos promovidos por exposição sub-crônica ao MeHg. Entretanto, no estudo conduzido a proteção encontrada foi relacionada aos efeitos antiinflamatórios do óleo do peixe e não aos efeitos antioxidantes. Por outro lado, investigações envolvendo o fruto, castanha do Brasil, que é riquíssimo em Se mostrou que o mesmo minimiza significativamente os efeitos negativos do estresse oxidativo causados pela exposição ao MeHg. Vale comentar que o Se tem a capacidade de se ligar ao MeHg e depurá-lo do organismo, sendo considerado como uma molécula desintoxicante (RALSTON e RAYMOND, 2010).

No entanto, outros compostos antioxidantes também parecem minimizar estes efeitos tóxicos do MeHg, por exemplo através da catalisação do excesso de H_2O_2 nas células expostas a esta molécula. Os resultados aqui descritos corroboram essa hipótese, sugerindo que o extrato de guaraná exerce um influencia positiva sobre a citotoxicidade de células espermáticas e que seus efeitos potencialmente

estão relacionados com a modulação diferencial do estresse oxidativo causado pelo MeHg. O aumento da viabilidade de espermatozoides observado nas amostras tratadas com o extrato de guaraná pode estar relacionado à diminuição de alterações celulares que levam à morte celular. Embora investigações complementares *in vitro* e *in vivo* necessitem ser realizadas, principalmente para avaliar se o extrato de guaraná também protege os espermatozoides contra danos no DNA causados pelo estresse oxidativo, os resultados aqui descritos sugerem que o extrato de guaraná pode ser usado como um suplemento antioxidante ou mesmo nutricional que minimiza os efeitos tóxicos do MeHg.

Os baixos níveis de EROs e os efeitos sobre a modulação da peroxidação lipídica observados nos tratamentos com extrato de guaraná quando comparados aos tratamentos controle e com MeHg, provavelmente contribuem no aumento da viabilidade das células espermáticas frente a exposição ao MeHg. Esta sugestão é apoiada em evidências que mostram que a peroxidação lipídica é o processo de degradação de PUFA. A ocorrência de peroxidação lipídica em membranas biológicas faz com que ocorram disfunções como a perda da fluidez da membrana e da sua integridade estrutural, (VALKO et al., 2005). Assim, vários estudos têm sugerido uma forte correlação entre a toxicidade do mercúrio e a indução de lipoperoxidação, causando diminuição da função espermática (BOUJBIHA et al., 2009; SENNER et al., 2007; SHARMA et al., 2007). Como consequência da peroxidação lipídica, os PUFA sofrem degradação por uma série de reações em cadeia, levando à produção de aldeídos citotóxicos, incluindo o malondialdeído (MDA) (SENER et al., 2003).

Investigações anteriores também descreveram efeitos protetores de compostos antioxidantes sobre a peroxidação lipídica causada por exposição de células reprodutivas masculinas a compostos de mercúrio (BOUJBIHA et al., 2009). Portanto, é plausível sugerir que o extrato de guaraná é capaz de diminuir a lipoperoxidação de células espermáticas humanas causada pela exposição *in vitro* ao MeHg. Estes resultados podem ser considerados relevantes, já que estudos realizados por De Lamirande e colegas (1992) mostraram que a lipoperoxidação nos espermatozoides tem um impacto dramático na sua eficiência na fecundação já que induzem a perda rápida de ATP intracelular, danos relacionados à estrutura e função do flagelo, defeitos na morfologia gamética, bem como efeitos deletérios sobre a

capacitação espermática no trato vaginal e na reação acrossômica com o oócito. Este dois últimos são passos fundamentais para que ocorra a fecundação.

O efeito antioxidante do guaraná também foi corroborado a partir dos resultados que mostraram queda significativa nos níveis de carbonilação de proteínas entre os grupos tratados com guaraná, não tratados e somente tratados com MeHg. Os níveis de polifenóis totais aumentados nos tratamentos com guaraná também indicaram que a suplementação com este extrato, de fato aumentou a quantidade total de compostos bioativos no meio de cultura dos espermatozoides. Assim, estes níveis serviram como indicador de que o extrato, realmente possuía compostos bioativos polifenólicos que têm comprovadamente ação antioxidante.

Os resultados aqui descritos não observaram modulação diferencial nos níveis de grupamentos tióis (SH e NPSH) entre amostras expostas ao MeHg e suplementadas com extrato de guaraná e não suplementadas, provavelmente sua atividade antioxidante não está relacionada diretamente com o controle dos níveis de glutathione, mas sim com a catálise do H_2O_2 e outros compostos *scavenger* de radicais livres, produzidos a partir do MeHg. Por este motivo, o efeito antioxidante do guaraná, provavelmente, esteja relacionado com composto bioativos presentes na sua composição principalmente os que estão em maior concentração como a cafeína, teofilina, teobromina e catequinas. A cafeína (1,3,7-trimethylxantine) é alcalóide natural que não esta presente somente no café, mas também em sucos de frutas, óleo de oliva, chás, sementes e bebidas derivadas do cacau incluindo o chocolate (NAFISI et al., 2008). Estudos anteriores sugerem que a cafeína apresenta uma excelente atividade na retirada de radicais OH^+ (LEÓN-CARMONA e GALANO, 2011). A cafeína tem sido utilizada como ativador químico para melhorar a competência de espermatozoides e no sucesso de fertilizações *in vitro* (FIV) em animais como macacos Rhesus e babuínos (NYACHIEO et al., 2010).

