

POTENCIAL ZETA DE NANOESTRUTURAS DE LDL SOBRE A MOTILIDADE E INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS

EDENARA ANASTÁCIO¹; MARIA EDUARDA BICCA DODE²; STELA MARI MENEGHELLO GHELLER³; GABRIELA HÄDRICH⁴; CRISTIANA LIMA DORA⁵; ANTONIO SERGIO VARELA JUNIO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – edenara_anastacio@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – dudadode@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – stelagheller@hotmail.com

⁴Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg – gabihadrach@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal do Rio Grande – cristianadora@gmail.com

⁶ Universidade Federal do Rio Grande – varelaejas@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O congelamento seminal permite a preservação dos espermatozoides por período indeterminado, porém o processo expõe as células à crioinjúrias oriundas de choque térmico, rompimento de membranas por cristais de gelo, criocapacitação, estresse oxidativo e osmótico (CIPRIANO, 2013).

O Plasma da gema do ovo (PGO) é um eficiente diluente de criopreservação seminal (CORCINI et al, 2015), sendo a lipoproteína de baixa densidade (LDL) o principal agente crioprotetor (VARELA JUNIOR et al., 2008). A LDL protege os espermatozoides do choque térmico que ocorre durante o processamento (QUINN & COW, 1980). Ainda, forma complexos com proteínas deletérias do plasma seminal e promove o influxo de fosfolípidos e colesterol na membrana plasmática, aumentando criotolerância dos espermatozoides (MOUSSA et al., 2002; PRAPAIWAN et al., 2016).

Na nanotecnologia metodologias empregadas na homogeneização, diminuição, dispersão e emulsificação de partículas (KENTISHA *et al.*, 2008) são capazes de aumentar a interação das nanoestruturas com a matriz na qual estão inseridas (ASSI, 2012). Propriedades físicas, químicas de nanoestruturas como a LDL, influenciam seu comportamento em soluções (RIGANO, 2016). O potencial zeta (PZ) é uma medida de magnitude da atração ou repulsão eletrostática entre as partículas, e as variações dos seus valores afetam seus efeitos *in vivo* (MOHANRAJ et al., 2006).

Este trabalho tem como objetivo caracterizar o PZ de nanoestruturas de LDL presentes na PGO e diluentes derivados de seu nanoprocessamento. Além de verificar a correlação desta propriedade química com a motilidade e integridade de membrana de espermatozoides congelados.

2. METODOLOGIA

O diluente PGO 8% de LDL, foi obtido através de três centrifugações sucessivas (10.000xg por 45min) do meio Tris-glicose, onde os *pellets*, contendo grânulos minerais e subprodutos da gema de ovo deletérios ao espermatozoide, foram desprezados a cada centrifugação (VARELA JUNIOR et al., 2008; CORCINI et al., 2015). O PGO foi submetido por 30 min à ultrassonicação, branda em banho de ultrassom 140A (P-BU) e severa por sonda ultrassônica 50%A (P-SU) e à homogeneização, em dispersor UltraTurrax (14500 rpm / 2 min) seguida de 6 ciclos de homogeneização de alta pressão à 10.000 PSI (P-HP).

Foram obtidas 20 amostras seminais, obtidas pelo método de manipulação digital, de 10 cães adultos. A fração rica dos ejaculados com motilidade espermática igual ou superior a 80 % foram divididas em quatro porções de mesmo volume e diluídas com os diferentes diluentes, acrescidos de 5% de glicerol para obtenção de 100×10^6 células / mL. As amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL, mantidas por 2 horas à 5°C, submetidas por 10 min. a 5 cm do vapor de nitrogênio líquido, e posteriormente submersas e acondicionadas em botijão de armazenamento.

Após o descongelamento lento (37°C por 30 seg.), avaliou-se integridade de membrana espermática, através de citometria de fluxo (Attune Acoustic Focusing Cytometer®). Os parâmetros de motilidade espermática total e progressiva foram analisados pelo sistema automatizado CASA - *computer assisted sperm analysis* (Sperm Vision® 3.5, Minitub, Tiefenbach, Germany).

O PZ das partículas dos diferentes diluidores foram obtidos usando dispersão de luz, através do Zeta Nano Series (Malver Instruments, Worcestershire, UK). As análises foram realizadas em triplicata. As medidas do PZ foram obtidas através da equação de Smoluchowski como valores médios da mobilidade eletroforética.

Os resultados das análises espermáticas foram comparados por análise de variância com comparação de médias pelo teste LSD All-Pairwise, os valores de PZ foram correlacionados pelo método de *Pearson* através do *software* Statistix® (2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de PZ obtidos pela análise dos meios PGO, P-BU, P-SU e P-HP foram $-4,63 \pm 0,20$, $-3,55 \pm 2,34$, $-1,15 \pm 0,41$ e $-4,93 \pm 0,25$, respectivamente. O potencial zeta é uma medida de magnitude da repulsão eletrostática e/ou atração entre as partículas, e as variações dos seus valores afetam seus efeitos *in vivo* (MOHANRAJ et al., 2006). O PZ é um parâmetro fundamental que afeta a estabilidade de nanoestruturas em solução (VERA SILVA, 2017). Os resultados demonstram que os quatro sistemas analisados se constituem-se de nanoestruturas aniônicas com cargas menores que -5 mV (Tabela 1).

A motilidade espermática total de P-BU e P-SU foi significativamente superior ($P < 0.05$), quando comparado a PGO e P-HP (Fig 1). Da mesma forma, a motilidade progressiva para P-SU foi melhor ($P < 0.05$) que para PGO e P-HP (Fig 1). O percentual de membrana íntegra foi significativamente maior para P-SU quando comparado ao controle PGO ($P < 0,05$) (Fig. 2).

