

BIOATIVOS MARINHOS E SEUS POSSÍVEIS EFEITOS PROTETORES NO SISTEMA REPRODUTOR DE RATOS WISTAR

Maria Júlia Rabelo Cavalcante Girão¹, Camila Ewinny Costa Dunga², Lícia Gabrielle Gomes de Oliveira², Ana Beatriz Silva Angelo², Aline Gabrielle Gomes da Silva^{1,2}, Cibele dos Santos Borges^{1,2}

¹Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Brasil (m.juliagirao7@gmail.com)

²Universidade Estadual do Rio Grande do Norte, Mossoró, Brasil

Resumo: Este estudo avaliou os efeitos do pó de conchas marinhas de *Anomalocardia brasiliana* sobre o sistema reprodutor de ratos Wistar. Vinte e dois animais receberam diferentes doses do bioativo por 30 dias e foram submetidos a análises morfológicas e espermáticas. O tratamento não causou alterações reprodutivas significativas, mas apresentou uma possível melhora na motilidade e na produção de espermatozoides, sugerindo potenciais benefícios à saúde reprodutiva masculina.

Palavras-chave: Carbonato de cálcio; Estresse oxidativo; Qualidade espermática; Fertilidade masculina; Toxicologia reprodutiva.

INTRODUÇÃO

A infertilidade é considerada um problema de saúde pública (Silva, Santana e Santos, 2021), estimando-se que cerca de 15% dos casais em idade reprodutiva sejam afetados (Moreira *et al.*, 2006; Mascarenhas *et al.*, 2012). O aumento da poluição, a exposição a xenobióticos e os hábitos de vida pouco saudáveis têm sido amplamente associados ao crescimento dos casos de infertilidade, principalmente nos homens (Santos *et al.*, 2013; Bitencourt, *et al.*, 2023). Essas alterações no sistema reprodutor têm causas multifatoriais, como hábitos inadequados, toxinas ambientais, aspectos genéticos, hormonais e comportamentais, que afetam diretamente a produção, qualidade, funcionalidade, motilidade e morfologia dos espermatozoides (Sharma *et al.*, 2021). Isso ocorre devido ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio, que culmina no estresse oxidativo. Essa condição é atraída por fosfolípidios, o principal componente das membranas do espermatozoide, sendo vulneráveis a essas substâncias que causam danos e compromete sua integridade, prejudicando a sua atividade biológica e refletindo no sucesso reprodutivo (Agarwal, *et al.*, 2019).

Diante disso, há crescente busca por alternativas naturais que reduzam o estresse oxidativo, em que se destacam os bioativos marinhos (Cote *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2020). O ecossistema marinho é considerado uma fonte praticamente ilimitada desses compostos, sendo o filo Mollusca o segundo maior grupo de invertebrados e em sua maioria marinhos (Kim, 2013; Lin, 2013; Wang *et al.*, 2020; Morales, Avellán e León, 2023; Rodrigues, 2024). O Brasil é o segundo maior produtor de moluscos bivalves da América Latina (IBGE, 2023) e gera grandes volumes de

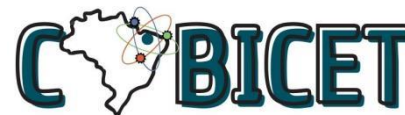
resíduos de conchas marinhas sem regulamentação específica para seu descarte, o que representa uma oportunidade para uso mais sustentável desse material (Alves *et al.*, 2021).

O pó das conchas marinhas é composto majoritariamente por carbonato de cálcio (CaCO_3) (Silva, 2010; Vieira; Coelho; Jesus, 2019; McCorquodale-Bauer; Cicek, 2022; Cheng *et al.*, 2023), com outros minerais em menor proporção, como zinco, selênio, manganês, magnésio, ferro e sulfatos (Mohammed, 2022; Silva, 2010), além de frações de matéria orgânica. Esses elementos são capazes de desencadear respostas celulares que combatem o estresse oxidativo e protegem as células do sistema reprodutor (Martin, *et al.*, 2019; Noh, *et al.*, 2020). O íon cálcio, em especial, estimula proteínas intracelulares e favorece a motilidade espermática (Martin, *et al.*, 2019; Noh, *et al.*, 2020). Pela sua composição biocompatível e atóxica, aliada à acessibilidade do resíduo, o pó de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) se apresenta como uma alternativa promissora em estudos de toxicologia da reprodução.