As catequinas, também presentes no extrato de guaraná incluem a epinogalocatequina-3-galato (EGCG), que é conhecida como o principal composto polifenólico presente no chá verde. O EGCG apresenta uma grande atividade antioxidante. Um estudo realizado com espermatozoides de javali, mostrou que o EGCG estimulou o aumento da enzima SOD que estava presente no plasma seminal, e provavelmente por este motivo reduziu significativamente os efeitos prejudiciais relacionados ao armazenamento do sêmen (VALLORANI et al., 2010).

Entretanto, contrapondo estes resultados, estudos realizados por Spinaci e colaboradores (2008), sugerem que altas concentrações de EGCG poderiam afetar negativamente a maturação e fertilização *in vitro* em porcos. Estes resultados sugerem que a concentração de catequinas tem influencias sobre os efeitos em esperma. Todavia, não foram identificados estudos anteriores avaliando o efeito de catequinas no espermatozoide ou órgãos reprodutivos expostos ao MeHg. Sendo assim, este estudo indica que catequinas podem ter efeitos protetores em espermatozoides expostos ao MeHg. Entretanto, se a suplementação oral com guaraná ou com catequinas e xantinas como a cafeína, teobromina e teofilina poderiam diminuir o estresse oxidativo de espermatozoides humanos é uma questão em aberto que precisa ser investigada.

Além dos resultados obtidos é importante comentar as limitações metodológicas relacionadas ao estudo aqui desenvolvido. Uma delas foi à impossibilidade de averiguar os níveis das enzimas antioxidantes CAT e SOD nas amostras testadas. Ainda que as análises tenham sido realizadas (dados não mostrados), os níveis destas enzimas não foram detectáveis a ponto de permitir uma comparação entre os tratamentos. Possivelmente, isto ocorreu porque os espermatozoides são células que possuem níveis muito baixos de enzimas antioxidantes, como previamente foi comentado.

Outra limitação é a impossibilidade de realização de estudos controlados (ensaios clínicos) *in vivo* envolvendo seres humanos por questões éticas relacionadas à exposição ao MeHg dos voluntários, o que é inconcebível. Entretanto, os resultados aqui obtidos abrem perspectivas para a realização de estudos epidemiológicos transversais ou mesmo longitudinais que avaliem a qualidade do esperma e espermatozoides de homens expostos ao MeHg que consomem e não consomem habitualmente guaraná. Este estudo pode ter um delineamento experimental similar ao utilizado por Krewer et al. (2011) que comparou idosos incluídos nestas duas categorias e verificou que aqueles que relataram consumir habitualmente guaraná apresentavam menor prevalência de obesidade, níveis de LDL colesterol e também de produtos avançados de oxidação de proteínas (AOPPs).

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos a partir do tratamento de espermatozoides humanos com MeHg na presença e ausência de extrato de guaraná pode-se concluir que: (1) a suplementação com tal extrato foi eficiente para aumentar a viabilidade das células espermáticas, bem como diminuir (2) os níveis de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas, e também, (3) a produção de radicais livres. A proteção contra os danos causados provavelmente esteja ocorrendo via diminuição na produção e aumento da catálise de EROs, principalmente do H_2O_2 .

Sugere-se que pesquisas adicionais possam ser realizadas, principalmente para averiguar possível proteção a danos no DNA de células espermáticas humanas expostas *in vitro* ao MeHg e se esta associação estaria presente em seres humanos expostos ao MeHg que consomem habitualmente guaraná.

REFERENCIAS

AGARWAL, A.; MAKKER, K.; SHARMA, R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 59, p. 2 – 11. 2008.

AGARWAL, A.; NALLELLA, K.P.; ALLAMANENI, S.S.; SAID, T.M. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 8, p. 616–627. 2004.

AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S.A. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 43, n. 11, p. 963 – 974. 2005.

AITKEN, R.J. Gpx5 protects the family jewels. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, p. 1849 –1851. 2009.

AITKEN, R.J.; CURRY, B.J. Redox Regulation of Human Sperm Function: From the Physiological Control of Sperm Capacitation to the Etiology of Infertility and DNA Damage in the Germ Line. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, p. 367-381. 2011.

AITKEN, R.J.; KOPPERS, A.J. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p. 36-42. 2011.

ALABI, N.S.; WHANGER, P.D.; WU, A.S.H. Interactive effects of organic and inorganic selenium with cadmium and mercury on spermatozoal oxygen consumption and motility in vitro. **Biology of Reproduction**, n. 33, p. 911–919. 1985.

ALESSIO, L.; CAMPAGNA, M.; LUCCHINI, R. From lead to manganese through mercury: mythology, science, and lessons for prevention. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 50, n. 11, p. 779-787. 2007.