Desta forma, nanoemulsões processadas por sonda ultrassônica são eficientes na homogeneização, emulsificação e diminuição no diâmetro das micelas de LDL, resultando assim em uma maior crioproteção dos espermatozoides, devido à maior disponibilidade das nanopartículas frente às membranas espermáticas. Pois, o poder crioprotetor do LDL, é relacionado principalmente à sua aderência na membrana plasmática dos espermatozoides (BERGERON, CRETE et al. 2004), e formação de interface entre ácidos graxos e água (ANTON, MARTINET et al. 2003). Além de, promover a entrada de fosfolipídios e colesterol na membrana celular (BERGERON, CRETE et al. 2004), formar complexos com proteínas do plasma seminal, evitando a ação deletéria destas sobre as membranas (MANJUNATH, NAUC et al. 2002).

O potencial zeta, se correlacionou significativamente com a motilidade espermática total ($r=0,12$) e integridade de membrana ($r=0,16$). Desta forma, os gametas criopreservados com nanoestruturas de LDL com menor concentração

de íons na superfície, demonstraram maior movimentação. Adicionalmente esta configuração química iônica da LDL, aumenta suas forças de atração e consequente proteção das membranas, resultante da maior interação com os espermatozoides.

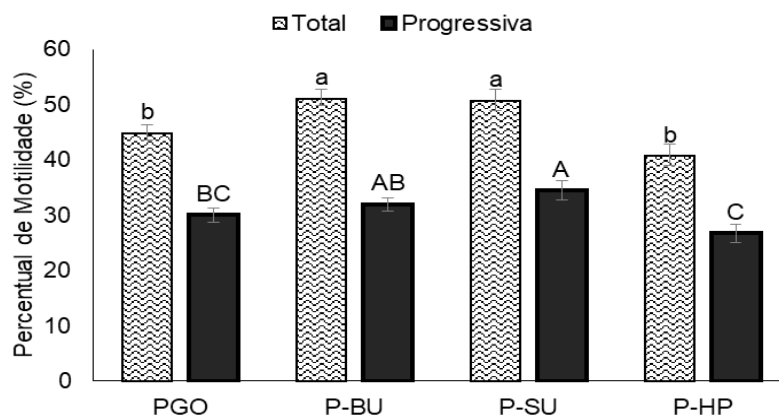


Figura 1. Percentuais de motilidade de espermatozoides criopreservados com diferentes nanoestruturas de LDL.

a,b,c: Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

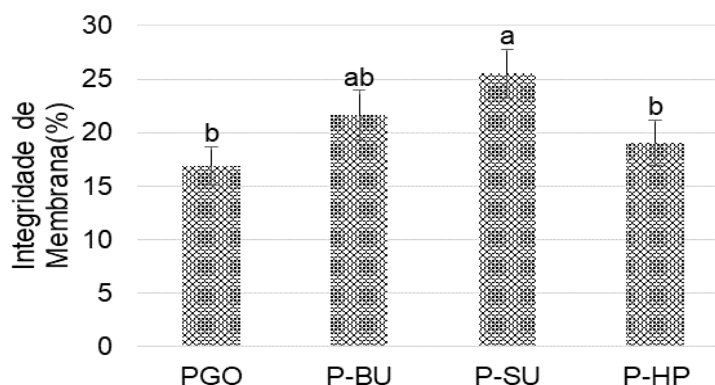


Figura 1. Percentual de integridade de membrana de espermatozoides criopreservados com diferentes nanoestruturas de LDL.

a,b,c: Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

4. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que o potencial zeta é um parâmetro importante na avaliação de nanoestruturas de LDL em diluentes de congelamento seminal. Ainda, nanopartículas de LDL submetidas à metodologia de sonda ultrassônica são mais eficientes na manutenção da motilidade e integridade de membrana de espermatozoides criopreservados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTON, M. et al. Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. **Food Chemistry**, v. 83, n. 2, p.175–183, 2003.

ASSI, L. M. et al. Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. **Brasilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.

BERGERON, A. et al. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology Reproduction**, v. 70, n. 3, p.708-17, 2004.

CORCINI, C. D. et al. Effect of egg yolk plasma on dog sperm cryopreservation. **Andrologia**, v. 48, n. 1, p. 114-115, 2016.

CIPRIANO, V. T.F.; FREITAS, C. G. O impacto da criopreservação na qualidade seminal. **Reprodução & Climatério**, v. 28, n. 3, p. 112-116, 2013.

KENTISHA S. et al. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.9, n.2, p.170-175, 2008.

MANJUNATH, P. et al. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology Reproduction**, v.67, n.4, p. 1250-8, 2002.

MOHANRAJ, V.J.;Chen, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmadeutical Research**, v.5, n.1, p.561-573, 2006.

MOUSSA, M. et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, n. 6, p.1695-706, 2002.

PRAPAIWAN, N. et al. Low-density Lipoprotein Improves Motility and Plasma Membrane Integrity of Cryopreserved Canine Epididymal Spermatozoa. **Asian-Australas Journal Animal Science**, v. 29, n. 5, p.646-51, 2016.

QUINN, P. J.; CHOW, P. Y. W.; WHITE, I. G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **Reproduction**, v. 60, n. 2, p. 403-407, 1980.

RIGANO, L.; LIONETTI, N. Nanobiomaterials in galenic formulations and cosmetics. In: **Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics**. William Andrew Publishing, 2016. p. 121-148.

SILVA, Vera Lúcia Domingues. **Micelas Poliméricas e Nanopartículas de Lípidos Sólidos, Contendo Paclitaxel, para Terapêutica de Cancro da Mama**. 2013. Dissertação de Mestrado.

VARELA JUNIOR A.S., et al. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. **Animal Reproduction Science**, v.1, n.4, p.323-7, 2009.