Perante a importância crescente de identificar novos agentes protetores contra os danos oxidativos no sistema reprodutor, objetivou-se através desse estudo avaliar os efeitos protetores e/ou reparadores do pó das conchas marinhas sobre o sistema reprodutor de ratos Wistar machos, com ênfase nas análises de peso dos órgãos, histomorfometria e qualidade espermática.

MATERIAL E MÉTODOS

As conchas marinhas de *Anomalocardia brasiliana* foram adquiridas de marisqueiras em Porto do Mangue/RN, higienizadas com hipoclorito de sódio,



secas em estufa a 150°C e trituradas em moinho centrífugo, obtendo-se pó de granulometria fina, posteriormente tamisado em peneiras de malha de aço. A composição do pó foi caracterizada por espectrometria de fluorescência de raios-X por dispersão de energia (EDX), utilizando equipamento Shimadzu EDX-7000, com amostras de dimensões inferiores a 0,75 µm analisadas sob condições de vácuo.

Foram utilizados 22 ratos machos Wistar com 90 dias de idade, provenientes do Biotério da UERN e aclimatados na UFERSA, mantidos em ambiente climatizado com fotoperíodo de 12h claro/escuro, água controlada (500 ml/dia) e alimentação ad libitum. O experimento foi aprovado pelo CEUA/UFERSA (parecer 02/2024). Os animais foram randomizados em quatro grupos experimentais (n=5/grupo): controle (CMC sem bioativo), T1 (100 mg/kg), T2 (300 mg/kg) e T3 (500 mg/kg), com administração intragástrica via gavagem por 30 dias, com monitoramento de peso corporal, glicemia e consumo de água.

Ao término do experimento, os animais foram eutanasiados por sobredosagem de xilazina (0,5 ml a 2%) e ketamina (0,5 ml a 10%) por via intraperitoneal. Os órgãos internos foram dissecados e pesados. O testículo e epidídimo esquerdos foram fixados em solução de Bouin para análises histomorfométricas, enquanto os do lado direito foram destinados à avaliação da qualidade espermática. O processamento histológico seguiu desidratação em etanol em concentrações crescentes, diafanização com xilol, inclusão em parafina, microtomia e coloração por Hematoxilina e Eosina (HE).

A morfometria testicular foi realizada em dez secções de túbulos seminíferos por animal no estágio IX da espermatogênese, em microscópio óptico com câmera digital acoplada (aumento de 200×), calculando-se respectivamente: área tubular; área luminal e área epitelial. Para a cariometria das células de Leydig, foram selecionados aleatoriamente 50 núcleos circulares ou elípticos por animal, utilizando o software Leica Q-win versão 3, obtendo-se diâmetro médio, área e volume.

A dinâmica da espermatogênese foi avaliada pela frequência relativa dos estágios I–VI, VII–VIII, IX–XIII e XIV em 100 secções transversais de túbulos seminíferos por animal.

Os espermatozoides foram coletados da cauda epididimária e transferidos para 1 mL de HTF (Human Tubal Fluid) em incubadora de CO₂ a 34°C por 3 minutos. A motilidade foi avaliada em câmara de Neubauer a 34°C, sob microscópio de contraste de fase (400×), classificando 100 espermatozoides em Tipo A (movimento progressivo), Tipo B (sem movimento progressivo) e Tipo C (imóvel). A morfologia foi avaliada em esfregaços de 200

espermatozoides por animal, classificando anormalidades de cabeça (sem curvatura, isolada ou duplicada) e de cauda (enrolada, quebrada, dobrada ou isolada).

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, seguidos de ANOVA com pós-teste de Tukey para dados paramétricos, ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para dados não paramétricos, considerando p<0,05 como nível de significância. As análises foram realizadas no GraphPad Prism v. 8.