ANDERSON, G.L.; BOYD, W.A.; WILLIAMS, P.L. Assessment of subtle that endpoints for toxicity testing with the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Toxicology & Chemistry**, v. 20, p. 833–838. 2001.

ANDREWS, K.W; SCHWEITZER, A.; ZHAO, C.; HOLDEN, J.M.; ROSELAND, J.M.; BRANDT, M.; DWYER, J.T.; PICCIANO, M.F.; SALDANHA, L.G.; FISHER, K.D.; YETLEY, E.; BETZ, J.M. Douglass L. The caffeine contents of

dietary supplements commonly purchased in the US: analysis of 53 products with caffeine-containing ingredients. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 1, p. 231-9. 2007.

ARMSTRONG, J.S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P.; HELLSTROM, W.J.; SIKKA, S.C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 7-8, p. 869-80. 1999.

ARTEEL, G.E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, p. 153-158. 2001.

BARBOSA, A.C.; DE SOUZA, J.; DÓREA, J.G.; JARDIM, W.F.; FADINI, P.S. Mercury biomagnification in a tropical black water, Rio Negro, Brazil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 45, n. 2, p. 235-46. 2003.

BASILE, A.; FERRARA, L.; PEZZO, M. D.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana*. Mart. **Journal Ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 32-36. 2005.

BELLIARDO, F.; MARTELLI, A.; VALLE, M.G. HPLC determination of caffeine and theophylline in *Paullinia cupana* Kunth (guarana) and Cola spp. samples. **Z Lebensm Unters Forsch**, v. 180, n. 5, p. 398-401. 1985.

BEMPONG, D.K; HOUGHTON, P.J. Dissolution and absorption of caffeine from guarana. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v. 44, n. 9, p. 769-71. 1992.

BENOV, L.C., BENCHEV, I.C., MONOVICH, O.H. Thiol antidotes effect on lipid peroxidation in mercury-poisoned rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 76, p. 321. 1990.

BERUBE-PARENT, S., PELLETIER, C., DORE, J., TREMBLAY, A. Effects of encapsulated green tea and Guarana extracts containing a mixture of epigallocatechin-3-gallate and caffeine on 24 h energy expenditure and fat oxidation in men. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 94, n. 3, p. 432-6. 2005.

BISINOTI, M. C., JARDIM, W. F. O comportamento do metilmercúrio (metilHg)

no ambiente. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 593–600. 2004.

BITTENCOURT, L.B.; MACHADO, D.C.; MACHADO, M.M.; DOS SANTOS, G.F.F.; ALGARVE, T.D.; MARINOWIC, D.R.; RIBEIRO, E.E.; SOARES, F.A.A.; ATHAYDE, M.L.; DA CRUZ, I.B.M. The *in vitro* protective effects of guaraná (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Phytochemistry**. In press. 2011.

BLOOM, M. S. et al. Toxic trace metals and embryo quality indicators during in vitro fertilization (IVF). **Reproductive Toxicology**, v. 31, p. 164–170. 2011.

BOOZER, C. N., NASSER, J. A., HEYMSFIELD, S. B., WANG, V., CHEN, G., SOLOMON, J. L. An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight loss: a randomized, double-blind trial. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 25, n. 3, p. 316-24. 2001.

BOUJBIHA, M. A. HAMDEN, K.; GUERMAZI, F.; BOUSLAMA, A.; OMEZZINE, A.; KAMMOUN, A.; EI FEKI, A. Testicular toxicity in mercuric chloride treated rats: Association with oxidative stress. **Reproductive Toxicology**, v. 28, p. 81–89. 2009.

BRABO, E. S.; SANTOS, E. O.; JESUS, I. M.; MASCARENHAS, A. F. S.; FAIAL, K. F. Mercury contamination of fish and exposures of an indigenous community in Para state, Brazil. **Environmental Research Section**, v. 84, 197-203. 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. -Resolução RE nº 170, de 17 de agosto de 2001. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/170_01re.htm>. Acesso em 17 de maio de 2011.

BORGES, J.C.; SILVA, M.R.; GUIMARÃES, J.D.; ESPER, C.R.; FRANCESCHINI, P.H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.3, 2011.

BRUINS, M.R., KAPIL, S., OEHME, F.W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, p. 198-207, 2000.

BUDTZ-JORGENSEN, E.; GRANDJEAN, P.; JORGENSEN, P.J.; WEIHE, P.;

KEIDING, N. Association between mercury concentrations in blood and hair in methylmercury-exposed subjects at different ages. **Environmental Research**, v. 95, n. 3, p. 385-93. 2004.

BYDLOWSKI SP, YUNKER RL, SUBBIAH MT. A novel property of an aqueous guaraná extract (*Paullinia cupana*): inhibition of platelet aggregation in vitro and *in vivo*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, n. 3, p. 535-538. 1988.

BYDLOWSKI, S. P.; D'AMICO, E. A.; CHAMONE, D. A. An aqueous extract of guaraná (*Paullinia cupana*) decreases platelet thromboxane synthesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. 4, p. 421-424. 1991.

CAMPOS, A. R., BARROS, A. I., ALBUQUERQUE, F. A., M LEAL, L. K, RAO, V. S. Acute effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) on mouse behaviour in forced swimming and open field tests. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 5, p. 441-443. 2005.

CAMPOS, A.R.; BARROS, A.I.S.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 10, p.1199-202. 2003.

CARLSON, M.; THOMPSON, R.D. Liquid chromatographic determination of methylxanthines and catechins in herbal preparations containing guaraná. **Journal AOAC International**, v. 81, p. 691-701. 1998.

CASTELLINI, C. et al. *In vitro* toxic effects of metal compounds on kinetic traits and ultrastructure of rabbit spermatozoa. **Reproductive Toxicology**, v. 27, p. 46-54. 2009.

CLARKSON, T.W. The toxicology of mercury. **Critical Reviews in Clinical and Laboratory Science**, v. 34, p. 369-403, 1997.

CLARKSON, T.W.; VYAS, J.B.; BALLATORI, N. Mechanisms of mercury disposition in the body. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 50, n. 10, p. 757-64. 2007.

CLARKSON, T.W., MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Crit Rev Toxicol**, v. 36, p. 609-662. 2006.

CLIFTON, J.C., 2nd, Mercury exposure and public health. **Pediatric Clinics of North American**, v. 54, n. 2, p. 237-69. 2007.

CONQUER, J.A.; MARTIN, J.B.; TUMMON, I.; WATSON, L.; TEKPETEY, F. Effect of DHA supplementation on DHA status and sperm motility in asthenospermic males. **Lipids**, v. 35, p. 149–154. 2000.

CUI, K.; LUO, X.; XU, K.; VEM MURTHY, M.R. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. **Progress in Neuropsychopharmacol and Biological Psychiatry**, v. 28, n. 5, p. 771-799, 2004.

De JESUS, I. M.; SANTOS, E. C. O.; BRABO, E. S.; LOUREIRO, E. C. B.; CÂMARA, V. M.; MASCARENHAS, A. F. S.; DA SILVA, D. F. L.; CLEARY, D. Exposure to elemental mercury in urban workers and gold miners from the Tapajos Region, Para, Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 67, n. 3, 317-323. 2001.

De LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes; and II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 368–386. 1992.

DENEKE, S.M.; FANBURG, B.L. Regulation of cellular glutathione. **American Journal of Physiology**, v. 257, p. 163-173, 1989.

De OLIVEIRA SANTOS, E. Mercury in the Negro river, Brazilian Amazon - preliminary study of exposure indicators in fish and human populations. **Caderno de Saúde Pública**, v. 13, n. 1, p. 225-236. 2005.

DIETRICH, G.J.; DIETRICH, M.; KOWALSKIA, R.K.; DOBOSZ, S.; KAROL, H.; DEMIANOWICZ, W.; GLOGOWSKI, J. Exposure of rainbow trout milt to mercury and cadmium alters sperm motility parameters and reproductive success. **Aquatic Toxicology**, v. 97, p. 277–284. 2010.

DOLBEC, J., MERGLER, D., SOUSA PASSOS, C.J., SOUSA DE MORAIS, S., LEBEL, J. Methylmercury exposure affects motor performance of a riverine population of the Tapajo´s river, Brazilian Amazon. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 73, p. 195–203. 2000.

DOREA, J.G.; MOREIRA, M.B.; EAST G.; BARBOSA, A.C. Selenium and mercury concentrations in some fish species of the Madeira river, Amazon Basin, Brazil. **Biological Trace Element Research**, v. 65, p. 211–220. 1998.

EKINO, S.; SUSAKI, M.; NINOMIYA, T.; IMAMURA, K.; KITAMURA, T. Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 262, n.1-2, p. 131-144. 2007.

EL-DEMERDASH, F. M. Effects of selenium and mercury on the enzymatic activities and lipid peroxidation in brain, liver and blood of rats. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 36, p. 489-499, 2001.

ESPINOLA, E.B.; DIAS, R.F.; MATTEI, R.; CARLINI, E.A. Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, n. 3, p. 223-229. 1997.

FADINI, P.S., JARDIM, W.F. Is the Negro River Basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury? **ScienceTotal Environment**, v. 275, p. 71–82. 2001.

FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Nutrition**, v. 18, p. 872. 2002.

FONSECA, C. A., LEAL, J., COSTA, S. S., LEITÃO, A. C. Genotoxic and mutagenic effects of guarana (*Paullinia cupana*) in prokaryotic organisms. **Mutation Research**, v. 321, n. 3, p. 165-73. 1994.

FOSSATO DA SILVA, D.A.; TEIXEIRA, C.T.; SCARANO, W.R.; FAVARETO, A.P.; FERNANDEZ, C.D.; GROTTTO, D.; BARBOSA, F.JR.; KEMPINAS, W.G. Effects of methylmercury on male reproductive functions in Wistar rats. **Reproductive Toxicology**, v. 31, n. 4, p. 431-439. 2011.