Para obtenção das amostras de espermatozoides foram utilizadas a cauda epididimária dos animais expostos. Com a cauda do epidídimo isolada, foi realizada a coleta dos espermatozoides, como descrito por Borges et al., (2016b). Sob estereomicroscópio, os espermatozoides foram liberados a partir da cauda proximal do epidídimo e transferidos em 1 mL de HTF (Human Tubal Fluid) para incubadora CO₂ a 34° C, por 3 minutos. Além desta diluição, uma alíquota foi retirada e diluída em 10 vezes em solução formol-salina 10%, onde os espermatozoides foram contados em câmara de Neubauer e o valor anotado.

A motilidade espermática foi avaliada utilizando uma alíquota de 10 µl da suspensão de espermatozoides do meio HTF e imediatamente transferida para uma câmara de Neubauer e mantida a 34 ° C. Usando um microscópio de contraste de fase (ampliação de 400x), foram contados 100 espermatozoides e classificados como Tipo A (móvel com movimento progressivo), Tipo B (móvel sem movimento progressivo) e Tipo C (imóvel).

Para a avaliação da morfologia espermática, os espermatozoides obtidos da mesma solução, foram alíquotados 100µl da solução e transferidos para 900 µl de solução formol-salina 10%. Posteriormente, foi realizado esfregaços em lâminas histológicas, secar ao ar livre por 30 minutos e então observadas em microscópio de contraste de fase (aumento de 400x). Foram analisados 200 espermatozoides por animal e as anormalidades morfológicas encontradas foram classificadas em duas categorias: a) anormalidades de cabeça (sem curvatura característica, isolada ou duplicada); b) anormalidade de cauda (enrolada, quebrada, dobrada e isolada). Anormalidades mais frequentes foram fotodocumentadas em microscópio de contraste de fase (aumento de 400x) acoplado a sistema de câmera (Filler, 1993; Seed et al., 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O peso dos órgãos é um indicador essencial nos estudos de toxicologia da reprodução, pois está diretamente relacionado à morfologia e funcionalidade desses órgãos e reflete possíveis alterações que podem ocorrer em resposta ao tratamento. Foi possível notar que os órgãos

reprodutivos preservaram sua relação fisiológica, sugerindo que o tratamento com carbonato de cálcio não impactou significativamente os processos metabólicos ou fisiológicos essenciais à sobrevivência e função sistêmica.

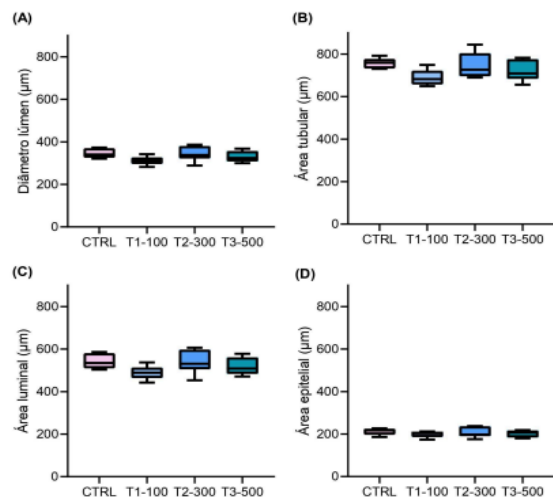


Figura 1: Parâmetros morfométricos dos testículos de ratos tratados com o bioativo, em que A) destaca o diâmetro do lúmen; B) a área do túbulo seminífero; C) a área luminal; e D) a área do epitélio do túbulo seminífero. Valores expressos em média + DP (teste paramétrico ANOVA seguido de teste Tukey P > 0,05). **Fonte:** Autor(a), 2025.

As análises demonstradas na Figura 2 não evidenciaram alterações significativas entre os grupos expostos ao bioativo, mas nota-se uma tendência de aumento no grupo T2-300 (imagem A, B, C e D), uma resposta a dose adequada que poderia maximizar a eficiência metabólica das células de Sertoli, favorecendo a nutrição e o suporte das células germinativas.

Esses resultados sugerem que, nas condições experimentais avaliadas, o carbonato de cálcio não induziu toxicidade generalizada no tecido testicular, tampouco promoveu alterações morfoestruturais ou metabólicas que resultaram em mudanças no diâmetro, mantendo a integridade do parênquima testicular, incluindo o lúmen, a área tubular e a área epitelial.