FOUNI, S.A.V.; CAMARGO, M.C.R.; VITORINO, S.H.P.; MENEGÁRIO, T.F.; TOLEDO, M.C.F. Contribuição do guaraná em pó (*Paullinia cupana*) como fonte de cafeína na dieta/ Contribution of guaraná powder (*Paullinia cupana*) as a source of caffeine in the diet. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 1, p.63-68. 2007.

FUKUMASU, H., AVANZO, J. L., HEIDOR, R., SILVA, T. C., ATROCH, A., MORENO F. S., DAGLI, M. L. Protective effects of guarana (*Paullinia cupana*

Mart. var. Sorbilis) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 6, p. 862-7. 2006a.

FUKUMASU, H., AVANZO, J. L., NAGAMINE, M. K., BARBUTO, J. A., RAO, K. V., DAGLI, M. L. *Paullinia cupana* Mart var. sorbilis, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 4, p. 305-310. 2008.

FUKUMASU, H., LATORRE, A. O. & Z Aidan-DAGLI, M. L. *Paullinia cupana* Mart. var. sorbilis, guarana, increases survival of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) bearing mice by decreasing cyclin-D1 expression and inducing a G0/G1 cell cycle arrest in EAC cells. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 1, p. 11-6. 2011.

FUKUMASU. H., DA SILVA, T. C., AVANZO, J. L., DE LIMA, C. E., MACKOWIAK, I. I., ATROCH, A., DE SOUZA SPINOSA, H., MORENO, F. S., DAGLI, M. L. Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart. var. sorbilis, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. **Cancer Letters**, Estados Unidos, v. 233, n. 1, p. 158-164. 2006b.

GARCEZ, M. E.; BRANCO, C. D.; LARA, L. V.; PASQUALOTTO, F. F.; SALVADOR, M. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. **Fertil Steril**, v. 94, n. 6, p. 2118-2121. 2010.

GRIVEAU, J.F; LE LANNOU, D. Influence of oxygen tension on reactive oxygen species production and human sperm function. **International Journal Andrology**, v. 20, n. 4, p. 195-200. 1997.

GROTTO, D., BARCELOS, G.R., VALENTINI, J., ANTUNES, L.M., ANGELI, J.P., GARCIA, S.C., BARBOSA JR., F. Low levels of methylmercury induce DNA damage in rats: protective effects of selenium. **Archives of Toxicology**, v. 83, p. 249–254. 2009.

GROTTO, D., VALENTINI, J., FILLION, M., PASSOS, C.J., GARCIA, S.C., MERGLER, D., BARBOSA JR., F. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 806–811. 2010.

HALLER, C. A., JACOB, P., BENOWITZ, N. L. Short-term metabolic and hemodynamic effects of ephedra and guarana combinations. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 77, n. 6, p. 560-71. 2005.

HASKELL, C. F., KENNEDY, D. O., WESNES, K. A., MILNE, A. L., SCHOLEY, A. B. A double-blind, placebo-controlled, multi-dose evaluation of the acute behavioural effects of guaraná in humans. **Psychopharmacology**, v. 21, n. 1, p. 65-70. 2007.

HOFFMAN, D.J.; HEINZ, G.H. Effects of mercury and selenium on glutathione metabolism and oxidative stress in Mallard ducks. **Environmental Toxicology & Chemistry**, v. 17, p. 161-166. 1998.

HOLMES, P.; JAMES, K.A.; LEVY, L.S. Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health? **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 2, p. 171-82. 2009.

HUANG, Y.L.; CHENG, S.L.; LIN, T.H. Lipid peroxidation in rats administrated with mercury chloride. **Biological Trace Element Research**, v. 52, p. 193-206. 1996.

HUGHES, M.N.; POOLE, R.K. **Metals and Micro-organism**, Chapman and Hall, London p. 280-285. 1989.

KREWER, C.C.; RIBEIRO, E.E.; RIBEIRO, E.A.; MORESCO, R.N.; ROCHA, M.I.U.M.; MONTAGNER, G.F.S.; MACHADO, M.M.; VIEGAS, K.; BRITO, E.; CRUZ, I.B. Habitual Intake of Guaraná and Metabolic Morbidities: An Epidemiological Study of an Elderly Amazonian Population. **Phytother Res.** doi: 10.1002/ptr.3437. 2011.

JIN, J.; JIN, N.; ZHENG, H.; RO, S.; TAFOLLA, D.; SANDERS, K.M.; YAN, W. CatSper3 and CatSper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 37-44. 2007.

JIPPO, T., KOBAYASHI, Y., SATO, H., HATTORI, A., TAKEUCHI, H., SUGIMOTO, K., SHIGEKAWA, M. Inhibitory effects of guarana seed extract on passive cutaneous anaphylaxis and mast cell degranulation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 273, n. 9, p. 2110-2. 2009.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Biogeochemistry of trace elements**. PWN, Warsaw, 364pp, 1993.

KENNEDY, D.O.; HASKELL, C.F.; ROBERTSON, B.; REAY, J.; BREWSTER-MAUND, C.; LUEDEMANN, J.; MAGGINI, S.; RUF, M.; ZANGARA, A.; SCHOLEY, A.B. Improved cognitive performance and mental fatigue following

a multi-vitamin and mineral supplement with added guaraná (*Paullinia cupana*). ***Appetite***, v. 50, n. 2-3, p.506-513. 2007.

KENNEDY, D.O.; HASKELL, C.F.; WESNES, K.A.; SCHOLEY, A.B. Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with Panax ginseng. ***Pharmacology Biochemistry and Behavior***, v. 79, n. 3, p. 401-11. 2004.

KODAMA, H.; KURIBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. ***Journal of Andrology***, v. 17, n. 2, p. 151-7. 1996.

LACERDA, L.D.; RIBEIRO, M.G.; CORDEIRO, R.C.; SIFEDDINE, A.; TURCQ, B. Atmospheric mercury deposition over Brazil during the past 30,000 years. ***Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science***, v. 51, p. 363-371. 1999.

LARINI, L.; SALGADO, P.E.T.; LEPERA, J.S. Metais.In: LARINI, L.: ***Toxicologia***, Editora Manole LTDA, 1ª edição brasileira, São Paulo, 1997.

LEITE, R. P., WADA, R. S., MONTEIRO, J. C., PREDES, F. S., DOLDER, H. Protective Effect of Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) Pre-treatment on Cadmium-Induced Damages in Adult Wistar Testis. ***Biological Trace Element Research***, v. 141, n. 1-3, p. 262-274. 2011.

LENZI, A.; LOMBARDO, F.; GANDINI, L.; ALFANO, P.; DONDERO, F. Computer assisted sperm motility analysis at the moment of induced pregnancy during gonadotropin treatment for hypogonadotropic hypogonadism. ***Journal of Endocrinological Investigation***, v.16, n. 9, p. 683-686. 1993.

LIU, P.; HE, K.; LI, Y.; WU, Q.; YANG, P.; WANG, D. Exposure to mercury causes formation of male-specific structural deficits by inducing oxidative damage in nematodes. ***Ecotoxicology and Environmental Safety***. Epub ahead of print. 2011.

LEÓN-CARMONA, J.R; GALANO, A. Is Caffeine a Good Scavenger of Oxygenated Free Radicals? ***Journals American Chemical Society***, v. 115, p. 4538–4546. 2011.

LUND, B.O., MILLER, M.D., WOODS, J.S. Mercury-induced H₂O₂ production and lipid peroxidation in vitro in rat kidney mitochondria. ***Biochemical Pharmacology***, v. 42, p 181-187, 1991.

LUND, B.O., MILLER, M.D., WOODS, J.S. Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v. 45, p. 2017-2024, 1993.

MASCARENHAS, A.F., Mercury concentration assessment in bottom sediments and suspended solid from the Acre river, in the state of Acre, Brazil. **Acta Amazonia**, v. 34, n.1, p. 61-68. 2004.

MARTINS, R. DE P., BRAGA, H. DE C., DA SILVA, A.P., DALMARCO, J.B., DE BEM, A.F., DOS SANTOS, A.R., DAFRE, A.L., PIZZOLATTI, M.G., LATINI, A., ASCHNER, M., FARINA, M. Synergistic neurotoxicity induced by methylmercury and quercetin in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 645-649. 2009.

MATTEI, R.; DIAS, R. F.; ESPÍNOLA, E. B.; CARLINI, E. A.; BARROS S. B. Guarana (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidants activity in vitro. **Ethnopharmacology**, v. 60, n. 2, p. 111-116. 1998.

MAURICE-BOURGOIN, L.; QUIROGA, I.; CHINCHEROS, J.; COURAU, P. Mercury distribution in waters and fishes of the upper Madeira rivers and mercury exposure in riparian Amazonian populations. **ScienceTotal Environment**, v. 260, p. 73-86. 2000.

MCCORD, J.M. Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. **Clinical Biochemistry**, v. 26, p. 351-357, 1993.

MICARONI, R.C.C.M.; BUENO, M.I.M.S.; JARDIM, W.F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 487-495. 2000.

MILLER, A.L. Dimercaptosuccinic acid (DMSA), a non-toxic, water-soluble treatment for heavy metal toxicity. **Alternative Medicine Review**, v. 3, p. 199-207. 1998.

MIRANDA, M. R., COELHO-SOUZA, S. A. GUIMARÃES, J. R. D., CORREIA, R. R. S., OLIVEIRA, D. Mercúrio em sistemas aquáticos: fatores ambientais que afetam a metilação. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 2, p. 240-251. 2007.

MIURA, T., TATARA, M., NAKAMURA, K., SUZUKI, I. Effect of guarana on exercise in normal and epinephrine-induced glycogenolytic mice. **Biological &**

Pharmaceutical Bulletin, v. 21, n. 6, p. 646-8. 1998.

MOHAMED, M.K.; EVANS, T.C.; MOTTET, N.K.; BURBACHER, T. M. Effects of Methyl Mercury on Sperm Oxygen Consumption. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, v. 58, n. 3, p. 219-224. 1987.

MOREL, F.M.M.; KRAEPIEL, A.M.L.; AMYOT, M. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 543-566. 1998.