Os achados demonstrados na Figura 2 sugerem que o bioativo não interferiu na morfologia das células de Leydig, um aspecto crucial, uma vez que alterações na estrutura celular podem impactar a produção de testosterona e a regulação da espermatogênese. (Alberts et al., 2017).

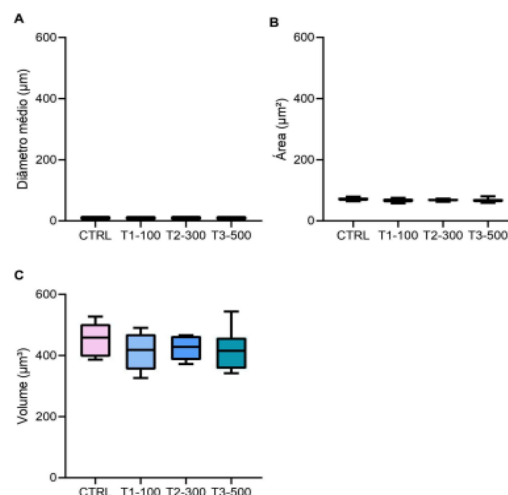


Figura 2: Parâmetros morfométricos das células de Leydig de ratos tratados com o bioativo, A) expressa o diâmetro em μm, e a partir dele é possível obter a; B) área e C) o volume das Leydig. Valores expressos em média + DP (teste paramétrico ANOVA seguido de teste Tukey P > 0,05). **Fonte:** Autor(a), 2025.

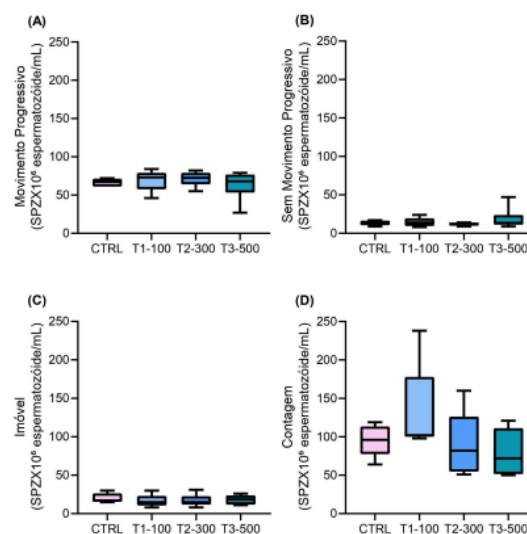
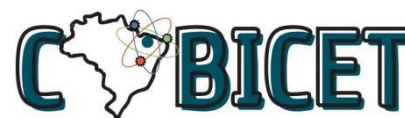


Figura 3: Motilidade espermática de ratos Wistar expostos ao bioativo. A,C Dados expressos em média + DP (teste paramétrico ANOVA seguido de teste Tukey). B,D Dados expressos em média + DP (Teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido de Dunn), onde P > 0.05. **Fonte:** Autora, 2025.

A exposição do presente bioativo pode ser observada na Figura 3 — A, o grupo T1 e T2, que foi maior que o do controle e do T3, que mesmo não apresentando significância estatística, reflete uma tendência a uma resposta biológica, onde possivelmente poderia haver uma resposta expressiva em um período experimental maior.

Na figura 3 — C, referente ao estado imóvel da célula, o número de espermatozoides imóveis é inferior no



T1, enquanto no CTRL, T3 e T5 estão acima, demonstrando que pequenas variações na concentração do fármaco podem ativar vias de sinalização celular que melhoram a função espermática, reforçando a importância da biodisponibilidade do cálcio para o sistema reprodutor masculino.

Tabela 1: morfologia da cabeça e da cauda dos espermatozoides de ratos tratados com diferentes doses do bioativo.

PARÂMETROS (%)	TRATAMENTOS/GRUPOS			
	CTRL	T1 - 100	T2 - 300	T3 - 500
¹ Espermatozoides normais	95,00 ± 4,281	90,00 ± 3,271	91,00 ± 4,782	91,50 ± 2,683
² Cabeça Banana	0,000 ± 0,5396	0,000 ± 0,4472	0,000 ± 0,4082	0,000 ± 0,8165
² Cabeça enrolada	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,4082	0,000 ± 0,4082
⁴ Cabeça isolada	2,000 ± 1,651	1,000 ± 4,658	4,500 ± 3,627	4,000 ± 2,503
⁴ Cauda quebrada	1,000 ± 3,038	3,000 ± 2,121	2,500 ± 3,705	0,5000 ± 1,966
⁴ Cauda enrolada	0,000 ± 0,4472	1,000 ± 0,8367	0,000 ± 0,8165	0,5000 ± 1,265
⁴ Cauda isolada	0,9700 ± 0,5424	1,000 ± 1,000	0,000 ± 0,4082	0,5000 ± 0,9832
¹ Extra	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000

Os dados de morfologia espermática (Tabela 1) não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, indicando ausência de malformações de cabeça ou cauda induzidas pelo bioativo. Embora o cálcio desempenhe papel na integridade morfológica dos espermatozoides, sendo que sua deficiência ou desregulação pode levar a deformidades como cabeça arredondada e cauda encurvada, os resultados sugerem que as doses testadas não comprometeram a morfologia espermática.

Referindo-se à contagem espermática ($\times 10^6$), obteve-se respectivamente nos grupos controle, T1, T2 e T3, $61,50 \pm 11,68$ x $64,00 \pm 15,76$ x $62,75 \pm 10,75$ x $68,13 \pm 12,63$. Esses resultados demonstram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$), porém os grupos tratados apresentaram tendência de aumento na contagem de espermátides no testículo e maior contagem espermática no epidídimo, sugerindo um efeito biológico positivo do bioativo sobre a produção e o reservatório de espermatozoides, possivelmente relacionado ao papel do cálcio na ativação de vias intracelulares que favorecem a espermatogênese e a diferenciação das células germinativas.

CONCLUSÃO

Os achados deste estudo demonstram que o pó de conchas marinhas de *Anomalocardia brasiliensis*, nas concentrações avaliadas, não ocasionou alterações significativas nos parâmetros ponderais, morfométricos e histológicos dos órgãos reprodutores de ratos Wistar machos, preservando a integridade do parênquima testicular e das células de Leydig. A ausência de mudanças nos pesos relativos e nos

parâmetros morfométricos indica que as variações pontuais observadas não possuem relevância fisiológica ou patológica.

Em relação à qualidade espermática, o bioativo não induziu alterações morfológicas nos espermatozoides e, embora sem significância estatística, as doses de 100 e 300 mg/kg favoreceram a motilidade progressiva, reduziram a proporção de células imóveis e apresentaram tendência de aumento na produção diária de espermatozoides e no tempo de trânsito epididimário, sugerindo condições favoráveis à maturação espermática.

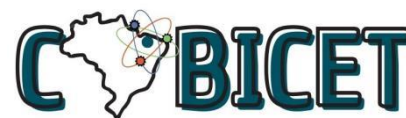
A boa tolerabilidade do bioativo, aliada à resposta biológica positiva observada nos parâmetros reprodutivos, reforça seu potencial como suplemento natural voltado à saúde reprodutiva masculina, especialmente em condições associadas ao estresse oxidativo. Estudos com períodos experimentais mais longos, modelos de infertilidade induzida e análises bioquímicas e hormonais complementares são recomendados para consolidar esses achados.