MORELLI, V., ZOOROB, R. J. Alternative therapies: Part I. Depression, diabetes, obesity. **American Family Physician**, v. 62, n. 5, p. 1051-60. 2000.

MOSZCZYN´SKI, P.; RUTOWSKI, J.; S´OWIN´SKI, S.; BEM, S. Immunological effects of occupational exposure to metallic mercury in the population of T-cells and NK-cells. **Analyst**, v. 123, p. 99–103. 1998.

MUSKIET, F.A.; FOKKEMA, M.R.; SCHAAFSMA, A.; BOERSMA, E.R.; CRAWFORD, M.A. Isdocosahexaenoic acid (DHA) essential? Lessons from DHA status regulation, our ancient diet, epidemiology and randomized controlled trials. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 183-186. 2004.

NAFISI, S.; MANOUCHEHRI, F.; TAJMIR-RIahi, H.-A.; VARAVIPOUR, M. Structural features of DNA interaction with caffeine and theophylline. **Journal of Molecular Structure**, v. 875, p. 392-399. 2008.

NASCIMENTO, E.S.; CHASIN, A.A.M. Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos. **Cadernos de referência Ambiental**, Salvador – BA. 2001.

NYACHIEO, A.; SPIESSENS, C.; CHAI, D.C.; KIULIA, N.M.; MWENDA, J.M.; D'HOOOGHE, T.M. Separate and combined effects of caffeine and dbcAMP on olive baboon (*Papio anubis*) sperm. **Journal of Medical Primatology**, v. 39, p. 137–142. 2010.

OPALA, T., RZYMSKI, P., PISCHEL, I., WILCZAK, M., WOZNIAK, J. Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extract-based weight loss formula on body weight, body composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects: a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial. **European Journal of Medical Research**, v. 11, n. 8, p. 343-50. 2006.

PAPAS, A.M. Determination of antioxidant status in humans. **Lipids**, v. 31, p. 77-82, 1996.

PASSOS, C. J. S., MERGLER, D. Human mercury exposure and adverse health effects in the amazon. *Cad. Saúde Pública*, v. 24, n. 4, p. 503-520. 2008.

PAVANATO, A.; TUÑÓN, M.J.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; MARRONI, C.A.; LLESUY, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; MARRONI, N. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. **Dig Dis Sci**, v. 48, n. 4, p. 824-829. 2003.

PELOZO, M.I.G.; CARDOSO, M.L.C.; MELLO, G.C.P. Spectrophotometric determination of tannins and caffeine in preparations from *Paullinia cupana* var. *sorbilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n 3, p. 447-451. 2008.

PEROTTONI, J., RODRIGUES, O. E. D., PAIXÃO, M. W., ZENI, G, LOBATO, L. P., BRAGA, A. L., ROCHA, J. B. T., EMANUELLI, T. Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 17-28, 2004.

PINHEIRO, M. C. N., NAKANISHI, J., OIKAWA, T., GUIMARÃES, G., QUARESMA, M., CARDOSO, B., AMORAS, W. W., HARADA, M., MAGNO, C., VIEIRA, J. L. F., XAVIER, M. B., BACELAR, D. R. Exposição humana ao metilmercúrio em comunidades ribeirinhas da Região do Tapajós, Pará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 265-269. 2000.

PONTIERI, V.; NETO, A.S; CAMARGO, A.F.F.; KOIKE, M.K.; VELASCO, I.T. The herbal drug Catuama reverts and prevents ventricular fibrillation in the isolated rabbit heart. **Journal of Electrocardiology**, v. 40, n. 6, p. 534-538. 2007.

QUIG, D. Cysteine metabolism and metal toxicity. **Alternative Medicine Review**, v. 3, p. 262-270, 1998.

RAO, M. V.; SHARMA, P.S.N. Protective effect of vitamin E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice. **Reproductive Toxicology**, v. 15, p. 705–712. 2001.

RAY, S.D.; PATEL, N.; SHAH, N.; NAGORI, A.; NAQVI, A.; STOHS, S.J. Pre-exposure to a novel nutritional mixture containing a series of phytochemicals prevents acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell deaths by enhancing BCL-XL expression and minimizing oxidative stress in the liver. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 293, n. 1-2, p. 119-136. 2006.

ROBERTS, A.T.; De JONGE-LEVITAN, L.; PARKER, C.C.; GREENWAY, F. The effect of an herbal supplement containing black tea and caffeine on metabolic parameters in humans. **Alternative Medicine Review**, v. 10, n. 4, p. 321-325. 2005.

SALE, C., HARRIS, R. C., DELVES, S., CORBETT, J. Metabolic and physiological effects of ingesting extracts of bitter orange, green tea and guarana at rest and during treadmill walking in overweight males. **International Journal of Obesity**, v. 30, n. 5, p. 764-73. 2006.

SALVADORI, M.C.; RIESER, E.M.; RIBEIRO NETO, L.M.; NASCIMENTO, E.S. Determination of xanthines by high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography in horse urine after ingestion of Guaraná powder. **Analyst**, v. 119, n. 12, p. 2701-2703. 1994.

SANTA MARIA, A.; LOPEZ, A.; DIAZ, M.M.; MUÑOZ-MINGARRO, D.; POZUELO, J.M. Evaluation of the toxicity of guarana with in vitro bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 39, n. 3, p. 164-7. 1998.

SHARMA, M.K., KUMAR, M., KUMAR, A. Protection against mercury-induced renal damage in Swiss albino mice by *Ocimum sanctum*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 161-167, 2005.

SENER, G.; SEHIRLI, A.O.; AYANOGLU-DULGER, G. Melatonin protects against mercury(II)-induced oxidative tissue damage in rats. **Pharmacology and Toxicology**, v. 93, p. 290–296. 2003.

SENER, G.; SEHIRLI, O.; TOZAN, A.; VELIOGLU-OVUNC, A.; GEDIK, N.; OMURTAG, G.Z. *Ginkgo biloba* extract protects against mercury(II)-induced oxidative tissue damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 543–550. 2007.

SILVA, D.A.F.; TEIXEIRA, C.T.; SCARANO, W.R.; FAVARETO, A.P.A.; FERNADEZ, C.D.B.; GOTTO, D.; BRBOSA, F.; KEMPINAS, W.G. Effects of methylmercury on male reproductive functions in Wistar rats.

Reproductive Toxicology, v. 31, p. 431-439. 2011.

SMITH, N.; ATROCH, A.L. Guaraná's Journey from Regional Tonic to Aphrodisiac and Global Energy Drink. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 3, p. 279-282. 2010.

SOMBRA, L.L.; Gómez, M.R; Olsina, R.; MARTÍNEZ, L.D.; SILVA, M.F. Comparative study between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography in 'guarana' based phytopharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 36, n. 5, p. 989-994. 2005.

SPINACI, M.; VOLPE, S.; De AMBROGI, M.; TAMANINI, C.; GALEATI G. Effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on in vitro maturation and fertilization of porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 69, p. 877–885. 2008.

SUBBIAH, M.T., YUNKER, R. Studies on the nature of anti-platelet aggregatory factors in the seeds of the Amazonian Herb Guarana (*Paullinia cupana*). **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 78, n. 2, p. 96-101. 2008.

SULEIMAN, S. A.; ALI, M. E.; ZAKI, Z. M.; EL-MALIK, E. M.; NASR, M. A. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. **Journal of Andrology**, v. 17, n. 5, p. 530-7. 1996.

TAN, S.W.; MEILLER, J.C.; MAHAFFEY, K.R. The endocrine effects of mercury in humans and wildlife. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 39, p. 228–269. 2009.

TOSIC, J.; WALTON, A. Formation of hydrogen peroxide by spermatozoa and its inhibitory effect on respiration. **Nature**, v. 158, p. 485. 1946.

TOXINET. Mercury Compounds. Disponível em <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@na+MERCURY+COMPOUNDS>>. Acesso em 17 de maio de 2011.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1161–1208. 2005.

VALLORANI, C.; SPINACI, M.; BUCCI, D.; TAMANINI, C.; GALEATI, G. Effects of antioxidants on boar spermatozoa during sorting and storage.

Animal Reproduction Science, v. 122, p. 58–65. 2010.

VEIGA, M. M; SILVA, A. R. B.; HINTON, J. J. **Capítulo 11**: O Garimpo de ouro na Amazônia: aspectos tecnológicos, sociais e ambientais, p. 267 – 295. In: TRINDADE, R. B. E; FILHO, O. B. Extração de ouro – Princípios, tecnologia e meio ambiente. 2002.

VERNET, P.; AITKEN, R.J.; DREVET, J.R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 216, p. 31–39. 2004.

VIRTANEN, K.J., RISSANEN, T.H., VOUTILAINEN, S., TUOMAINEN, T.P. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 75–85. 2007.

WASSERMAN, J. C., HACON, S. S., WASSERMAN, M. A. O ciclo do mercurio no ambiente amazônico. **Mundo & vida**, n. 2, p. 46-53. 2001.

WATHES, D.C.; ABAYASEKARA, D.R.E.; AITKEN J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 190–201. 2007.

WILLIAMS, A.C.; FORD, W.L. Relationship between ROS production and lipidperoxidation in human sperm suspensions and their association with sperm function. **Fertil Steril**, v. 83, p. 929–937. 2005.

WHO, LABORATORY MANUAL. **For the examination of semen and sperm – cervical mucus interaction**. 4 ed. Cambridge: University Press. 1990

YAMAGUTI-SASAKI, E, ITO, L. A, CANTELI, V. C, USHIROBIRA, T. M, UEDA-NAKAMURA, T, DIAS FILHO, B. P, NAKAMURA, C. V, DE MELLO, J. C. Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1950-63. 2007.

YANAGIMACH, R. Mammalian Sperm Acrosome Reaction: Where Does It Begin Before Fertilization? **Biology of Reproduction**, v. 85, p. 4–5. 2011.

ZALUPS, R.K. Molecular interactions with mercury in the kidney. **Pharmacology Review**, v. 52, p. 113-143, 2000.