AGRADECIMENTOS

À todos os meus colegas de equipe e à minha orientadora, meus profundos agradecimentos.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A. et al. Male oxidative stress infertility (MOSI): proposed terminology and clinical practice guidelines for management of idiopathic male infertility. *The world journal of men's health*, v. 37, n. 3, p. 296-312, 2019.
- ALBERTS, B. et al. *Biologia molecular da célula*. Artmed Editora, 2017.
- ALVES, A. E.; CORRÊA, T. H. A.; HOLANDA, J. N. F.. Proposta para o uso de resíduo de concha marinha como fonte alternativa de carbonato de cálcio. 2021.
- BITENCOURT, Victor Rabelo et al. Infertilidade masculina e estilo de vida: problemática em tempos modernos. *RECIMA21-Revista Científica Multidisciplinar-ISSN 2675-6218*, v. 4, n. 9, 2023.
- BORGES, C. S. et al. Alterations in male rats following in utero exposure to betamethasone suggests changes in reproductive programming. *Reprod. Toxicol.* V. 63, 2016B.
- CHENG, M. Overview of structure, function and integrated utilization of marine shell. *Science of The Total Environment*, v. 870, 2023.
- COTE, B. et al. Mechanistic basis for the role of phytochemicals in inflammation-associated chronic diseases. *Molecules*, v. 27, n. 3, p. 781, 2022.



IBGE. Produção de aquicultura por tipo de produto. 2023. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>.

KIM, S.; WIJESEKARA, I. Marine derived nutraceuticals. Marine nutraceuticals: prospects and perspectives, v. 1, 2013.

LI, L. et al. The beneficial effect of oyster peptides and oyster powder on cyclophosphamide-induced reproductive impairment in male rats: A comparative study. Journal of food biochemistry, 2020.

LIN, S. K. Marine Nutraceuticals: Prospects and Perspectives. Marine Drugs, v. 11, n. 4, 2013.

MARTIN, D. H. et al. Antioxidants and Male Fertility: From Molecular Studies to Clinical Evidence. Antioxidants, v. 8, n. 4, 2019.

MASCARENHAS, M. N. et al. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. PLoS medicine, v. 9, n. 12, 2012.

MCCORQUODALE-BAUER, K.; CICEK, N. Zebra mussel shells as an alternative mineral resource for lime production as a phosphorus precipitant. Environmental Technology, v. 43, n. 10, 2022.

MOHAMMED, E. H. The role of oyster shell extract as a stimulant of sperm motility for patients with secondary infertility (asthenospermia) and diabetes (type ii) before and after in vitro preparation for IUI. American Journal of Interdisciplinary Research and Development, v. 11, 2022.

MORALES, S. M. M.; AVELLÁN, M. C. L.; LEÓN, R. P. P. Tendências tecnológicas atualizadas de alguns produtos da indústria pesqueira. Revista Contemporânea, v. 3, n. 07, 2023.

MOREIRA, S. N. T. et al. Estresse e ansiedade em mulheres inférteis. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, v. 28, 2006.

NOH, S. et al. Role of Antioxidant Natural Products in Management of Infertility: A Review of Their Medicinal Potential. Antioxidants, v. 9, n. 10, 2020.

RODRIGUES, G. S. Visão geral sobre os produtos naturais e suas aplicações: uma revisão. Revista CPAQV-Centro de Pesquisas Avançadas em Qualidade de Vida, v. 16, n. 1, 2024.

SANTOS, C. F. et al. Avaliação da fertilidade de camundongos intoxicados com o agrotóxico metamidofós. Anais do Simpósio de Pesquisa e Extensão de Ceres e Vale de São Patrício (SIMPEC), 2013.

SEED, J. et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. Reproductive toxicology, v. 10, n. 3, 1996.

SHARMA, A. et al. Male infertility due to testicular disorders. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v. 106, n. 2, 2021.

SILVA, D. et al. Caracterização físico-química e microestrutural de conchas de moluscos bivalves provenientes de cultivos da região litorânea da ilha de Santa Catarina. Química Nova, v. 33, 2010.

SILVA, D. J.; SANTANA, B. P.; SANTOS, A. L. Infertilidade: um problema de saúde pública. Revista Uningá, v. 58, 2021.

VIEIRA, B.; COELHO, L. H. G.; JESUS, T. A. Sorção de Fosfato em Substratos de Conchas de Mariscos (Venerupis pulestra): Desenvolvimento de Tecnologia Verde e de Baixo Custo para Tratamento Terciário de Efluentes. Revista de Engenharia Ambiental. v. 145, n. 2. 2019.

WANG, E. et al. From seabed to bedside: A review on promising marine anticancer compounds. Biomolecules, v. 10, n. 2, 2020.